

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2017. № 2

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2017. № 2

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.

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

Главный редактор

Никифоров Михаил Ефимович – Отделение биологических наук НАН Беларуси

Редакционная коллегия

- И. Д. Вологовский** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси
(заместитель главного редактора)
- В. И. Парфенов** – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси (заместитель главного редактора)
- В. Г. Колосовская** – ведущий редактор журнала
- А. Н. Евтушенко** – Белорусский государственный университет
- А. В. Кильчевский** – Президиум Национальной академии наук Беларуси
- Э. И. Коломиец** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси
- Н. А. Ламан** – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
- А. Г. Лобанок** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

- В. Е. Падутов** – Институт леса Национальной академии наук Беларуси
В. Н. Решетников – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси
В. В. Титок – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси
Л. В. Хотылева – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси
С. Н. Черенкевич – Белорусский государственный университет
Н. В. Шалыго – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси
В. М. Шкуматов – Белорусский государственный университет

Редакционный совет

- В. Ф. Багинский** – Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины (Республика Беларусь)
А. Баршевский – Даугавпилский университет (Латвия)
Я. Б. Блюм – Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины (Украина)
В. В. Валетов – Мозырский государственный педагогический университет имени И. П. Шамякина (Республика Беларусь)
В. Е. Гайдук – Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина (Республика Беларусь)
Ю. Ю. Дгебуадзе – Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук (Российская Федерация)
Н. А. Колчанов – Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (Российская Федерация)
В. В. Кузнецов – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук (Российская Федерация)
В. Олех-Пясэцка – Варшавский университет сельского хозяйства (Польша)
О. Н. Пугачев – Зоологический институт Российской академии наук (Российская Федерация)
А. И. Рапопорт – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета (Латвия)
И. А. Тихонович – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (Российская Федерация)
В. В. Швартау – Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины (Украина)
Н. К. Янковский – Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук (Российская Федерация)

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. № 2.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*

Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 13.04.2017. Выход в свет 27.04.2017. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 90 экз. Заказ 55.

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. no. 2

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

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)

Editor-in-Chief

Nikiforov Mikhail Yefimovich – Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus

Editorial Board

- I. D. Volotovskii** – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus
(*Associate Editor-in-Chief*)
- V. I. Parfyonov** – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus
(*Associate Editor-in-Chief*)
- V. G. Kolosovskaya** – *Managing Editor*
- S. N. Cherenkevich** – Belarusian State University
- A. N. Evtushenkov** – Belarusian State University
- L. V. Khotyleva** – Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
- A. V. Kilchevsky** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus
- E. I. Kolomiets** – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus
- N. A. Laman** – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus
- A. G. Lobanok** – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus
- V. E. Padutov** – Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus
- V. N. Reshetnikov** – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus
- N. V. Shalygo** – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus
- V. M. Shkumatov** – Belarusian State University
- V. V. Titok** – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

Editorial Council

- V. F. Baginski** – F. Skorina Gomel State University (Republic of Belarus)
A. Barsevskis – Daugavpils University (Latvia)
Ya. B. Blume – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine (Ukraine)
Yu. Yu. Dgebuadze – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation)
V. E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University (Republic of Belarus)
N. A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation)
V. V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation)
W. Olech-Piasecka – Warsaw University of Life Sciences (Poland)
O. N. Pugachev – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation)
A. I. Rapoport – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia (Latvia)
V. V. Schwartz – Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine (Ukraine)
I. A. Tikhonovich – All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (Russian Federation)
V. V. Valetov – I. P. Shamyakin Mozyr State Pedagogical University (Republic of Belarus)
N. K. Yankovski – Vavilov Institute of General Genetics. Russian Academy of Sciences (Russian Federation)

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: vestibio.belnauka.by

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series. 2017. no. 2.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*

Computer imposition *Y. A. Aheichyk*

It was sent of the press 13.04.2017. Appearance 27.04.2017. Format 60×84 ¹/₈. Offset paper. Digital press.

Printed pages 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 90 copies. Order 55.

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: 40, F. Scorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2017

ЗМЕСТ

Куницкая Ю. Н., Кочеткова Т. А., Коваленко Е. А., Голубева Е. Н., Булай П. М., Молчанов П. Г., Денисов А. А., Питлик Т. Н., Черенкевич С. Н. Пролиферативная активность и мембранный потенциал клеток линий С6 и HeLa при культивировании в условиях электрической стимуляции	7
Левкович А. В., Масловский О. М. Динамика и прогноз развития метапопуляций мха <i>Neckera pennata</i> в Беларуси	14
Божидай Т. Н., Кухарчик Н. В. Молекулярная характеристика изолята вируса красной кольцевой пятнистости голубики	27
Аверина Н. Г., Щербаков Р. А., Недведь Е. Л., Минков И. Влияние нитропирина на повышение солеустойчивости растений ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	33
Верещако Г. Г., Чуешова Н. В., Цуканова Е. В., Бакшаева М. А. Радиационное поражение сперматогенных клеток и эпидидимальных сперматозоидов крыс линии Вистар после внешнего облучения	40
Левый А. В., Воронкова Е. В., Полюхович Ю. В., Ермишин А. П. ДНК-маркеры генов устойчивости к фитофторозу и к Y-вирусу у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля <i>Solanum stoloniferum</i>	46
Лабор С. А., Степура В. И., Степура И. И., Смирнов В. Ю. Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамин и его производных	55
Дубовик Д. В., Скуратович А. Н., Миллер Д., Спиридович Е. В., Виноградова Ю. К. Чужеродная фракция флоры на плантациях клюквы крупноплодной <i>Oxycoccus macrocarpos</i> (Ait.) Pursh в Беларуси	66
Иманбаева А. А., Белозеров И. Ф. Комплексная шкала диагностики интродукционной ценности растений в аридных условиях Мангистау	78
Пирог Т. П., Ивахнюк Н. А., Вороненко А. А. Микробный синтез экзополисахарида этаполана на различных видах отработанных растительных масел	87
Цеханович С. В. Особенности роста и развития сортов хризантемы корейской (<i>Chrysanthemum coreanum</i> Nakai), интродуцированных в Беларуси	94

АГЛЯДЫ

Соболевская И. С., Мяделец О. Д., Пашинская Е. С. Циркадные ритмы и метаболизм липидов в животных клетках. Часть I. Молекулярно-генетические аспекты биологических часов	100
Шутилова Н. И. Механизм фотосинтетического образования молекулярного кислорода	112

CONTENTS

Kunitskaya Y., Kochetkova T., Kavalenka E., Golubeva E., Bulai P., Molchanov P., Denisov A., Pitlik T., Cherenkevich S. Proliferative activity and membrane potential of C6 and HeLa cell lines in culture under electrical stimulation	7
Levkovich A. V., Maslovsky O. M. Metapopulation dynamics and prognosis of development of the moss <i>Neckera pennata</i> in Belarus.....	14
Bazhydai T. N., Kukharchyk N. V. Molecular characterization of <i>Blueberry red ringspot virus</i> isolate	27
Averina N. G., Sherbakov R. A., Nedved E. L., Minkov I. N. Nitropirin contributes to the enhancement of plant salt tolerance of barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	33
Vereschako G. G., Chueshova N. V., Tsukanova E. V., Bakshayeva M. A. Radiation injury spermatogenic cells and spermatozoa rats Wistar after external exposure	40
Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukchovich Y. V., Yermishin A. P. Representativeness of DNA-markers of late blight and PVY-resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species <i>Solanum stoloniferum</i>	46
Labor S. A., Stsiapura V. I., Stepuro I. I., Smirnov V. Yu. In the presence of phenol-containing compounds oxoferryl forms of myoglobin and hemoglobin catalyze oxidative transformation of thiamine and its derivatives	55
Dubovik D. V., Skuratovich A. H., Miller D. R., Spiridovich E. V., Vinogradova Yu. K. Alien species on plantations <i>Oxycoccus macrocarpos</i> (Ait.) Pursch in Belarus.....	66
Imanbayeva A. A., Belozarov I. F. Complex scale of diagnostics of introduction value of plants in arid conditions of Mangistau.....	78
Pirog T. P., Ivakhniuk N. A., Voronenko A. A. Microbial synthesis of exopolysaccharide ethapolan on various types of waste vegetable oils.....	87
Tsekhanovich S. V. Features growth and development of Korean chrysanthemum variety (<i>Chrysanthemum coreanum</i> Nakai) introduced in Belarus	94

REVIEWS

Sobolevskaya I. S., Myadelets O. D., Pashinskaya E. S. Circadian rhythm and lipid metabolism in animal cells. Part I. Molecular and genetic aspects of the biological clock	100
Shutilova N. I. Mechanism of photosynthetic molecular oxygen formation.....	112

**Ю. Н. Куницкая, Т. А. Кочеткова, Е. А. Коваленко, Е. Н. Голубева, П. М. Булай,
П. Г. Молчанов, А. А. Денисов, Т. Н. Питлик, С. Н. Черенкевич**

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК ЛИНИЙ C6 И HELA ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Исследовано влияние долговременной электрической стимуляции на функциональные свойства клеток в культуре. В работе использованы клетки глиомы крысы линии C6 и клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa. Стимуляцию проводили на протяжении 12 ч однородным электрическим полем с частотой 10 Гц. Для измерения величины равновесного трансмембранного потенциала применяли метод пэтч-кламп, пролиферативную активность оценивали по изменению числа клеток относительно их числа в контрольном образце.

Показано, что электрическая стимуляция вызывает изменение равновесного трансмембранного потенциала клеток, что приводит к последующему изменению их пролиферативной активности. Выявлено, что деполяризация плазматической мембраны усиливает пролиферативную активность клеток, в то время как гиперполяризация замедляет. Установлено, что конечный результат зависит как от параметров электрического поля, так и от типа клеток. Таким образом, наблюдаемый эффект связан с активацией потенциала-зависимых ионных каналов, приводящей к изменению времени прохождения клеткой определенной фазы клеточного цикла. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методов клеточной инженерии.

Ключевые слова: культура клеток, HeLa, C6, электрическая стимуляция, пролиферативная активность, мембранный потенциал.

**Y. Kunitskaya, T. Kochetkova, E. Kavalenka, E. Golubeva, P. Bulai, P. Molchanov,
A. Denisov, T. Pitlik, S. Cherenkevich**

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

PROLIFERATIVE ACTIVITY AND MEMBRANE POTENTIAL OF C6 AND HELA CELL LINES IN CULTURE UNDER ELECTRICAL STIMULATION

The influence of long-term electrical stimulation on the functional properties of cells in culture was investigated. C6 rat glioma cells and HeLa human adenocarcinoma cells were used in this work. Stimulation was carried out with uniform electric field for 12 hours with the train of pulses at a frequency of 10 Hz. Measurements of membrane potential were conducted using patch-clamp technique; the proliferative activity was evaluated by cell counting relative to control sample.

It was shown that electrical stimulation causes a change in membrane potential of the cells and subsequent changes in their proliferative activity. It was established that membrane depolarisation increases proliferative activity whereas hyperpolarization decreases it. It was established that the effect depends on the parameters of the electric field and the type of cells. The observed effect is associated with activation of potential-dependent ion channels, resulting in changes of the specific phase duration in the cell cycle. The obtained results can be used in development methods of cell engineering.

Keywords: cell culture, HeLa, C6, electrical stimulation, proliferative activity, membrane potential.

Введение. Стремительное развитие современных клеточных технологий требует создания новых и эффективных методов управления пролиферативной активностью клеток. Существуют не только биохимические, но и физические способы регуляции клеточной пролиферации, среди которых особое место занимает электрическая стимуляция [1]. К настоящему времени выявлена связь между величиной равновесного трансмембранного потенциала и фазами клеточного цикла [2, 3]. Следовательно, воздействие на трансмембранный потенциал может привести к изменению пролиферативной активности клеток. Таким образом, актуальными являются задачи исследования и разработки методов регуляции клеточного цикла с применением электрической стимуляции.

Как известно, электрическая стимуляция клеток позволяет активировать экспрессию генов в клетках [4], индуцировать пролиферацию и дифференцировку клеток [5], а также запускать апоптоз [6]. Установлено, что характер и эффект электрической стимуляции существенно зависят

от параметров действующего поля, таких как напряженность поля, длительность воздействия и число стимулирующих импульсов в трейне. В ряде работ показано, что при действии электрического поля (импульсы длительностью 2 мс, частотой 1 Гц и амплитудой 300 В/м) увеличивается подвижность клеток и повышается экспрессия аденозиновых рецепторов типа A_{2b} [7]. Действие электрического поля напряженностью 75–100 В/м способствует переориентации клеток в пространстве, изменению их морфологии и ускорению миграции, что сопровождается активацией VEGF-рецепторов [8]. Действие электрического поля напряженностью 200 В/м в течение 60 мин приводит к снижению эластичности мембран клеток [9].

Несмотря на наличие литературных данных о действии электрического поля на клетки в период культивирования, закономерности изменения их морфофункциональных свойств в большинстве работ не выявлены. Отсутствие информации о механизмах регуляции функционального состояния клеток не позволяет разрабатывать протоколы электрической стимуляции для направленной регуляции их функциональной активности.

Цель данной работы – изучение влияния электрической стимуляции на пролиферативную активность и равновесный трансмембранный потенциал клеток на примере линий С6 и HeLa.

Материалы и методы исследования. Клетки линий С6 и HeLa культивировали в среде DMEM (питательная среда Игла в модификации Дульбекко, Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Bioclot, Германия) и 80 мкг/мл гентамицина. Культивирование клеток проводили в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С.

Электрическое поле формировали с помощью платиновых электродов, подключенных к программируемому источнику питания. Электроды помещали непосредственно в чашки Петри.

Все измерения осуществляли в течение 2 ч после окончания стимуляции.

Равновесный трансмембранный потенциал измеряли при комнатной температуре (21–23 °С) с помощью метода пэтч-кламп в режиме фиксации токов при использовании усилителя ЕРС-8 (Heka Elektronik, Germany). Применяли стеклянные капилляры из боросиликатного стекла (Sutter Instrument, США) с сопротивлением 1–2 МОм, изготовленные при помощи пуллера Р-97 (Sutter Instrument, США). В качестве внеклеточного буферного раствора использовали питательную среду DMEM. Внутриэлектродный раствор для клеток линии С6 содержит (в ммоль/л): калиевую соль L-аспарагиновой кислоты – 120, NaCl – 10, $MgCl_2$ – 5, ЭДТА – 10, HEPES – 5, $CaCl_2$ – 1; внутриэлектродный раствор для клеток линии HeLa содержит (в ммоль/л): калий-D-глюконат – 130, KCl – 10, $MgCl_2$ – 5, ЭДТА – 0,6, HEPES – 5, $CaCl_2$ – 0,06.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,4 %-ного раствора красителя трипанового синего. Пролиферативную активность клеток рассчитывали по формуле $N \cdot 100 \% / N_0$, где N – число клеток в исследуемом образце, N_0 – число клеток в контроле. Для подсчета клеток использовали программу Cell[^]D Soft Imaging System (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Германия).

Статистическую значимость отличий (P) определяли с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Для проведения электрической стимуляции использовали однородное переменное электрическое поле (рис. 1, *a*). Электрическую стимуляцию начинали через 8 ч после высевания клеток в чашки Петри. Длительность стимуляции составляла 12 ч. Использовали несколько режимов электрической стимуляции с разной напряженностью электрического поля (6,6 и 20 В/м) и разным числом стимулирующих импульсов в трейне (1, 3 и 5 импульсов). Длительность стимулирующих бифазных симметричных импульсов составляла 2 мс, частота следования трейнов – 10 Гц (рис. 1, *b*).

Показано, что при электрической стимуляции жизнеспособность клеток существенно не меняется и остается на уровне 80–90 %.

Выявлено, что стимуляция клеток линии С6 электрическим полем различной напряженности приводит к изменению величины равновесного трансмембранного потенциала относительно потенциала контрольного образца (деполяризация или гиперполяризация плазматической мембраны), как показано на рис. 2, *b*. При неизменной напряженности внешнего поля значение трансмембранного потенциала стремится к значению –50 мВ при увеличении числа стимулирующих импульсов. Также установлено, что увеличение числа стимулирующих импульсов

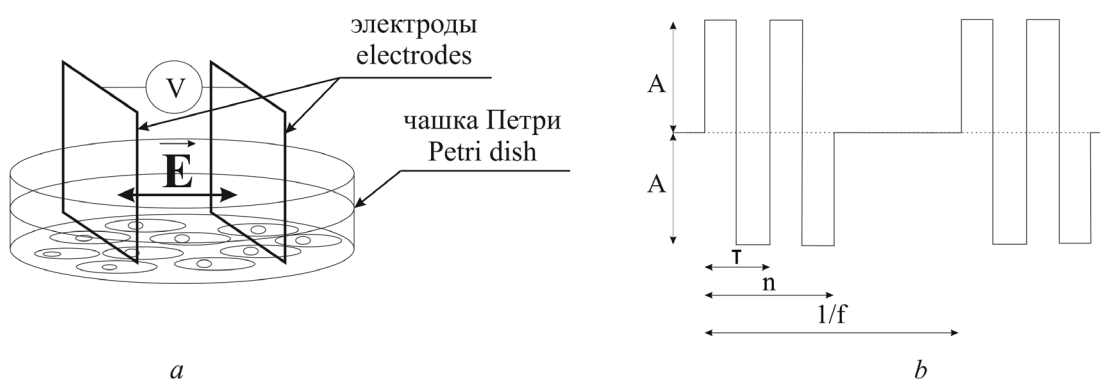


Рис. 1. Электрическая стимуляция: *a* – схема проведения; *b* – параметры (*A* – амплитуда стимулирующего импульса, τ – длительность импульса, *f* – частота следования трейнов; *n* – количество импульсов в трейне)
 Fig. 1. Electrical stimulation: *a* – scheme; *b* – parameters (*A* – amplitude of the stimulating pulse, τ – pulse duration, *f* – frequency of the train; *n* – number of pulses in the train)

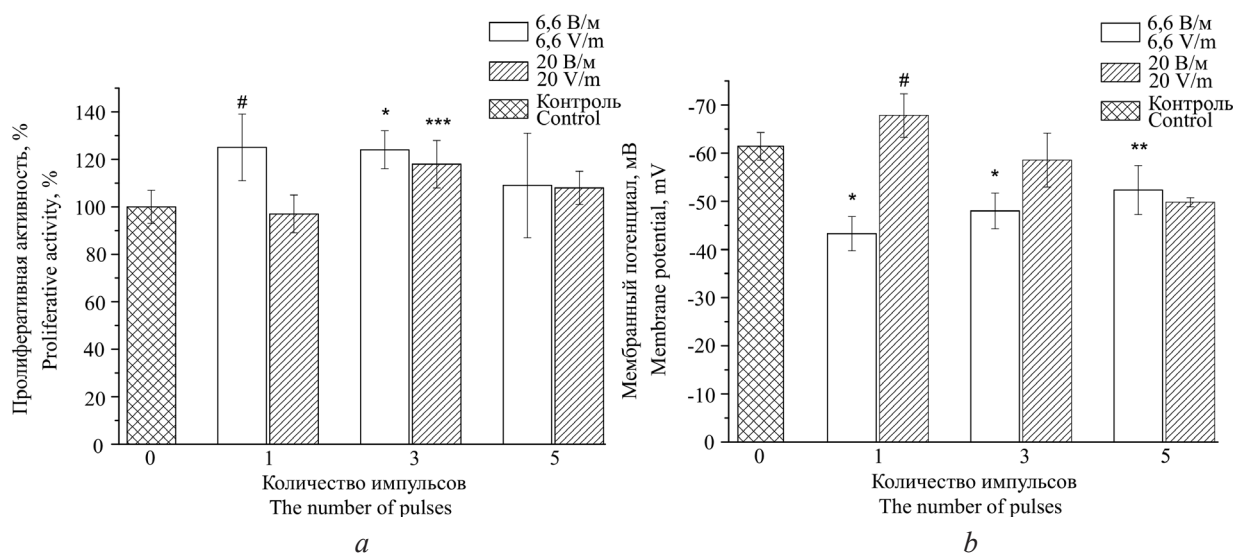


Рис. 2. Изменение пролиферативной активности (*a*) и мембранного потенциала (*b*) клеток линии С6 (* – $P \geq 95\%$, ** – $P \geq 90\%$, *** – $P \geq 80\%$, # – $P \geq 75\%$)

Fig. 2. Change of proliferative activity (*a*) and membrane potential (*b*) of the C6 cell line (* – $P \geq 95\%$, ** – $P \geq 90\%$, *** – $P \geq 80\%$, # – $P \geq 75\%$)

при неизменной напряженности поля сопровождается повышением пролиферативной активности до 110 % по сравнению с контролем (рис. 2, *a*). Таким образом, показано, что эффект действия электрического поля на равновесный трансмембранный потенциал и, следовательно, на пролиферативную активность клеток линии С6 нивелируется при увеличении числа стимулирующих импульсов в трейне.

Для клеток линии HeLa статистически значимое отличие ($P \geq 90\%$) величины равновесного трансмембранного потенциала и числа жизнеспособных клеток от контрольного образца обнаружено при стимуляции полем напряженностью 20 В/м. Воздействие внешним электрическим полем напряженностью 20 В/м приводит к деполяризации плазматической мембраны и повышению пролиферативной активности клеток, при этом с увеличением числа стимулирующих импульсов в трейне отмечаются гиперполяризация мембраны (трансмембранный потенциал стремится к значению -50 мВ) (рис. 3, *b*) и снижение пролиферативной активности (рис. 3, *a*). При меньшей напряженности поля (6,6 В/м) статистически значимых отличий трансмембранного потенциала и пролиферативной активности клеток относительно параметров контрольного образца не обнаружено.

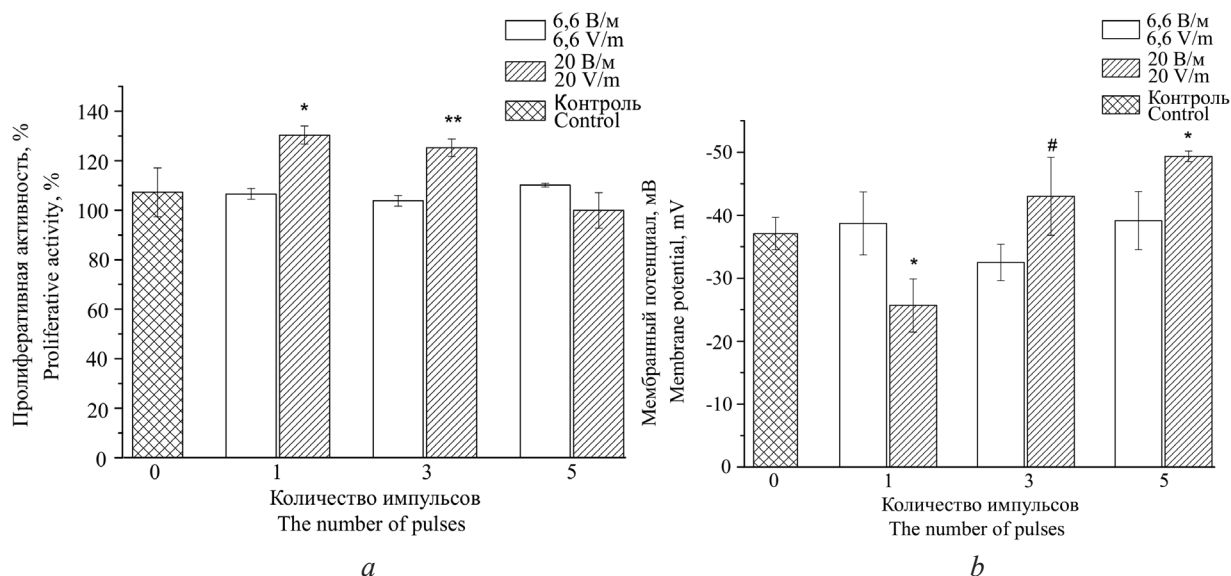


Рис. 3. Изменение пролиферативной активности (a) и мембранного потенциала (b) клеток линии HeLa (* – $P \geq 95\%$, ** – $P \geq 90\%$, *** – $P \geq 80\%$, # – $P \geq 75\%$)

Fig. 3. Change of proliferative activity (a) and membrane potential (b) of the HeLa cell line (* – $P \geq 95\%$, ** – $P \geq 90\%$, *** – $P \geq 80\%$, # – $P \geq 75\%$)

В настоящее время имеется большое число литературных данных об участии потенциал-зависимых K^+ - и Ca^{2+} -каналов, а также Cl^- -каналов в регуляции пролиферации и миграции многих типов клеток [10]. Известно, что в мембранах клеток линий HeLa и C6 содержится большое число K^+ -, Ca^{2+} -каналов, Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов [11–14], а также Na^+ - и Cl^- -каналов [15]. Известно, что в ходе клеточного цикла происходит изменение мембранного потенциала. В фазе G1 начинается гиперполяризация мембраны клетки, обусловленная увеличением калиевой проницаемости мембраны за счет увеличения экспрессии K^+ -каналов. В фазе G2 происходит деполяризация [3] за счет увеличения проницаемости мембраны для ионов хлора вследствие усиления экспрессии хлорных каналов. Изменение мембранного потенциала является либо следствием нахождения клетки в той или иной стадии цикла, либо причиной изменения скорости прохождения клеткой отдельных фаз. Таким образом, ускорение или замедление наступления следующей фазы клеточного цикла может регулироваться трансмембранным потенциалом.

При стимуляции одиночными импульсами с малой напряженностью электрического поля деполяризация мембраны обусловлена активацией Na^+ -каналов. Характерное время активации данных ионных каналов составляет от 1 до 2 мс, что соответствует длительности одиночных стимулирующих импульсов. Активация Na^+ -каналов (и их последующее открытие) приводит к поступлению ионов натрия внутрь клетки и к постепенной деполяризации мембраны. Деполяризация мембраны ускоряет наступление фазы G2, что способствует увеличению пролиферативной активности. Увеличение напряженности электрического поля до 20 В/м при стимуляции одиночными импульсами сопровождается гиперполяризацией мембраны, вызванной активацией K^+ -каналов. Несмотря на более медленную активацию ионных каналов данного типа (~10 мс), даже небольшое увеличение калиевой проводимости приводит к гиперполяризации мембраны, так как количество K -каналов в исследуемых клетках значительно превышает количество Na^+ -каналов. При гиперполяризации мембраны наступление фазы G2 замедляется и пролиферативная активность снижается.

При увеличении числа стимулирующих импульсов величина мембранного потенциала приближается к значению -50 мВ (эффекты стимуляции нивелируются). Данное явление обусловлено повышением концентрации ионов кальция в цитоплазме вследствие увеличения длительности стимулирующих трейнов [16], что вызывает активацию кальций-зависимых хлорных каналов и/или усиление экспрессии хлорных каналов [17–19]. Увеличение хлорной проводимости мембраны приводит к восстановлению мембранного потенциала до контрольных значений.

Для клеток линии HeLa изменения мембранного потенциала наблюдали при больших значениях напряженности, чем для клеток линии С6, что может быть обусловлено различием их размеров. Известно, что степень деполяризации клеточной мембраны в электрическом поле зависит от линейных размеров клеток [20].

Заключение. Установлено, что усиление пролиферативной активности клеток наблюдается при деполяризации плазматической мембраны, в то время как гиперполяризация приводит к замедлению скорости пролиферации. Показано, что увеличение как числа стимулирующих импульсов, так и напряженности электрического поля вызывает гиперполяризацию плазматической мембраны. При увеличении числа стимулирующих импульсов эффект электрической стимуляции нивелируется, что характерно для обеих клеточных линий. Таким образом, схожий характер клеточного отклика на действие электрического поля для обоих типов клеточных культур свидетельствует об универсальном характере описанных механизмов.

Список использованных источников

1. Funk, R. H. W. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration / R. H. W. Funk // *Front Physiol.* – 2015. – Vol. 6 (143). – P. 1–22.
2. Куницкая, Ю. Н. Равновесный трансмембранный потенциал опухолевых клеток линий С6, HEp-2c и HEK при пролиферации / Ю. Н. Куницкая, Е. Н. Голубева // Сб. работ 70-й науч. конф. студентов и аспирантов Белорус. гос. ун-та, 15–18 мая 2013 г., г. Минск: в 3 ч. / Белорус. гос. ун-т. – Минск, 2013. – Ч. 1. – С. 134–137.
3. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation / D. Urrego [et al.] // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* – 2014. – Vol. 369. – P. 1–10.
4. Physiological conditioning by electric field stimulation promotes cardiomyogenic gene expression in human cardiomyocyte progenitor cells / A. Lucia-Valldeperas [et al.] // *Stem Cell Res. & Therapy.* – 2014. – Vol. 5, N 93. – P. 1–5.
5. Alternating current electric fields of varying frequencies: effects on proliferation and differentiation of porcine neural progenitor cells / J. H. Lim [et al.] // *Cell Reprogram.* – 2013. – Vol. 15, N 5. – P. 405–412.
6. Effects of steep pulsed electric fields (spEF) on mitochondrial transmembrane potential of human liver cancer cell / Y. Mi [et al.] // *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* – 2007. – P. 5815–5818.
7. Electrical stimulation enhances cell migration and integrative repair in the meniscus / X. Yuan [et al.] // *Sci. Reports.* – 2014. – Vol. 4, N 3674. – P. 1–12.
8. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors / M. Zhao [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117, N 3. – P. 397–405.
9. Titushkin, I. Regulation of cell cytoskeleton and membrane mechanics by electric field: role of linker proteins / I. Titushkin, M. Cho // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96, N 2. – P. 717–728.
10. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells / B. Rouzair-Dubois [et al.] // *Eur. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 440. – P. 881–888.
11. Sauve, R. Single Ca^{++} dependent K^+ currents in hela cancer cells / R. Sauve, G. Bedfer, G. RoySingle // *The Biophys. J.* – 1983. – Vol. 45. – P. 66–68.
12. Wang, S. Identification of RBK1 potassium channels in C6 astrocytoma cells / S. Wang, N. A. Castl, G. K. Wang // *Glia.* – 1992. – Vol. 5, N 2. – P. 146–153.
13. Negulyaev, Y. A. Calcium-permeable channels in HeLa cells / Y. A. Negulyaev, G. A. Savokhina, E. A. Vedernikova // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1993. – Vol. 12, N 1. – P. 19–25.
14. Manor, D. Modulation of small conductance calcium-activated potassium channels in C6 glioma cells / D. Manor, N. Moran // *J. Membrane Biol.* – 1994. – Vol. 140, N 1. – P. 69–79.
15. Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels / A. Sardini [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol. 1618, N 2. – P. 153–162.
16. Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields / M. R. Cho [et al.] // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13, N 6. – P. 677–683.
17. Regulation of human CLC-3 channels by multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase / P. Huang [et al.] // *J. of Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 23. – P. 20093–20100.
18. Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells / M. L. Olsen [et al.] // *J. of Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, N 13. – P. 5572–5582.
19. Khatib, L. Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts / L. Khatib, D. E. Golan, M. Cho // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18, N 15. – P. 1903–1905.
20. Plonsey, R. Bioelectricity: a quantitative approach / R. Plonsey, R. C. Barr. – 3rd ed. – New York: Springer Science+ Business Media, LLC, 2007. – 528 p.

References

1. Funk, R. H. W. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration, *Frontiers in Physiology*, 2015, vol. 6.
2. Kunitskaya Y., Golubeva L. Resting transmembrane potential of C6, HEp-2c and HEK tumor cell lines during proliferation. *Sbornik robot 70-i nauchnoi konferentsii studentov i aspirantov Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta, 15–18 maia 2013 g., g. Minsk* [Proceeding of 70th scientific students conference of BSU, 15–18 May 2013, Minsk]. Minsk, 2013, part 1, pp. 134–137. (in Russian).
3. Urrego D., Tomczak A. P., Zahed F., Stühmer W., Pardo L. A. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, vol. 369, pp. 1–10.
4. Lluçia-Valldeperas A., Sanchez B., Soler-Botija C., Gálvez-Montón C., Roura S., Prat-Vidal C., Perea-Gil I., Rosell-Ferrer J., Bragos R., Bayes-Genis R. Physiological conditioning by electric field stimulation promotes cardiomyogenic gene expression in human cardiomyocyte progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 2014, vol. 5, no. 93, pp. 1–5.
5. Lim J. H., McCullen S. D., Piedrahita J. A., Lobo E. G., Olby N. J. Alternating current electric fields of varying frequencies: effects on proliferation and differentiation of porcine neural progenitor cells. *Cell Reprogram*, 2013, vol. 15, no. 5, pp. 405–412.
6. Mi Y., Sun C., Yao C., Li C., Mo D., Tang L., Liu H. Effects of steep pulsed electric fields (SPEF) on mitochondrial transmembrane potential of human liver cancer cell. *Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2007, pp. 5815–5818.
7. Yuan X., E. Arkonac D., Chao P. G., Vunjak-Novakovic G. Electrical stimulation enhances cell migration and integrative repair in the meniscus. *Scientific Reports*, 2014, vol. 4, no. 3674, pp. 1–12.
8. Zhao M., Bai H., Wang E., Forrester J. V., McCaig C. D. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *Journal of Cell Science*, 2004, vol. 117, no. 3, pp. 397–405.
9. Titushkin I., Cho M. Regulation of cell cytoskeleton and membrane mechanics by electric field: role of linker proteins. *Biophysical Journal*, 2009, vol. 96, no. 2, pp. 717–728.
10. Rouzair-Dubois B., Milandri S., Bostel J. B., Dubois J. M. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. *European Journal of Physiology*, 2000, vol. 440, pp. 881–888.
11. Sauve R., Bedfer G., RoySingle G. Single Ca^{2+} dependent K^+ currents in HeLa cancer cells. *The Biophysical Journal*, 1983, vol. 45, pp. 66–68.
12. Wang S., Castle N. A., Wang G. K. Identification of RBK1 potassium channels in C6 astrocytoma cells. *Glia*, 1992, vol. 5, no. 2, pp. 146–153.
13. Negulyaev Y. A., Savokhina G. A., Vedernikova E. A. Calcium-permeable channels in HeLa cells. *General Physiology and Biophysics*, 1993, vol. 12, no. 1, pp. 19–25.
14. Manor D., Moran N. Modulation of small conductance calcium-activated potassium channels in C6 glioma cells. *The Journal of Membrane Biology*, 1994, vol. 140, no. 1, pp. 69–79.
15. Sardini A., Amey J. S., Weylandt K. H., Nobles M., Valverde M. A., Higgins C. F. Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, vol. 1618, no. 2, pp. 153–162.
16. Cho M. R., Thatte H. S., Silvia M. T., Golan D. E. Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. *The FASEB Journal*, 1999, vol. 13, no. 6, pp. 677–683.
17. Huang P., Liu J., Di A., Robinson N. C., Musch M. W., Kaetzel M. A., Nelson D. J. Regulation of human CLC-3 channels by multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 23, pp. 20093–20100.
18. Olsen M. L., Schade S., Lyons S. A., Amaral M. D., Sontheimer H. Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *The Journal of Neuroscience*, 2003, vol. 23, no. 13, pp. 5572–5582.
19. Khatib L., Golan D. E., Cho M. Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts. *The FASEB Journal*, 2004, vol. 18, no. 15, pp. 1903–1905.
20. Plonsey R., Barr R. *Bioelectricity: a quantitative approach*, 3rd ed., New York, Springer Science+Business Media, LLC, 2007. 528 p.

Информация об авторах

Куницкая Юлия Николаевна – аспирант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliya.kunitskaya@gmail.com.

Кочеткова Татьяна Александровна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kochetkovatan@gmail.com.

Коваленко Елизавета Антоновна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kovalenko.elizabeth@gmail.com.

Information about the authors

Kunitskaya Yuliya Nikolaevna – Postgraduate student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuliya.kunitskaya@gmail.com.

Kochetkova Tatiana Alexandrovna – student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kochetkovatan@gmail.com.

Kavalenka Elizaveta Antonavna – student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kovalenko.elizabeth@gmail.com.

Голубева Елена Николаевна – старший преподаватель. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: golubeva.ln.87@gmail.com.

Булай Павел Михайлович – канд. физ.-мат. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bulaypm@bsu.by

Молчанов Павел Геннадьевич – науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavel.g.molchanov@gmail.com.

Денисов Андрей Анатольевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: an.denisov@gmail.com.

Питлик Тарас Николаевич – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь). E-mail: taras.pitlik@gmail.com.

Черенкевич Сергей Николаевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: cherenkevich@bsu.by.

Для цитирования

Пролиферативная активность и мембранный потенциал клеток линий C6 и HeLa при культивировании в условиях электрической стимуляции / Ю. Н. Куницкая [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 7–13.

Golubeva Elena Nikolaevna – Senior Lecturer. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: golubeva.ln.87@gmail.com.

Bulai Pavel Michailovich – Ph. D. (Phys. and Math.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bulaypm@bsu.by.

Molchanov Pavel Genadievich – Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavel.g.molchanov@gmail.com.

Denisov Andrei Anatolievich – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: an.denisov@gmail.com.

Pitlik Taras Nikolaevich – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: taras.pitlik@gmail.com.

Cherenkevich Sergey Nikolaevich – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cherenkevich@bsu.by.

For citation

Kunitskaya Y., Kochetkova T., Kavalenka E., Golubeva E., Bulai P., Molchanov P., Denisov A., Pitlik T., Cherenkevich S. Proliferative activity and membrane potential of C6 and HeLa cell lines in culture under electrical stimulation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 7–13.

А. В. Левкович, О. М. Масловский

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

ДИНАМИКА И ПРОГНОЗ РАЗВИТИЯ МЕТАПОПУЛЯЦИЙ МХА *NECKERA PENNATA* В БЕЛАРУСИ

С целью изучения на территории Беларуси устойчивости, особенностей динамики и составления прогноза развития метапопуляций эпифитного мха *Neckera pennata* Hedw., включенного в Красную книгу Республики Беларусь, а также охраняемого в Европе, исследована динамика 6 метапопуляций данного вида. Подтверждено влияние таких параметров, как диаметр ствола, угол наклона деревьев, глубина трещин коры, на относительное покрытие данного мха и его средний годовой прирост. Выявлены оптимальные значения данных параметров для роста *N. pennata*. Предложены коэффициент оптимальности для каждой метапопуляции, вычисление которого дает возможность количественно прогнозировать ее развитие, а также показатель зависимости прироста от параметров деревьев-хозяев, обилия и меры связанности – R_i , между которыми выявлена сильная корреляция. Установлена нелинейная зависимость среднего относительного годового прироста от R_i по отдельным видам деревьев. Проведенные исследования позволили сделать более точный прогноз развития метапопуляций *N. pennata* на ближайшие два года.

Ключевые слова: *Neckera pennata*, параметры деревьев-хозяев, нелинейная зависимость, коэффициенты оптимальности, средний балл состояния метапопуляций, прогноз.

A. V. Levkovich, O. M. Maslovsky

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

METAPOPULATION DYNAMICS AND PROGNOSIS OF DEVELOPMENT OF THE MOSS *NECKERA PENNATA* IN BELARUS

For the investigations on the territory of Belarus of stability, dynamics and making prognosis of development of meta-populations of the epiphytic moss *Neckera pennata* Hedw., included in the Red Data Book of Belarus and also protected in Europe, the dynamics of six metapopulations of this species was studied. The influence of such parameters as tree trunk diameter, tree inclination, and depth of bark crevices on the relative cover of this moss and its average annual increase was confirmed. The optimal values of these parameters for the growth of *N. pennata* were revealed. The coefficient of optimality for every metapopulation, which estimation gives possibility to predict quantitatively its development, and also the factor of dependence of increase on the parameters of host trees, ability and connectivity – R_i , between which strong correlation was revealed, were proposed. Non-linear dependence of the average relative annual increase on R_i for the separate tree species was established. The investigations enabled to do more accurate prognosis of the development of *N. pennata* metapopulations in the next two years.

Keywords: *Neckera pennata*, parameters of host trees, non-linear dependence, coefficients of optimality, average point of state of metapopulations, prognosis.

Введение. Эпифитные мхи представляют собой специфическую экологическую группу организмов, поселяющихся на коре живых деревьев. Многие из них являются редкими видами, нуждающимися в соблюдении специального режима охраны. В связи с этим актуальным является изучение динамики и пространственной структуры популяций видов данной группы с целью оценки их состояния, устойчивости и прогноза развития.

Несмотря на то что к настоящему времени достаточно хорошо известны подходы к изучению популяций видов сосудистых растений [1–4], целостная методология популяционных исследований видов эпифитных мхов в Беларуси разработана недостаточно. Основой такой методологии может стать предложенный в Европе в конце XX в. и активно применяемый в настоящее время метапопуляционный подход, учитывающий особую структуру популяций таких организмов и позволяющий проследить их динамику и делать прогноз развития [5].

При общем подходе метапопуляция – это совокупность дискретных (или относительно дискретных) в пространстве локальных популяций, взаимодействующих друг с другом вследствие расселения диаспор или генетического потока [6]. Обычно в качестве метапопуляции выступает комплекс локальных популяций того или иного вида в пределах ландшафта, крупного лесного массива и т. п.

Многие эпифитные мхи приурочены к отдельным деревьям, окруженным неподходящим для расселения пространством. Деревья-хозяева часто рассредоточены на территории, и расстояние между ними может быть довольно велико. В связи с этим для эпифитов в качестве локальной популяции нами принимается группа непосредственно взаимодействующих особей, поселяющихся на одном дереве, тогда как метапопуляция – это комплекс локальных популяций эпифитов в пределах фитоценоза. Сходного подхода придерживаются Tord Snäll, Johan Ehrlén и Nåkan Rydin [7].

Исходя из особенностей развития и распределения эпифитов, их приуроченности к деревьям-хозяевам, оптимальным подходом к изучению таких видов является метапопуляционный. Именно он наилучшим образом позволяет оценить состояние и устойчивость вида и смоделировать его существование на определенной территории. Некоторые выявленные закономерности впоследствии могут быть применены и при изучении популяций видов сосудистых растений.

Цель исследования – изучение на основе метапопуляционного подхода с использованием методов математического моделирования состояния и устойчивости популяций охраняемого эпифитного мха *Neckera pennata* Hedw. на территории Беларуси, оценка динамики их развития и составление прогноза этого развития.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования выбран мох *Neckera pennata* Hedw. – приуроченный в основном к подзоне широколиственных лесов неморальный вид, распространенный в Европе, Азии, Северной и Южной Америке, Австралии и Африке, однако встречающийся спорадически и резко сокращающий численность. *N. pennata* относится к видам, находящимся под угрозой исчезновения в Европе, подлежит охране согласно Приложению I к Бернской конвенции, а также Красной книге мохообразных Европы (категория *vulnerable*) [8]. В Беларуси имеет 4-ю категорию охраны (потенциально уязвимый вид) [9]. Включен в красные книги Австрии, Великобритании, Чехии, Финляндии, Германии, Швейцарии, Швеции, Литвы, Латвии, Венгрии, Польши, Словакии, Португалии, Болгарии, Черногории, Румынии, Сербии, а также ряда регионов Российской Федерации [10].

В Беларуси вид встречается спорадически во всех административных областях (Брестская обл.: Березовский, Дрогичинский, Ивановский, Ивацевичский, Каменецкий, Ляховичский, Малоритский, Пружанский р-ны; Витебская обл.: Бешенковичский, Браславский, Докшицкий, Лепельский, Миорский, Толочинский, Шумилинский р-ны; Гомельская обл.: Буда-Кошелевский, Житковичский, Лельчицкий, Мозырский, Светлогорский р-ны; Гродненская обл.: Волковысский, Гродненский, Зельвенский, Ивьевский, Островецкий, Ошмянский, Сморгонский р-ны; Минская обл.: Борисовский, Вилейский, Воложинский, Дзержинский, Копыльский, Любанский, Минский, Молодечненский, Мядельский, Пуховичский, Стародорожский, Столбцовский, Узденский, Червенский р-ны; Могилевская обл.: Горецкий, Осиповичский р-ны [9, с дополнениями]) (рис. 1).

Во время полевых экспедиций 2007–2009 гг. нами выявлено 5 новых популяций *N. pennata* [11], а с 2010 по 2016 г. – еще 31 новая популяция в Каменецком (окр. г. п. Каменюки), Бешенковичском (окр. д. Лаппы), Браславском (2 популяции в окр. д. Ахремовцы в парке Бельмонт), Докшицком (окр. д. Коляги), Шумилинском (окр. д. Глушица, 2 популяции в окр. д. Заручевье), Светлогорском (окр. д. Ковчицы 2-е), Волковысском (2 популяции в окр. д. Замковая), Гродненском (2 популяции в окр. д. Бушнево), Зельвенском (окр. д. Вороницы), Ивьевском (окр. д. Шильвы, 2 популяции в окр. д. Петухово), Сморгонском (окр. д. Попелевичи), Борисовском (окр. д. Манча), Дзержинском (окр. пос. Энергетиков), Копыльском (окр. д. Васильчицы), Любанском (окр. д. Калиновка, окр. д. Аточка), Минском (2 популяции в окр. д. Околица), Мядельском (окр. д. Шеметово, окр. д. Мельники), Пуховичском (окр. д. Чирвоный Берег), Стародорожском (3 популяции в окр. д. Застаричье) районах. Всего в Беларуси насчитывается 69 популяций *N. pennata*.

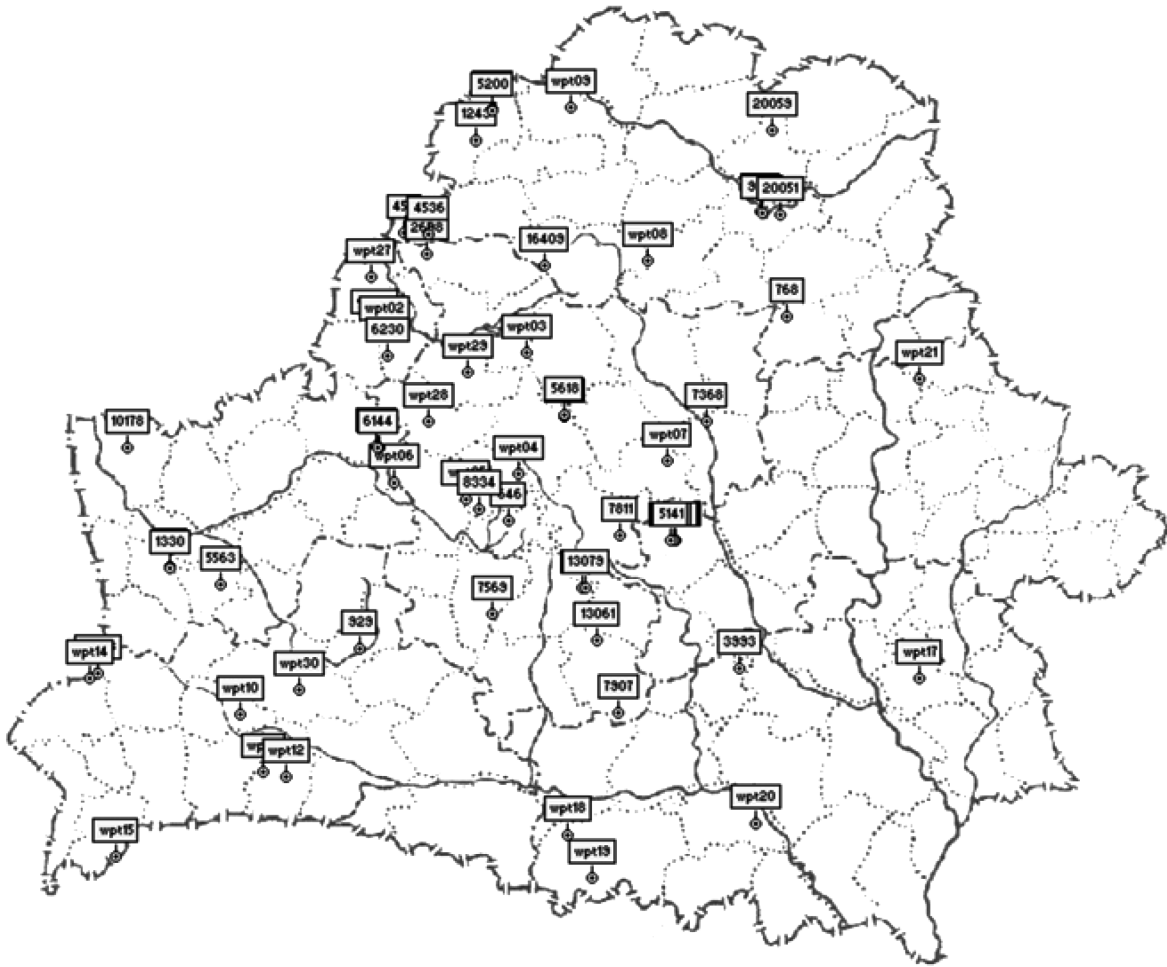


Рис. 1. Местонахождения *N. pennata* в Беларуси (по [9], с дополнениями)

Fig. 1. Locations of *N. pennata* in Belarus (by [9], with additions)

При проведении исследований нами изучена пространственная структура и динамика 6 метапопуляций *N. pennata*: 1) Могилевская область, Осиповичский р-н, Жорновская экспериментальная лесная база, окр. д. Дуброва, 0,9 км к СВ, елово-грабовая дубрава кисличная, площадь размещения деревьев-хозяев 6450 м² (2007–2015) (Жорновка-1); 2) окр. д. Дуброва, 0,9 км к В, кленово-грабовая дубрава, площадь размещения деревьев-хозяев 410 м² (2009–2015) (Жорновка-2); 3) окр. д. Дуброва, 1,3 км к В, кленово-грабовая дубрава, площадь размещения деревьев-хозяев 10 000 м² (2009–2015) (Жорновка-3); 4) окр. д. Дуброва, 0,6 км к В, кленово-грабовая дубрава, площадь размещения деревьев-хозяев 1400 м² (2009–2015) (Жорновка-4); 5) Витебская область, Браславский р-н, окр. д. Милашки, 2,8 км к ЮЗЗ, лес Бельмонт, кленовик березово-осиновоснытевый, площадь размещения деревьев-хозяев 2850 м² (2007–2013) (Бельмонт); 6) Брестская область, Ляховичский р-н, окр. д. Липск, 2,8 км к СЗ, елово-грабовая дубрава кисличная, площадь размещения деревьев-хозяев 24 050 м² (2008–2010) (Ляховичи).

При исследовании метапопуляций *N. pennata* составлялась картосхема расположения деревьев-хозяев, занятых мхом (форофитов [12]), и потенциальных деревьев-хозяев. В качестве подходящих для поселения *N. pennata* рассматривались деревья, у которых диаметр ствола на уровне груди составлял не менее 10 см. Расстояние между деревьями считали расстоянием между локальными популяциями в пределах метапопуляции.

При проведении исследований сбор данных осуществляли с целью построения обобщенной нелинейной модели для расчета вероятности колонизации/вымирания, учитывающей так называемую меру связанности между участками и включающую нелинейные параметры [7]:

$$\text{logit} (C_i) = \sum \beta_m x_{im} + \beta \underbrace{\sum_{j \neq i} p_j \exp \left\{ -\alpha [\ln(d_{ij})]^2 \right\}}_{S_i} Ab_j^\gamma,$$

где биномиальный параметр C_i – вероятность колонизации для i -го дерева; x_{im} – значение m -й локальной переменной, которая, как предполагается, влияет на C_i ; β_m – регрессионный параметр.

Второй член уравнения, произведение связанности S_i и регрессионного параметра β , учитывает отношение между C_i i -го дерева и встречаемостью эпилита на окружающих деревьях (j). Переменная $p_j = 1$, если *N. pennata* встречается на дереве j ; в ином случае $p_j = 0$. Влияние каждого окружающего дерева j , являющегося потенциальным источником колонизации, выражается лог-нормальной функцией расстояния d_{ij} (в метрах) между деревьями i и j . Скорость разрушения участка контролируется показателем α , который можно определить, исходя из полученных данных. Ab_j – относительное покрытие мха на j -м дереве. Степень γ сопоставляет относительное покрытие со скоростью эмиграции.

Для каждого форофита определяли следующие параметры [7]: вид дерева; диаметр ствола (на высоте 1,3 м), см; глубину трещин коры (на высоте 50 см над уровнем земли), мм; живое дерево или мертвое (0 или 1); угол наклона ствола дерева, град.; относительное покрытие мха (локальное обилие), см². Относительное покрытие *N. pennata* на форофите определяли на участке ствола площадью 35×35 см (1225 см²), при этом выбирали участок с максимальным покрытием. Для точного определения локального обилия использовали цифровую фотосъемку с последующей компьютерной обработкой фотографий [11].

Результаты и их обсуждение. Каждая метапопуляция *N. pennata* характеризовалась определенным количеством элементов (локальных популяций). Максимальным оно было в метапопуляции Бельмонт (32 популяции) и Жорновке-1 (26), минимальным – в метапопуляции Жорновка-4 (2 популяции), небольшим – в Жорновке-2 и Жорновке-3 (соответственно 4 и 8 локальных популяций). В метапопуляции Ляховичи насчитывалось 16 локальных популяций.

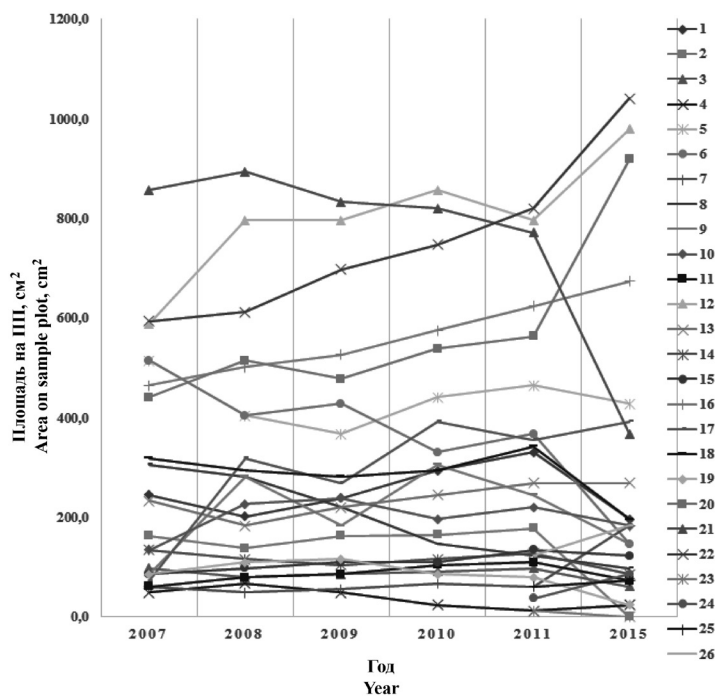


Рис. 2. Динамика изменения проективного покрытия локальных популяций *N. pennata* (номера 1–26) в метапопуляции Жорновка-1

Fig. 2. Dynamics of change of projective cover of local populations of *N. pennata* (numbered 1–26) in the metapopulation Zhornovka-1

В каждой метапопуляции наблюдалось нелинейное годовое изменение площади на отдельных деревьях. Такое изменение площади на пробных площадках в метапопуляции Жорновка-1 показано на рис. 2. Аналогичная картина наблюдалась в других метапопуляциях.

Проведенные исследования динамики показали, что в целом в 2015 г. по сравнению с 2007 г. наблюдалось увеличение площади метапопуляции Жорновка-1 (на 13,9 %, но по сравнению с 2011 г. она сократилась на 5,1 %), по сравнению с 2009 г. – увеличение площади метапопуляций Жорновка-2 (на 32,7 %) и Жорновка-3 (на 3,4 %) и уменьшение метапопуляции Жорновка-4 (на 11,8 %). Площадь метапопуляции Ляховичи сократилась в 2010 г. по сравнению с 2008 г. на 10 %, метапопуляции Бельмонт – увеличилась на 49,8 % в 2013 г. по сравнению с 2007 г. (рис. 3), несмотря на то что здесь в 2008 г. в связи с прокладкой дороги было вырублено 4 дерева (№ 1, 5–7), на которых произрастала *N. pennata*. Увеличение связано с тем, что в 2009 г. здесь было выявлено 5 новых деревьев-хозяев, в 2010 г. – еще 14. В результате количество пробных площадок увеличилось.

Для выявления факторов, влияющих на особенности роста дерновинок мха и изменение площади, нами проведен анализ динамики локальных популяций по видам деревьев, а также в зависимости от диаметра ствола (по классам 10–30, 31–50, 51–70 и свыше 70 см), глубины трещин коры (по классам 0–5, 6–10, 11–15 и свыше 15 мм) и угла наклона деревьев (по классам 0–4, 5–10, 11–20 и свыше 20°).

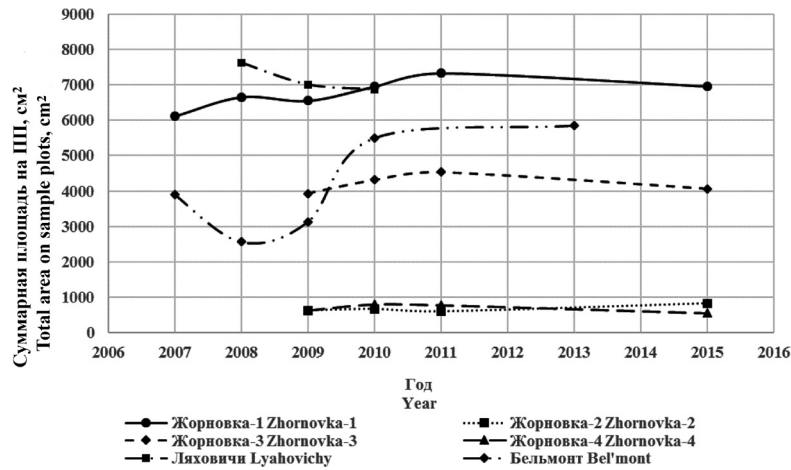


Рис. 3. Динамика изменения покрытия *N. pennata* в метапопуляциях

Fig. 3. Dynamics of change of *N. pennata* cover in the metapopulations

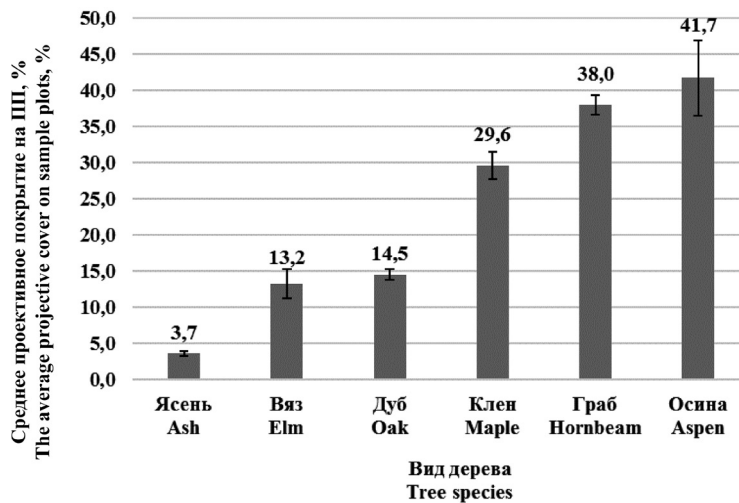


Рис. 4. Зависимость среднего проективного покрытия *N. pennata* от вида дерева

Fig. 4. Dependence of the average projective cover of *N. pennata* on tree species

В исследованных метапопуляциях *N. pennata* встречалась на вязах, грабах, дубах, кленах, осинах, ясенях. Максимальное среднее проективное покрытие (за несколько лет) было характерно для осин и грабов (41,7 и 38,0 %), также велико оно было и у кленов (29,6 %). Меньшие значения наблюдались у вязов (13,2 %) и дубов (14,5 %). Наименьшее среднее проективное покрытие было у ясеней (менее 4 %) (рис. 4).

Изменение проективного покрытия на всех видах деревьев было нелинейным, но по средним показателям за несколько лет наблюдался рост на всех видах деревьев, за исключением кленов в метапопуляциях Жорновка-1, Жорновка-4 и Ляховичи.

Хотя по данным литературы известно, что чем больше диаметр дерева, тем больше обилие *N. pennata* [13], установлено, что по мере увеличения диаметра ствола деревьев проективное покрытие *N. pennata* сначала возрастает, затем снижается (рис. 5, а). Как правило, наибольшее среднее проективное покрытие наблюдалось на стволах, диаметр которых составлял 31–50 см (на основании данных 317 измерений). Исключение составила метапопуляция Жорновка-3, где максимум проективного покрытия приходился на деревья с диаметром стволов более 50 см. Кроме того, в случае отсутствия в метапопуляциях деревьев с диаметром стволов 31–50 см мох преобладал именно на очень крупных деревьях.

Изменение среднего проективного покрытия на всех исследованных деревьях за изученный период имело положительную динамику, причем наибольший прирост наблюдался на более молодых деревьях с небольшим диаметром, а также на самых старых, хоть и в меньшей степени (на основании данных 247 измерений) (рис. 5, б).

Увеличение относительной площади поверхности ствола дерева за счет увеличения глубины трещин коры способствует удержанию влаги и предоставляет более благоприятные условия для роста *N. pennata*, который осуществляется либо за счет радиального роста отдельных дерновинок [14], либо за счет образования новых дерновинок из спор, столонообразных веточек или фрагментов старых дерновинок [15], а следовательно, и увеличения размера локальных популяций. Вместе с тем с увеличением глубины трещин коры возрастает конкуренция со стороны других видов мхов. В связи с этим после достижения глубины трещин коры 10 мм наблюдалось уменьшение проективного покрытия мха (рис. 6, а). Исключение – метапопуляция Ляховичи, где максимальное проективное покрытие было характерно для деревьев с трещинами коры небольшой глубины (0–5 мм).

Установлено, что средний прирост дерновинок *N. pennata* был максимальным на стволах с глубиной трещин коры 0–5 мм и составлял 15,2 % в год, затем после резкого спада он постепенно возрастал и составлял до 9,1 % в год (рис. 6, б).

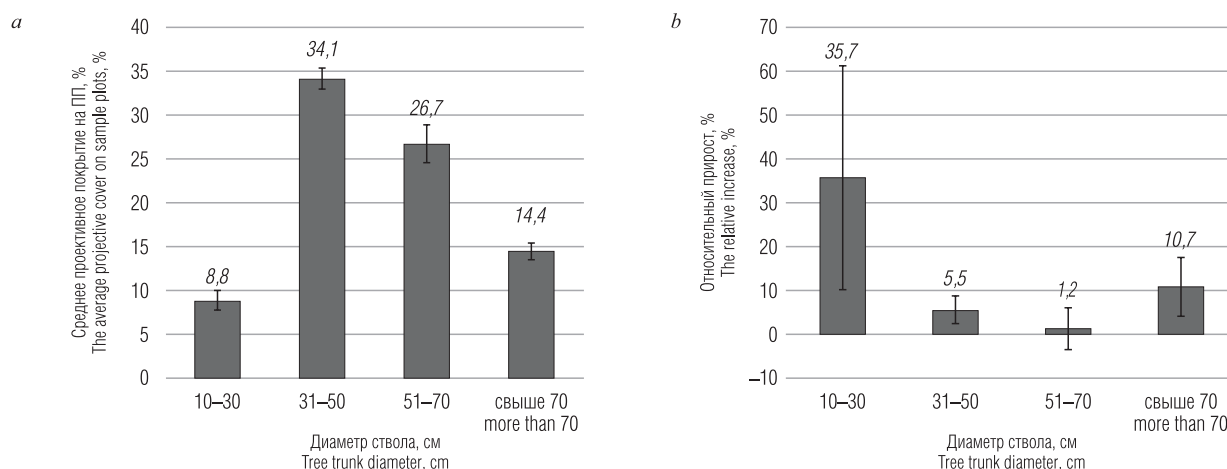


Рис. 5. Зависимость среднего проективного покрытия (а) и среднего относительного годового прироста (б) дерновинок *N. pennata* от диаметра ствола дерева

Fig. 5. Dependence of the average projective cover (a) and the average relative annual increase (b) of bunches of *N. pennata* on tree trunk diameter

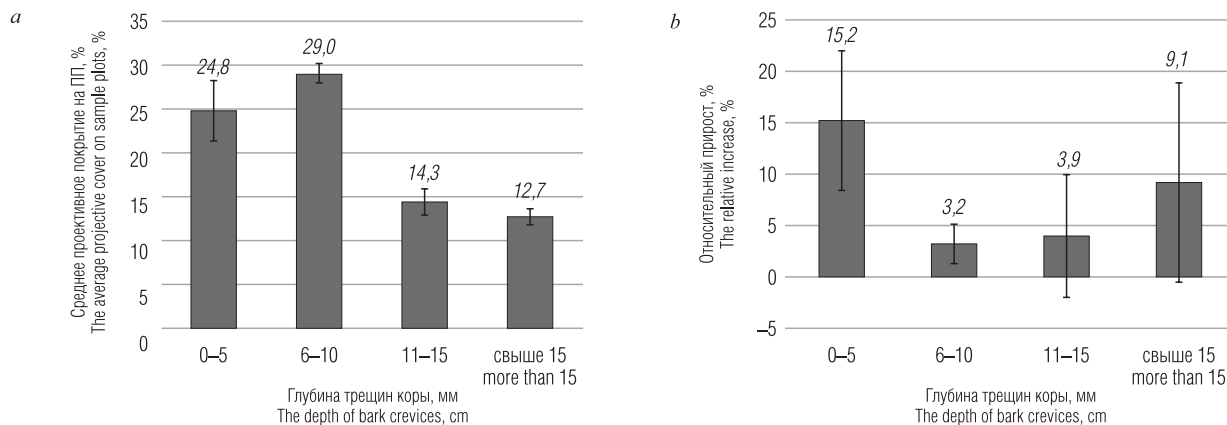


Рис. 6. Зависимость среднего проективного покрытия (a) и среднего относительного годового прироста (b) дерновинок *N. pennata* от глубины трещин коры дерева

Fig. 6. Dependence of the average projective cover (a) and the average relative annual increase (b) of bunches of *N. pennata* on depth of bark tree crevices

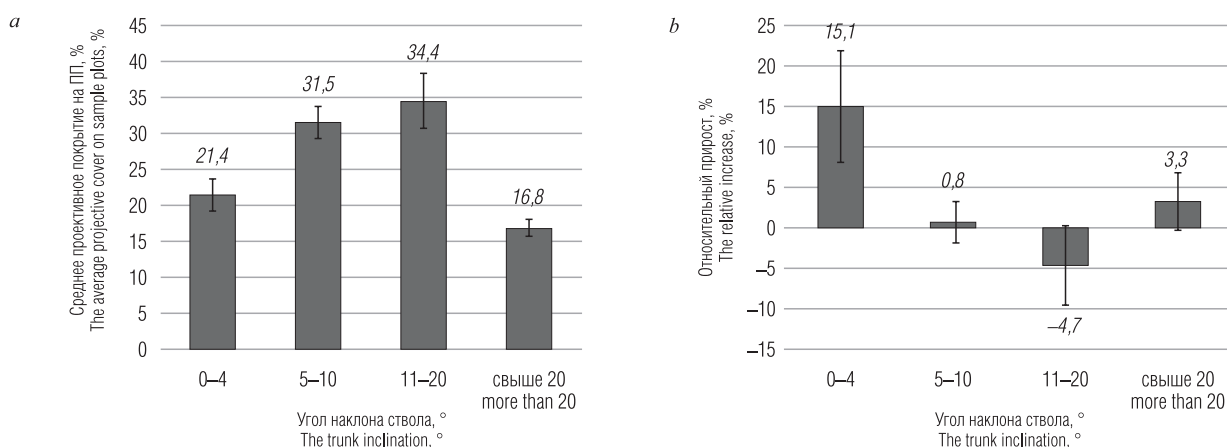


Рис. 7. Зависимость среднего проективного покрытия (a) и среднего относительного годового прироста (b) дерновинок *N. pennata* от угла наклона ствола дерева

Fig. 7. Dependence of the average projective cover (a) and the average relative annual increase (b) of bunches of *N. pennata* on tree trunk inclination

На рис. 7, a показана зависимость проективного покрытия *N. pennata* от угла наклона ствола дерева, указывающая на совмещение двух процессов. С одной стороны, наклонные деревья из-за большей влагообеспеченности способствовали росту *N. pennata*, но вместе с тем в этих условиях лучше развивались и другие мхи (*Hypnum cupressiforme* Hedw., *Anomodon* Hook et Tayl. spp., *Amblystegium* Schimp. in B. S. G. spp., *Homalia trichomanoides* (Hedw.) Bruch et Schimp. in B. S. G.), которые, как показал сравнительный анализ фотографий пробных площадок, на определенном этапе (при угле наклона более 20°), начинали подавлять *N. pennata*.

Максимум среднего прироста дерновинок *N. pennata* приходился на деревья с наименьшим углом наклона (либо без него). Для деревьев с углом наклона от 11 до 20° в среднем характерно даже сокращение проективного покрытия со временем, хотя у деревьев с углом наклона более 20° также наблюдалась положительная динамика (рис. 7, b).

Анализ зависимости среднего проективного покрытия и среднего относительного годового прироста дерновинок *N. pennata* от характеристик субстрата позволил определить наиболее оптимальные для развития локальных популяций и метапопуляций условия. При этом характеристики, при которых наблюдались максимальное покрытие мха и максимальная скорость роста, не всегда совпадали (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. **Оптимальные характеристики деревьев-хозяев для развития и роста локальных популяций *N. pennata***

Table 1. **The optimal characteristics of host trees for the development and growth of local populations of *N. pennata***

Параметр дерева-хозяина	Максимальное проективное покрытие	Максимальный рост (положительная динамика)
Вид дерева	Граб, осина, клен	Граб, осина, ясень, дуб, вяз
Диаметр ствола, см	31–50	10–30
Глубина трещин коры, мм	1–10	1–5
Угол наклона, град.	5–20	0–4

Таким образом, максимальное покрытие мха характерно для тех метапопуляций, где большинство деревьев имело диаметр стволов 31–50 см, глубину трещин коры 1–10 мм, угол наклона стволов 5–20°, т. е. это были достаточно старовозрастные леса, но не самые старые.

В то же время наибольший прирост метапопуляций характерен для более молодых насаждений, диаметр стволов которых составлял в среднем 10–30 см, глубина трещин коры – 1–5 мм, угол наклона стволов – до 4°.

Прогноз развития каждой метапопуляции может быть сделан на основе определения среднего значения отношения количества деревьев-хозяев с оптимальными характеристиками к общему количеству деревьев-хозяев, которое может быть выражено через коэффициент оптимальности (табл. 2). Большее значение коэффициента оптимальности для роста (более 0,4) свидетельствует о вероятном увеличении площади локальных популяций и метапопуляций в целом. Высокий коэффициент оптимальности для проективного покрытия (более 0,5) говорит о наличии достаточного количества подходящих мест, но при этом метапопуляция с высокой вероятностью уже достигла максимума своего развития и может либо оставаться в стабильном состоянии, либо сокращаться.

Т а б л и ц а 2. **Коэффициенты оптимальности субстрата в исследованных метапопуляциях *N. pennata***

Table 2. **The coefficients of optimality of substrate in the studied metapopulations of *N. pennata***

Метапопуляция	Коэффициент оптимальности для проективного покрытия	Коэффициент оптимальности для роста	Результаты наблюдений с первого по последний год	Прогноз
Жорновка-4	0,50	0,25	–11,8 %	Сокращение
Жорновка-1	0,51	0,36	+13,9 % (–5,1 % в 2015 г. по сравнению с 2011 г.)	Сокращение
Ляховичи	0,75	0,38	–10 %	Сокращение
Жорновка-3	0,66	0,41	+3,4 %	Колебания (более-менее стабильно)
Бельмонт	0,27	0,45	+49,8 %	Рост
Жорновка-2	0,31	0,69	+32,7 %	Рост

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что для благоприятного прогноза развития метапопуляции важны не столько оптимальные условия для обеспечения максимального проективного покрытия, сколько оптимальные условия для ее роста.

В то же время на динамику и устойчивость локальных популяций оказывают влияние не только параметры деревьев-хозяев, но и исходное значение проективного покрытия, а также мера связанности данной популяции с соседними в пределах метапопуляции. Наличие связей повышает устойчивость как отдельной популяции, так и метапопуляции в целом.

Для определения меры связанности использовали формулу [7, с изменениями]:

$$C_i = \sum_{i \neq j} \exp \left\{ -\alpha \left[\ln(d_{ij}) \right]^2 \right\} A b_j,$$

где C_i – мера связанности для i -го дерева; d_{ij} – расстояние между деревьями i и j , м; $A b_j$ – проективное покрытие мха на j -м дереве на площадке 35×35 см, %; α – параметр, отражающий скорость разрушения участка, принимаемый за 0,1.

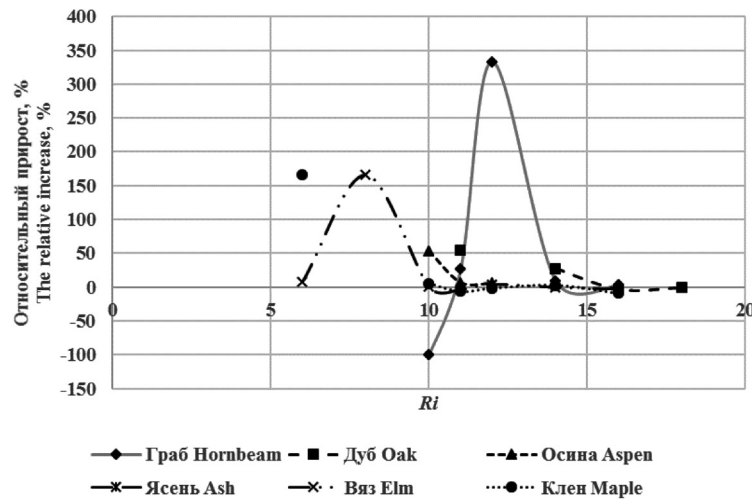


Рис. 8. Зависимость относительного годового прироста *N. pennata* от R_i
 Fig. 8. Dependence of the relative annual increase of *N. pennata* on R_i

Для оценки устойчивости популяций и их динамики с целью учета влияния всех вышеперечисленных параметров в комплексе можно использовать значение натурального логарифма их произведения – показатель зависимости среднего годового прироста от параметров деревьев-хозяев, обилия и меры связанности:

$$R_i = \ln\left(\prod x_{im} Ab_i C_i\right),$$

где R_i – показатель зависимости прироста от параметров деревьев-хозяев, обилия и меры связанности для *N. pennata* на i -м дереве; x_{im} – значение m -й локальной переменной, которая, как предполагается, влияет на R_i ; Ab_i – проективное покрытие мха на i -м дереве на площадке 35×35 см, %; C_i – мера связанности для i -го дерева.

В результате выявлена нелинейная зависимость среднего относительного годового прироста от R_i по отдельным видам деревьев (рис. 8). Вначале, по мере увеличения показателя, скорость роста популяции повышается, но после определенного значения (10 – для клена и вяза, 11 – для осины, 14 – для граба и дуба) происходит ее снижение, наблюдаются лишь устойчивые колебания проективного покрытия с небольшим сокращением.

Таким образом, при определенных значениях параметров на начальных этапах развития популяция растет с достаточно большой скоростью. В то же время при достижении ею определенных размеров интенсивный рост прекращается и она переходит в состояние баланса (колебание параметров – поочередный рост и сокращение). Важным является то, чтобы при таких колебаниях в момент сокращения популяция не перешла в состояние необратимого уменьшения.

В соответствии с рис. 8 каждой локальной популяции в составе метапопуляций присваивался балл состояния (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Шкала оценки устойчивости популяций *N. pennata*

T a b l e 3. The scale of assessment of stability of populations of *N. pennata*

Вид дерева	Значение R_i	Тенденция динамики	Балл состояния
Граб, дуб	Менее 11	Сокращение	1
	11–14	Рост	3
	Более 14	Флуктуации	2
Осина	Менее 7	Сокращение	1
	7–11	Рост	3
	Более 11	Флуктуации	2
Вяз, клен, ясень	Менее 6	Сокращение	1
	6–10	Рост	3
	Более 10	Флуктуации	2

На основании данной шкалы для каждой метапопуляции определен средний балл состояния (табл. 4).

Коэффициент корреляции между средним баллом состояния и предложенным ранее коэффициентом оптимальности для роста равен 0,94, что свидетельствует о сопоставимости данных параметров оценки состояния.

Т а б л и ц а 4. Средний балл состояния метапопуляций *N. pennata*

Table 4. The average point of state of metapopulations of *N. pennata*

Метапопуляция	Средний балл состояния	Коэффициент оптимальности для роста	Результаты наблюдений с первого по последний год, %	Прогноз
Жорновка-4	2,00	0,25	-11,8	Сокращение
Жорновка-1	2,08	0,36	-5,1	Сокращение
Ляховичи	2,06	0,38	-10	Сокращение
Жорновка-3	2,13	0,41	3,4	Колебания (более-менее стабильное состояние)
Бельмонт	2,33	0,45	49,8	Рост
Жорновка-2	2,50	0,69	32,7	Рост

Таким образом, при значениях среднего балла состояния до 2,1 наблюдается сокращение метапопуляции, при значениях 2,1–2,3 – колебания (метапопуляция как система находится в состоянии устойчивого равновесия), при значениях более 2,3 – рост.

В целом полученные результаты подтверждают гипотезу о специфике развития метапопуляций *N. pennata*, выдвинутую нами ранее [11]: их развитие начинается с заноса спор в старовозрастных широколиственных и елово-широколиственных лесах (в типично неморальных условиях) на стволы широколиственных деревьев при достижении ими определенного возраста (50–60 лет). Образуется центральное ядро метапопуляции, и *N. pennata* затем начинает радиально распространяться на другие деревья, а при повышенной плотности спор она может поселиться уже на более молодых деревьях (как в метапопуляции Бельмонт), осваивая иногда другие породы (например, ясень). По мере развития популяции при усилении конкуренции со стороны других эпифитов происходит угнетение центрального ядра (а иногда и его отмирание за счет усиления конкуренции с другими видами мхов), а развитие метапопуляции осуществляется на более молодых периферических деревьях.

Можно предположить, что в пределах территории Жорновской экспериментальной лесной базы метапопуляция Жорновка-1 является самой возрастной. В настоящее время наблюдается ее постепенная деградация (особенно ядра) и сокращение проективного покрытия *N. pennata* на пробных площадках за счет изменения свойств субстрата и возрастающей конкуренции со стороны других видов мхов. Кроме того, основным дестабилизирующим фактором является значительный уровень антропогенной нагрузки. В то же время наличие достаточно большого количества деревьев-хозяев и большая исходная площадь будут способствовать тому, что в ближайшее время метапопуляция сохранится, но долгосрочный прогноз может быть более негативным. Метапопуляция Жорновка-3 тоже довольно возрастная, но ее расположение в глубине массива позволяет избегать интенсивной антропогенной нагрузки, в связи с чем она будет находиться в стабильном состоянии. Метапопуляции Жорновка-2 и Жорновка-4 – более молодые, и процессы, происходящие в них, зависят от наличия благоприятных (оптимальных) для роста и развития условий (вид дерева и его характеристики, отсутствие или не сильно выраженная конкуренция с другими видами мхов). Если в метапопуляции Жорновка-4 сокращение будет продолжаться с такой же интенсивностью, возможно ее исчезновение. В метапопуляции Жорновка-2 может происходить разрастание дерновинок на новых деревьях.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить факторы, влияющие на рост и динамику *N. pennata*, и сделать прогноз развития изученных популяций на ближайшие 2 года (рис. 9). К 2017 г. в метапопуляции Жорновка-1, испытывающей максимальную антропогенную нагрузку, прогнозируется продолжение сокращения суммарной площади локальных популяций

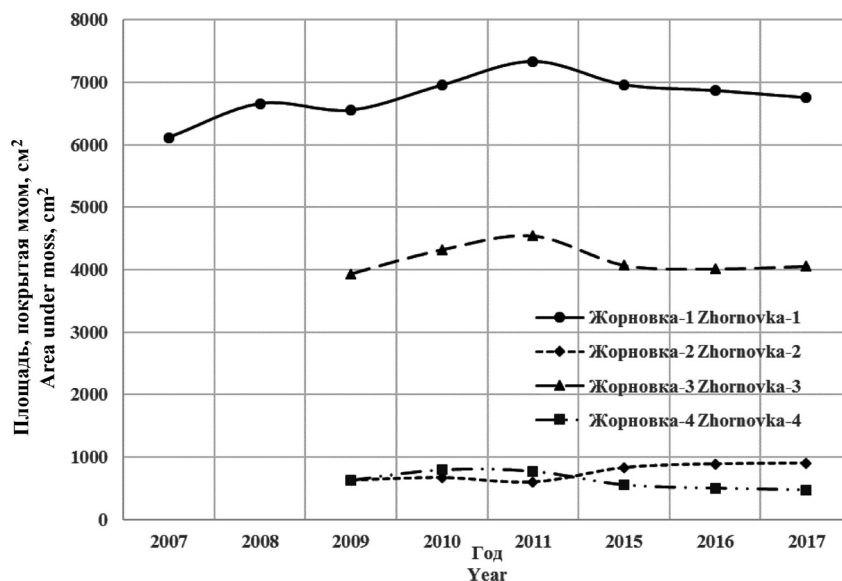


Рис. 9. Динамика и прогноз изменения площади локальных популяций *N. pennata* в исследуемых метапопуляциях

Fig. 9. Dynamics and prognosis of change of area of local populations of *N. pennata* in the studied metapopulations

с определенными флуктуациями по годам (до 6750 см²). Также ожидается сокращение метапопуляции Жорновка-4 (до 470 см²). Количество деревьев-хозяев в ней минимально, и площадь *N. pennata* на них за последние 4 года уменьшилась. Вероятно, будет наблюдаться рост в метапопуляции Жорновка-2 (до 900 см²), в основном за счет освоения новых деревьев и разрастания дерновинок на старых, а суммарная площадь локальных популяций в метапопуляции Жорновка-3 будет оставаться более-менее стабильной и лишь немного колебаться по годам (до 4050 см² к 2017 г.) (рис. 9). Рост будет происходить в основном за счет разрастания дерновинок на уже освоенных данным мхом деревьях, а также за счет освоения новых.

Заключение. Результаты исследования динамики 6 метапопуляций *N. pennata* показали, что она носит нелинейный характер. При этом в различные годы наблюдается как увеличение площади одних метапопуляций (Жорновка-1, Жорновка-2 и Жорновка-3, Бельмонт), так и сокращение других (Жорновка-4 и Ляховичи).

Определено, что максимальное среднее (за несколько лет) проективное покрытие мха характерно для осин, грабов и кленов, меньшие значения – у вязов и дубов, минимальные – у ясеней. Подтверждено влияние на относительное покрытие мха таких параметров, как диаметр ствола, угол наклона деревьев, глубина трещин коры. Выявлены оптимальные значения данных параметров для роста *N. pennata*.

На основании полученных результатов о максимальных значениях проективного покрытия мха и годового прироста на пробных площадках в зависимости от характеристик деревьев-хозяев предложены коэффициенты оптимальности для каждой метапопуляции, которые позволяют количественно прогнозировать развитие последних.

Так как помимо локальных условий динамика метапопуляций определяется исходными значениями обилия мха, а также связанностью ее элементов, предложен показатель зависимости прироста от параметров деревьев-хозяев, обилия и меры связанности – R_i . Выявлена нелинейная зависимость среднего относительного годового прироста от R_i по отдельным видам деревьев. В зависимости от значения R_i каждой локальной популяции присваивается балл состояния. Исходя из оценки среднего состояния метапопуляции, дан прогноз ее развития.

Проведенные исследования подтвердили выдвинутую нами гипотезу о характере функционирования метапопуляций *N. pennata* [11] и позволили сделать более точный прогноз развития метапопуляций *N. pennata* на ближайшие два года.

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б15М-098).

Acknowledgement

This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant Б15М-098).

Список использованных источников

1. Заугольнова, Л. Б. Подходы к оценке состояния ценопопуляций растений / Л. Б. Заугольнова, Л. В. Денисова, С. В. Никитина // Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биол. – 1993. – Т. 98, вып. 5. – С. 100–108.
2. Злобин, Ю. А. Принципы и методы изучения ценоотических популяций растений: учеб.-метод. пособие / Ю. А. Злобин. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1989. – 147 с.
3. Мониторинг фитопопуляций / Л. Б. Заугольнова [и др.] // Успехи соврем. биол. – 1993. – Т. 113, № 4. – С. 402–414.
4. Программа и методические подходы к популяционному мониторингу растений / Л. А. Жукова [и др.] // Биол. науки. – 1989. – № 12. – С. 65–75.
5. Snäll, T. Distribution patterns and metapopulation dynamics of epiphytic mosses and lichens / T. Snäll. – Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. – 36 pp.
6. Hanski, I. Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations / I. Hanski, O. Gaggiotti. – London: Academic Press, 2004. – 696 p.
7. Snäll, T. Colonization-extinction dynamics of an epiphyte metapopulation in a dynamic landscape / T. Snäll, J. Ehrlén, H. Rydin // Ecology. – 2005. – N 86. – P. 106–115.
8. Ключевые ботанические территории Беларуси / О. М. Масловский [и др.]. – М.; Минск: Аль-Пак, 2005. – 80 с.
9. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / М-во природ. ресурсов и охраны окружающей среды Респ. Беларусь, Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: И. М. Качановский [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. – 445 с.
10. Hodgetts, N. G. Checklist and country status of European bryophytes – towards a new Red List for Europe / N. G. Hodgetts, Neil Lockhart // Irish Wildlife Manuals. – 2015. – N 84. – P. 1–125.
11. Шевкунова, А. В. Динамика метапопуляций охраняемого в Европе мха *Neckera pennata* Hedw. в Беларуси / А. В. Шевкунова, О. М. Масловский // Ботаника (исследования): сб. науч. тр. / Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск, 2009. – Вып. 37. – С. 293–308.
12. Работнов, Т. А. Фитоценология: учеб. пособие для вузов / Т. А. Работнов. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 352 с.
13. Spatial genetic structure in two congeneric epiphytes with different dispersal strategies analyzed with three different methods / T. Snäll [et al.] // Mol. Ecol. – 2004. – N 13. – P. 2109–2119.
14. Wiklund, K. Colony expansion of *Neckera pennata*: modelled growth rate and effect of microhabitat, competition and precipitation / K. Wiklund, H. Rydin // Bryologist. – 2004. – N 107. – P. 293–301.
15. Appelgren, L. Genetic and morphological variation in the rare epiphytic moss *Neckera pennata* Hedw. / L. Appelgren, N. Cronberg // J. of Bryol. – 1999. – N 21. – P. 97–107.

References

1. Zaugolnova L. B., Denisova L. V., Nikitina S. V. Approaches to the assessment of the state of cenopopulations of plants. *Bulleten' Moskovskogo obshchestva ispytatelej prirody. Otdel biologicheskij* [Bulletin of Moscow society of naturalists. Biological department], 1993, vol. 98, no. 5, pp. 100–108. (in Russian).
2. Zlobin Yu. A. *Printsipy i metody izucheniya tsenoticheskikh populyatsij rastenij: ucheb.-metod. posobiye* [Principles and methods of study of coenotic populations of plants: guidance manual]. Kazan, Publ. of Kazan University, 1989. 147 p. (in Russian).
3. Zaugolnova L. B., Smirnova O. V., Komarov A. S., Hanina P. G. Monitoring of phytopopulations. *Uspehi sovremennoj biologii* [Progress of modern biology], 1993, vol. 113, no. 4, pp. 402–414. (in Russian).
4. Zhukova L. A., Zaugolnova L. B., Michurin V. G., Onipchenko V. G., Toropova N. A., Chistyakova A. A. Programme and technical approaches to the population monitoring of plants. *Biologicheskije nauki* [Biological sciences], 1989, no. 12, pp. 65–75. (in Russian).
5. Snäll T. Distribution patterns and metapopulation dynamics of epiphytic mosses and lichens. Uppsala, Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. 36 p.
6. Hanski I., Gaggiotti O. Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations. London, Academic Press, 2004. 696 p.
7. Snäll T., Ehrlén J., Rydin H. Colonization-extinction dynamics of an epiphyte metapopulation in a dynamic landscape. *Ecology*, 2005, no. 86, pp. 106–115.
8. Maslovsky O., Pronkina G., Parfenov V., Pugachevsky A., Tretjakov D., Gapienko O., Savchenko V., Sobolevskaya T., Golod D., Yaroshevich E., Stepanovich I., Rodionov P. *Kluhevye botanicheskiye territorii Belarusi* [Important plant areas in Belarus]. Moscow, Minsk, Al'-Pak, 2005, 80 p. (in Russian).
9. *Krasnaya kniga Respubliki Belarus. Rasteniya: redkie i nahodyashchiesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy dikoras-tushchih rastenij* [The Red book of the Republic of Belarus. Plants: the rare and threatened wild plant species], in Kachanovsky I. M. (ed.). Minsk, Belarusian Encyclopedia named after P. Brovki, 2015. 445 p. (in Russian).

10. Hodgetts N. G., Neil Lockhart. Checklist and country status of European bryophytes – towards a new Red List for Europe. *Irish Wildlife Manuals*, 2015, no. 84, pp. 1–125.

11. Shevkunova A. V., Maslovsky O. M. *Dinamika metapopulyatsij ohranyaemogo v Evrope mha Neckera pennata Hedw. v Belarusi* [Metapopulation dynamics of the European protected bryophyta species *Neckera pennata* Hedw. in Belarus]. *Botanika (issledovaniya)* [Botany (investigations)], 2009, vol. 37, pp. 293–308. (in Russian).

12. Rabotnov T. A. *Phytocenology: tutorial for institutes of higher education*. Moskva, MSU Publ., 1992, 352 p. (in Russian).

13. Snäll T., Fogelqvist J., Ribeiro P. J. Jr., Lascoux M. Spatial genetic structure in two congeneric epiphytes with different dispersal strategies analyzed with three different methods. *Molecular Ecology*, 2004, no. 13, pp. 2109–2119.

14. Wiklund K., Rydin H. Colony expansion of *Neckera pennata*: modelled growth rate and effect of microhabitat, competition and precipitation. *Bryologist*, 2004, no. 107, pp. 293–301.

15. Appelgren L., Cronberg N. Genetic and morphological variation in the rare epiphytic moss *Neckera pennata* Hedw. *Journal of Bryology*, 1999, no. 21, pp. 97–107.

Информация об авторах

Левкович Анастасия Владимировна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.shevkunova@mail.ru.

Масловский Олег Мечиславович – канд. биол. наук, зав. сектором. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oleg.maslovsky@tut.by.

Information about the authors

Levkovich Anastasia Vladimirovna – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.shevkunova@mail.ru.

Maslovsky Oleg Mechislavovich – Ph. D. (Biol.), Head of the Department. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oleg.maslovsky@tut.by.

Для цитирования

Левкович, А. В. Динамика и прогноз развития метопуляций мха *Neckera pennata* в Беларуси / А. В. Левкович, О. М. Масловский // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 14–26.

For citation

Levkovich A. V., Maslovsky O. M. Metapopulation dynamics and prognosis of development of the moss *Neckera pennata* in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 14–26.

Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик*Институт плодводства, аг. Самохваловичи, Республика Беларусь***МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТА ВИРУСА
КРАСНОЙ КОЛЬЦЕВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ГОЛУБИКИ**

Вирус красной кольцевой пятнистости голубики (BRRV) является одним из вредоносных вирусов брусничных культур и, в соответствии с нормативными документами Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO), подлежит контролю и не допускается при производстве сертифицированного посадочного материала *Vaccinium* spp. Отсутствие данных о белорусских изолятах BRRV определило необходимость проведения детального анализа данного вируса с использованием PCR-диагностики, секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей вируса.

В результате впервые охарактеризован на молекулярном уровне изолят BRRV из Беларуси (BRRV-BY1). В ходе работы амплифицирован и секвенирован фрагмент гена активатора транскрипции вируса. Полученная нуклеотидная последовательность помещена в международную базу данных (EMBL/GenBank), где ей присвоен идентификационный номер LN998983. Филогенетический анализ последовательностей участка генома BRRV показал, что белорусский изолят наиболее родственен изолятам вируса из США. Корреляции между кластерированием изолятов и их географическим происхождением не обнаружено.

Ключевые слова: вирус красной кольцевой пятнистости голубики, PCR, ген активатора транскрипции, изолят, филогенетический анализ, Беларусь.

T. N. Bazhydai, N. V. Kukharchyk*Institute for Fruit Growing, Samohvalovichi, Republic of Belarus***MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BLUEBERRY RED RINGSPOT VIRUS ISOLATE**

The fragment of BRRV isolate from Belarus (BRRV-BY1) was sequenced for the first time and nucleotide sequence of this isolate was deposited in GenBank with the accession No. LN998983. Sequence analysis revealed that the Belarusian isolate shared 94.1–99.3 % identity with 18 isolates of the virus available in GenBank. BRRV isolate from Belarus was mostly closely related to those from the USA (accession Nos JF917083 and JF917082) as they shared 99.3 % nucleotide identity. Phylogenetic analysis showed that clustering of investigated isolates didn't depend on their geographical origin.

Keywords: Blueberry red ringspot virus, PCR, transcriptional activator gene, isolate, phylogenetic analysis, Belarus.

Введение. Вирус красной кольцевой пятнистости голубики (*Blueberry red ringspot virus*, BRRV) до 2002 г. относили к роду *Caulimovirus*, затем он был реклассифицирован и отнесен к роду *Soymovirus* (сем. *Caulimoviridae*) [1]. Частицы изометрические, около 42–46 нм в диаметре. Геном вируса представлен в виде двухцепочечной ДНК, состоящей из 8265 п. н. [2].

Симптомы заболевания появляются в конце лета на побегах и на адаксиальной стороне листьев (иногда на плодах) в виде красных колец или пятен от 2 до 6 мм в диаметре, осенний вид листья приобретают на несколько недель раньше, чем у здоровых растений [3, 4]. Отмечается снижение урожайности (согласно литературным данным, в Мичигане потеря урожая составила 25 %) [4, 5].

Предполагаемые векторы переноса – мучнистые червцы (*Dysmicoccus* spp.) [5, 6].

Поражаемые виды – *Vaccinium corymbosum* L., *V. australe* Small., *V. ashei* J. M. Reade [3, 6].

Подобному заболеванию подвергались также растения клюквы крупноплодной (*V. macrocarpon* Ait.): в период плодоношения отмечались белесые кольца на деформированных плодах, осенью – зеленые кольца на краснеющих листьях [3].

Основным методом диагностики данного ДНК-содержащего вируса *Vaccinium* spp. в настоящее время является полимеразная цепная реакция (PCR) [3–5, 7, 8]. Для BRRV были разработаны

антитела [3], однако использование серологических методов для диагностики данного вируса оказалось ненадежным [5].

Впервые о присутствии BRRV в растениях голубики сообщалось в США, а в настоящее время данное заболевание зарегистрировано и на территории Европы (Польша, Италия, Чехия, Словения) [8–11]. В соответствии с нормативными документами Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO) BRRV подлежит контролю и не допускается при производстве сертифицированного посадочного материала *Vaccinium* spp. [12].

Знание о локализации консервативных и вариабельных областей внутри вирусного генома является важным для диагностики вируса и разработки современных методов контроля вирусной инфекции.

Цель работы – установить нуклеотидную последовательность фрагмента гена активатора транскрипции вируса красной кольцевой пятнистости голубики, выделенного из голубики высококорослой в Беларуси, и сравнить полученные результаты с ранее опубликованными данными о последовательностях исследуемого вируса.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства». Материалом для исследований служили листья голубики сорта *Bluetta* с характерными симптомами BRRV. Наличие вируса в растительной ткани определяли методом PCR.

Для выделения ДНК использовали коммерческий набор NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Германия).

Растительный материал (50 мг) растирали пестиком в ступке с жидким азотом до получения пудры. К измельченному материалу добавляли 400 мкл лизирующего буфера (PL1), 10 мкл RNase A и продолжали растирать. Затем добавляли еще 100 мкл буфера PL1, растирали, после чего смесь переносили в 2-миллилитровые микроцентрифужные пробирки, интенсивно перемешивали при помощи Vortexer (Bio-Rad, США) и инкубировали 10 мин при 65 °С. Для удаления остатков нелизированных клеток лизат переносили на фильтрационные колонки (в 2-миллилитровых микроцентрифужных пробирках) и центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин. К очищенному лизату добавляли 450 мкл буфера РС, интенсивно перемешивали при помощи Vortexer (Bio-Rad, США). Затем смесь переносили на поверхность связывающих колонок (в 2-миллилитровых микроцентрифужных пробирках) и центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин для связывания ДНК. Далее осуществляли трехкратное промывание мембраны связывающих колонок: 1) добавляли 400 мкл буфера PW1, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин; 2) добавляли 700 мкл буфера PW2, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин; 3) добавляли 200 мкл буфера PW2, центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин. Дополнительный этап центрифугирования (1 мин при 10 000 об/мин) использовали для удаления остатков промывающего раствора с мембран колонок. Элюирование ДНК проводили путем добавления 50 мкл буфера РЕ (разогретого до 65 °С), инкубирования при 65 °С в течение 5 мин и центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 1 мин.

Для проведения PCR использовали реакционные компоненты Thermo Scientific (Литва). Реакционная смесь объемом 12,5 мкл содержала milliQ воду, 1,25 мкл 10×Taq-буфера, 0,75 мкл MgCl₂ (25 мМ), 0,25 мкл смеси dNTP (10 мМ), по 0,25 мкл каждого праймера (RRSV3 – ATCAGTCCCAGAAGAAAAGAAGTA, RRSV4 – TCCGAAAAATAGATAGTGTTCAGC [5]), 0,125 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 0,5 мкл ДНК-матрицы.

PCR проводили на амплификаторе iCycler® 3.032 (Bio-Rad, США) при следующих заданных параметрах: 1 цикл: при 95 °С – 4 мин; 35 циклов: при 95 °С – 30 с, при 57 °С – 45 с, при 72 °С – 45 с; 1 цикл: при 72 °С – 5 мин. Размер ожидаемого PCR продукта – 549 п. н.

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле и 1×TAE-буфере (Bio-Rad, США). Результаты электрофореза документировали с помощью аппаратного обеспечения Gel Doc™ EQ System (Bio-Rad, США) и пакета программ Quantity One® (Bio-Rad, США).

Амплифицированные фрагменты вирусных геномов передавали для секвенирования в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси». Анализы по определению нуклеотидных последовательностей методом секвенирования проводили на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программного пакета MEGA 6.0, множественное выравнивание последовательностей – при помощи Clustal W алгоритма. Филогенетические деревья были построены методом Neighbour-Joining. Цифрами обозначены достоверности (в процентах) расхождения ветвей, выявленные бутстреп (bootstrap) анализом (1000 псевдореплик), который позволяет оценить статистическую надежность каждого из узлов построенного дерева. В случае бутстреп-поддержки ниже 70 % статистическая надежность данного узла считалась недостоверной. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее пяти заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований амплифицирован фрагмент (549 п. н.) гена активатора транскрипции BRRV из голубики сорта Bluetta (рис. 1). После секвенирования (в прямом направлении) получены данные о нуклеотидной последовательности участка генома белорусского изолята BRRV (BRRV-BY1). Нуклеотидная последовательность была помещена в международную базу данных (EMBL/GenBank) с присвоением идентификационного номера LN998983.

Анализ последовательностей гена активатора транскрипции BRRV проведен с использованием полученной нами и депонированных в GenBank базе данных последовательностей BRRV (см. таблицу).

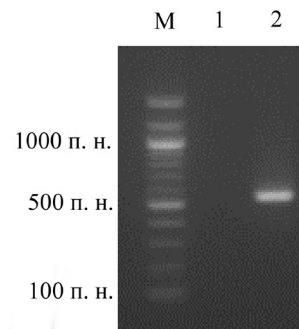


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации при PCR-диагностике BRRV с праймерами RRSV3/RRSV4: М – маркер 100 bp DNA Ladder (BioLabs, США); 1 – отрицательный контроль; 2 – ДНК из листьев голубики сорта Bluetta

Fig. 1. Agarose gel analysis of BRRV amplicon obtained by PCR with the primer set RRSV3/RRSV4: M – 100 bp DNA Ladder (BioLabs, USA); 1 – negative control; 2 – DNA from leaves of blueberry cv. Bluetta

Изоляты BRRV, нуклеотидные последовательности которых использованы для филогенетического анализа

Nucleotide sequences of BRRV isolates used for phylogenetic analysis

Изолят вируса	Растение, из которого выделен изолят	Страна происхождения	Номер в GenBank
BRRV-BY1	<i>Vaccinium corymbosum</i> (Bluetta)	Беларусь	LN998983
UF1583	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Scintilla)	США	JF917083
UF1585	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917082
UF1586	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917085
UF1584	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917084.1
UF1587	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917081
BRRV	<i>V. corymbosum</i> (Coville, Blueray)	США	AF404509
Darrow 5	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Чехия	HM159264
Coville 546	<i>V. corymbosum</i> (Coville)	Словения	JF421559
BRRSV24	<i>V. corymbosum</i> (Herbert)	Польша	JN205460
BRRSV03	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303673
BRRSV22	<i>V. corymbosum</i> (Herbert)	Польша	JF303681
BRRSV20	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303679
BRRSV13	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303675
BRRSV24	<i>V. corymbosum</i> (Herbert)	Польша	JF303682
BRRSV16	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303677
BRRSV15	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303676
BRRSV21	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303680
BRRSV12	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303674

Сравнение нуклеотидной последовательности выделенного нами изолята с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank, показало, что изоляты имели высокий уровень идентичности (94,1–99,3 %).

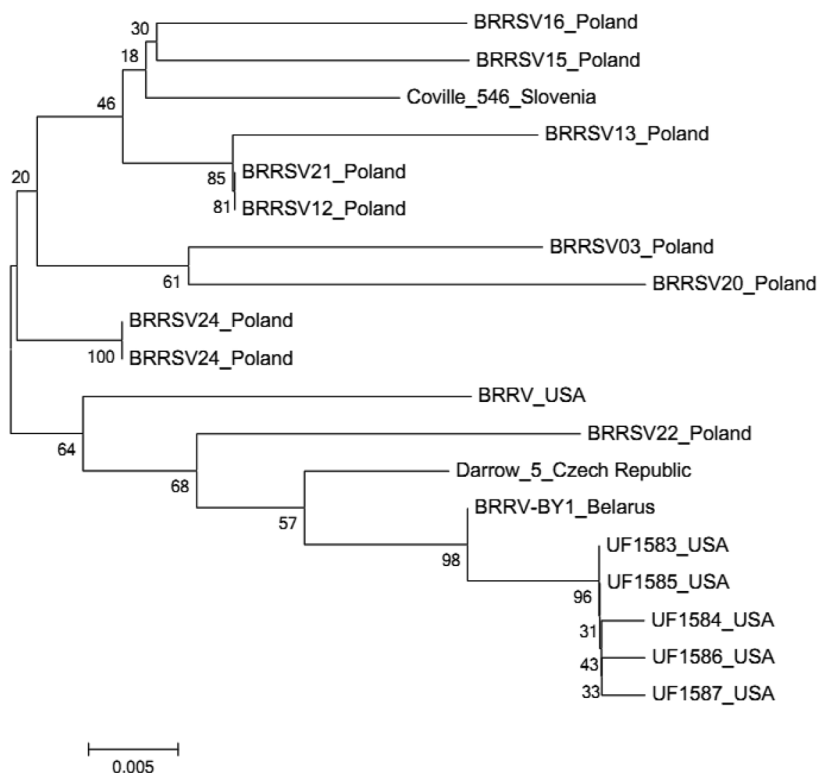


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей участка генома BRRV различных изолятов

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed using the Neighbour-Joining algorithm based on comparison of nucleotide sequences of portion of the genome BRRV isolates

Наиболее генетически близкими к белорусскому изоляту были американские изоляты, выделенные из сортов южной высокорослой голубики Star и Scintilla (GenBank, № JF917083, JF917082), показавшие 99,3 % идентичности и отличающиеся от изолята из Беларуси 3 нуклеотидными заменами из 416 нуклеотидов анализируемой последовательности. Наиболее генетически далеким от белорусского изолята был польский изолят вируса, выделенный из сорта голубики Darrow (GenBank, № JF303679), показавший 94,1 % идентичности и отличающийся от изолята из Беларуси 24 нуклеотидами.

Сравнение аминокислотных последовательностей показало высокий уровень консервативности гена, кодирующего активатор транскрипции вируса. Наибольшее количество аминокислотных отличий – 8 (из 138 анализируемых аминокислот кодирующего гена).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участка генома BRRV показал, что белорусский изолят вместе с группой изолятов из США (UF1583, UF1585, UF1586, UF1584, UF1587) образовали один кластер (98 % бутстреп-поддержки) (рис. 2).

Часть изолятов из Польши образовывали два отдельных кластера с бутстреп-поддержкой 85 и 100 % соответственно. Остальные изоляты располагались отдельно. Корреляции между группированием изолятов вируса и их географическим происхождением не обнаружено. Это явление, вероятно, объясняется тем, что вариабельность гена активатора транскрипции вируса BRRV может зависеть не столько от географического происхождения, сколько от видовой принадлежности растения-хозяина. Однако для подтверждения или опровержения данной гипотезы необходимо наличие данных о нуклеотидных последовательностях исследуемого гена у изолятов BRRV, выделенных из других видов растений, которые в настоящее время не представлены в базе данных GenBank.

Невысокая вариабельность изолятов BRRV может быть также следствием вегетативного размножения растений голубики. В таком случае возможно тиражирование нескольких или только одного изолята вируса вместе с растениями и его распространения с растительным материалом.

Заклучение. Впервые в результате молекулярно-генетических исследований секвенирован участок генома изолята BRRV из Беларуси (BRRV-BY1). Полученная нуклеотидная последовательность помещена в международную базу данных (EMBL/GenBank), где ей присвоен идентификационный номер LN998983.

При сравнении нуклеотидной последовательности белорусского изолята с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что изоляты имеют высокий уровень идентичности (94,1–99,3 %). Филогенетический анализ последовательностей участка генома BRRV показал, что белорусский изолят группируется с изолятами вируса из США. Корреляции между кластеризацией изолятов и их географическим происхождением не обнаружено.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б15М-031).

Acknowledgement

Work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Project no. Б15М-031).

Список использованных источников

1. Cloning, sequencing and promoter identification of Blueberry red ringspot virus, a member of the family Caulimoviridae with similarities to the “Soybean chlorotic mottle-like” genus / B. M. Glasheen [et al.] // *Archives of Virology*. – 2002. – Vol. 147. – P. 2169–2186.
2. Kalinowska, E. Molecular characterization of polish blueberry red ringspot virus isolate / E. Kalinowska, E. Paduch-Cichal, M. Chodorska // *Virus Genes*. – 2012. – Vol. 44. – P. 309–311.
3. Emerging and reemerging virus diseases of blueberry and cranberry / R. R. Martin [et al.] // *Acta Horticulturae*. – 2009. – Vol. 810. – P. 299–304.
4. Martin, R. R. New and emerging viruses of blueberry and cranberry / R. R. Martin, J. J. Polashock, I. E. Tzanetakis // *Viruses*. – 2012. – Vol. 4, N 11. – P. 2831–2852.
5. Polashock, J. J. Molecular detection and discrimination of Blueberry red ringspot virus strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry / J. J. Polashock, M. K. Ehlenfeldt, J. A. Crouch // *Plant Dis.* – 2009. – Vol. 93, N 7. – P. 727–733.
6. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of small fruit germplasm / ed. by M. Diekmann, E. A. Frison, T. Putter; in collaboration with the Small Fruit Virus Working Group of the International Society for Horticultural Science. – Rome: Food and Agriculture of the United Nations; International Plant Genetic Resources Institute, 1994. – 124 p.
7. Cline, W. O. Blueberry red ringspot observations and findings in North Carolina / W. O. Cline, J. R. Ballington, J. J. Polashock // *Acta Horticulturae*. – 2009. – Vol. 810. – P. 305–312.
8. Detection and identification of viruses of highbush blueberry and cranberry using serological ELISA test and PCR technique / E. Paduch-Cichal [et al.] // *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. – 2011. – Vol. 10, N 4. – P. 201–215.
9. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in Poland / E. Kalinowska [et al.] // *J. of Plant Pathol.* – 2011. – Vol. 93, N 4. – P. 73.
10. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in the Czech Republic / J. Pribylova [et al.] // *Plant Dis.* – 2010. – Vol. 94, N 8. – P. 1071.
11. Plesko, I. M. Detection of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry cv. ‘Coville’ in Slovenia / I. M. Plesko, M. V. Marn, D. Koron // *Julius-Kuhn-Archives*. – 2010. – Vol. 427. – P. 204–205.
12. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Vaccinium* spp.: EPPO Standards PM 4/18 (1) // *Bull. OEPP/EPPO*. – 1997. – Vol. 27. – P. 195–204.

References

1. Glasheen B. M., Polashock J. J., Lawrence D. M., Gillett J. M., Ramsdell D. C., Vorsa N., Hillman B. I. Cloning, sequencing and promoter identification of Blueberry red ringspot virus, a member of the family Caulimoviridae with similarities to the “Soybean chlorotic mottle-like” genus. *Archives of Virology*, 2002, vol. 147, pp. 2169–2186. doi: 10.1007/s00705-002-0866-7.
2. Kalinowska E., Paduch-Cichal E., Chodorska M. Molecular characterization of polish blueberry red ringspot virus isolate. *Virus Genes*, 2012, vol. 44, pp. 309–311. doi: 10.1007/s11262-011-0679-4.
3. Martin R. R., Tzanetakis I. E., Caruso F. L., Polashock J. J. Emerging and reemerging virus diseases of blueberry and cranberry. *Acta Horticulturae*, 2009, vol. 810, pp. 299–304. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.810.38.
4. Martin R. R., Polashock J. J., Tzanetakis I. E. New and emerging viruses of blueberry and cranberry. *Viruses*, 2012, vol. 4, no. 11, pp. 2831–2852. doi: 10.3390/v4112831.
5. Polashock J. J., Ehlenfeldt M. K., Crouch J. A. Molecular detection and discrimination of Blueberry red ringspot virus strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry. *Plant Disease*, 2009, vol. 93, no. 7, pp. 727–733. doi: 10.1094/PDIS-93-7-0727.
6. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of small fruit germplasm, in Diekmann M., Frison E., Putter T. (ed.), in collaboration with the Small Fruit Virus Working Group of the International Society for Horticultural Science. Rome, Food and Agriculture of the United Nations, International Plant Genetic Resources Institute, 1994, 124 p.

7. Cline W. O., Ballington J. R., Polashock J. J. Blueberry red ringspot observations and findings in North Carolina. *Acta Horticulturae*, 2009, vol. 810, pp. 305–312. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.810.39.

8. Paduch-Cichal E., Kalinowska E., Chodorska M., Sala-Rejczak K., Nowak B. Detection and identification of viruses of highbush blueberry and cranberry using serological ELISA test and PCR technique. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 201–215.

9. Kalinowska E., Paduch-Cichal E., Chodorska M., Sala-Rejczak K. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 2011, vol. 93, no. 4, pp. 73. doi: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v93i4.2381>.

10. Pribylova J., Spak J., Kubelkova D., Petrzik K. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in the Czech Republic. *Plant Disease*, 2010, vol. 94, no. 8, pp. 1071. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1071B>.

11. Plesko I. M., Marn M. V., Koron D. Detection of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry cv. ‘Coville’ in Slovenia. *Julius-Kuhn-Archives*, 2010, vol. 427, pp. 204–205.

12. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Vaccinium* spp.: EPPO Standards PM 4/18 (1). *Bulletin OEPP/EPPO*, 1997, vol. 27, pp. 195–204.

Информация об авторах

Божидай Татьяна Николаевна – науч. сотрудник. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, аг. Самохваловичи, Минский р-н). E-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru.

Кухарчик Наталья Валерьевна – д-р с.-х. наук, доцент, заведующий отделом. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, аг. Самохваловичи, Минский р-н). E-mail: kychnataly@rambler.ru.

Information about the authors

Bazhydai Tatsiana Nikolaevna – Scientific researcher. Institute for Fruit Growing (2, Kovaleva Str., 223013, Samochvalovichi, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru.

Kukharchyk Natallia Valer'evna – D. Sc. (Agricult.), Assistant Professor, Head of the Department. Institute for Fruit Growing (2, Kovaleva Str., 223013, Samochvalovichi, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: kychnataly@rambler.ru.

Для цитирования

Божидай, Т. Н. Молекулярная характеристика изолята вируса красной кольцевой пятнистости голубики / Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 27–32.

For citation

Bazhydai T. N., Kukharchyk N. V. Molecular characterization of *Blueberry red ringspot virus* isolate. *Vestsi Natsy-anal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 27–32.

Н. Г. Аверина¹, Р. А. Щербаков¹, Е. Л. Недведь¹, И. Н. Минков²¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*²*Пловдивский университет, Пловдив, Республика Болгария***ВЛИЯНИЕ НИТРОПИРИНА НА ПОВЫШЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.)**

Изучено влияние Нитропирина® (НП), представляющего собой смесь кофакторов ключевого фермента ассимиляции неорганического азота – нитратредуктазы (НР), на активность фермента в 7-дневных проростках ячменя, выращиваемых на поверхности воды, при возрастании содержания НР-белка, а также в условиях засоления, создаваемого NaCl. Выращивание растений на растворах НП увеличивало общую активность НР на 21 %, а ее активную форму – на 76 %. Субстратная индукция НР с помощью KNO₃ (20 мМ), приводящая к возрастанию содержания НР-белка, повышала в присутствии НП активность НР в среднем на 60 %, что может свидетельствовать о лимитировании активности НР на уровне ее кофакторов как в норме, так и при увеличении содержания фермента. В присутствии KNO₃ и активатора НР (экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты) НП способствовал формированию высокой солеустойчивости растений ячменя, выращиваемых на растворах NaCl (150 мМ), на ранних стадиях их вегетации, что проявлялось в стимуляции ростовых процессов, повышении активности НР и содержания пролина, а также в снижении уровня АФК, детектируемом по способности растений генерировать супероксид анион-радикал.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, potassium nitrate, 5-аминолевулиновая кислота, Нитропирин®, нитратредуктаза, пролин, супероксид анион-радикал.

N. G. Averina¹, R. A. Sherbakov¹, E. L. Nedved¹, I. N. Minkov²¹*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*²*Plovdiv University, Plovdiv, Republic of Bulgaria***NITROPIRIN CONTRIBUTES TO THE ENHANCEMENT OF PLANT SALT TOLERANCE OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.)**

The influence of Nitropirin® (NP), which is a mixture of the key enzyme cofactors of assimilation of inorganic nitrogen-nitrate reductase (NR) on enzyme activity in 7-day barley grown on the surface of the water, in the face of increasing male-content protein as well as in conditions of salinity produced by NaCl were investigated. Growing plants on solutions of NP increased general activity NR on 21 % and its active form at 76 %. Substrate induction NR using KNO₃ (20 mm), leading to increased male-content of protein, increased in the presence of the NP NR activity an average of 60 %, which may indicate a limit the HP activity at the level of its cofactors as normal and when you increase the enzyme content. In the presence of KNO₃ and HP Activator (exogenous 5-aminolevulinic acid) NP contributed to high salt tolerance of barley plants grown on NaCl solutions (150 mm), in the early stages of vegetation that was manifested in the stimulation of growth processes, increase the activity of NR and proline content, as well as in reducing AFC, detektiruemom on the ability of plants to generate the superoxide anion radical.

Keywords: *Hordeum vulgare*, нитрат калия, 5-aminolevulinic acid, Nitropirin®, nitrogen-nitrate reductase, proline, superoxide anion radical.

Введение. Азот является одним из важнейших элементов в питании растений. Его метаболизм лежит в основе метаболизма аминокислот и белков, влияющих на процессы органогенеза и роста растений. Несимбиотические растения получают азот из почвы, где он представлен в основном в виде нитратов. Первым и ключевым ферментом цепи восстановления нитратов до аммония, а затем до органических аминокислот является нитратредуктаза (НР, КФ1.6.6.1-3) [1]. Ее активность определяет скорость ассимиляции растением неорганического азота и оказывает существенное влияние на весь азотный метаболизм. Нитрат является не только субстратом, но и сигнальной молекулой, регулирующей экспрессию генов НР [2]. Предоставление растению нитрата приводит к увеличению количества транскриптов фермента и усилению синтеза его молекул *de novo* [3–5]. В качестве первичного донора электронов фермент использует НАДН, либо НАД(Ф)Н, а также переносчики электронов – ФАД-кофермент, геминное железо и молибденовый кофактор в виде уникального молибдоптерина [6]. В условиях субстратной активации

НР за счет синтеза новых молекул белка недостаток кофакторов может лимитировать активность молекул фермента [6].

НР является мишенью для действия различных стрессоров окружающей среды, таких как тепловой шок, тяжелые металлы, водный дефицит, а также засоление. Засоление является одним из основных абиотических факторов, действие которого приводит к угнетению роста и развития растений, снижению их продуктивности. Повышение устойчивости растений к засолению пахотных земель – одна из ключевых задач современного сельскохозяйственного производства. Высокий уровень активности НР в солеустойчивых сортах по сравнению с чувствительными к засолению растениями [7] позволил сделать вывод, что этот фермент обеспечивает функционирование ряда механизмов, способствующих формированию солеустойчивости растений. Ранее нами показано, что субстратная активация НР с помощью KNO_3 приводит к возрастанию уровня экспрессии *Nar 1* гена НР, увеличению активности фермента и его содержания в растениях ячменя, выросших на растворе NaCl (150 мМ), что способствовало формированию солеустойчивости растений [8–10]. Добавление к раствору, содержащему NaCl и KNO_3 , экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) – нового экологически чистого регулятора роста растений, индуктора накопления эндогенных цитокининов, стабилизатора ряда белков и антистрессора [11] привело к дополнительному увеличению количества мРНК гена *Nar 1* фермента, повышению активности и содержания НР, а также к улучшению ростовых характеристик растений ячменя [9, 10]. Повышение под действием KNO_3 и АЛК как содержания фермента, так и его активности указывает на обеспечение новых молекул белка источниками электронов и кофакторами. В процессе жизнедеятельности растений каждый из кофакторов может стать лимитирующим звеном и таким образом оказывать влияние на сборку активного фермента [6]. Не исключено, что при засолении растений и одновременной стимуляции синтеза ферментативного белка под действием KNO_3 и АЛК уровень эндогенных кофакторов не в полной мере обеспечивает сборку новых молекул активного фермента. Дополнительное предоставление растущим в условиях засоления растениям экзогенных кофакторов НР могло бы явиться одним из способов усиления активности фермента, более эффективной ассимиляции неорганического азота и возрастания солеустойчивости растений.

Болгарскими учеными разработан экологически чистый препарат НИТРОПИРИН® (НП), представляющий собой сочетание кофакторов НР и физиологически активных соединений [12]. Показано, что НП контролирует уровень нитрата в растениях бузины, фасоли, тыквы и кукурузы, повышает активность НР в растениях бузины и повышает ассимиляцию и превращение неорганического азота в аминокислоты, белки и фотосинтетические пигменты [12, 13].

Цель настоящего исследования – использование нитропирина как источника кофакторов НР для изучения его действия на активность фермента в растениях ячменя в норме и при субстратной активации фермента с помощью KNO_3 , а также в растениях ячменя, выращиваемых в условиях засоления в присутствии как субстрата, так и активатора НР – молекул экзогенной АЛК для повышения солеустойчивости растений.

Объекты и методы исследования. Семена ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Гонар) проращивали в течение 2 сут в водопроводной либо дистиллированной воде, затем растения выращивали до 7–8-дневного возраста под белыми люминесцентными лампами ЛД-40 (160 мкмоль фотонов/(м²·с) при 25 °С в режиме 14 ч света/10 ч темноты на воде, а также на растворе NaCl (150 мМ) в присутствии субстрата НР – KNO_3 (5, 10, 20 мМ), активатора фермента – АЛК (4, 60, 80, 100 мг/л), а также разбавленного в 2 раза по сравнению с оригиналом [12] НП (1,0 мкМ никотинамида, 7,5 мкМ молибдата аммония, 0,6 мкМ мио-инозитола, 2,6 мкМ сукцината, 0,5 мкМ дифенилкарбамида, 5 нМ гиббереллина) либо при их отсутствии. При отборе проб верхние 0,5 см листьев пропускали и исследовали следующие участки длиной 1–2 см.

Активность НР определяли по скорости накопления нитритов согласно [14]. Общую активность НР определяли с буфером НЕРЕС-КОН, содержащем 5 мМ ЭДТА и 0,001 М меркаптоэтанол. При анализе активной формы НР вместо ЭДТА добавляли 10 мМ MgCl_2 . Содержание пролина определяли с помощью нингидринового реагента, используя описанный в работе [15] метод с применением калибровочной кривой. Генерацию супероксидных анион-радикалов (O_2^-) верхними отрезками листьев длиной 1 см определяли по восстановлению нитротетразолия синего согласно методу, описанному в работе [16].

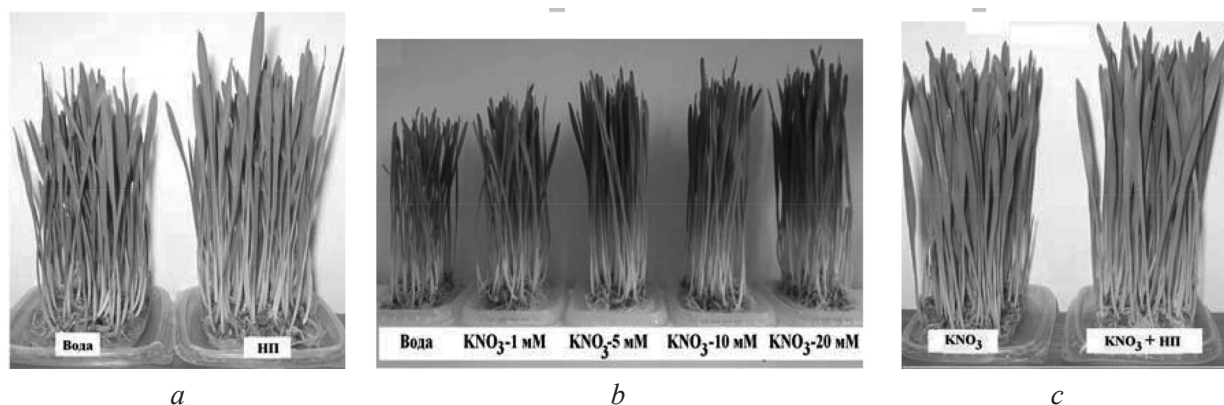


Рис. 1. Влияние KNO_3 (20 мМ) и НП на рост растений ячменя. Растения выращивали: *a* – в воде и растворе НП; *b* – в растворах KNO_3 (1, 5, 10 и 20 мМ); *c* – в растворе KNO_3 (20 мМ) с добавлением НП

Fig. 1. Influence of KNO_3 (20 mM) and of NP on growth of the barley plants. Seedlings were grown: *a* – in water and in NP solution, *b* – in KNO_3 solution, *c* – in KNO_3 solution with addition of NP

Приведены средние значения данных, полученных в результате 3–5 экспериментов, и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение. Прежде всего нами изучено влияние НП на активность НР в растениях ячменя, выращиваемых в воде, а также в условиях индукции фермента с помощью субстрата – KNO_3 . При добавлении НП к воде наблюдали незначительную стимуляцию роста растений ячменя по сравнению с водным контролем (рис. 1, *a*). По сравнению с контрольными растениями, выращенными на воде, активность НР в растениях, выращенных на растворе НП, составила 121 и 176 % соответственно для общей НР (+ЭДТА) и ее активной формы (+ $MgCl_2$) (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние НП на активность НР в растениях ячменя, выращиваемых в воде (вода + НП) либо в растворе KNO_3 (20 Мм) с добавлением НП (KNO_3 + НП)

Table 1. Influence of NP on an activity of NR in barley plants grown in water (water + NP) or in KNO_3 solution (20 mM) with addition of NP (KNO_3 + NP)

Активность НР, мкмоль/(г сырого веса)·ч	№ опыта	Вода	Вода + НП	KNO_3	KNO_3 + НП
Общая,	1	0,282	0,353	8,071	14,660
	2	0,198	0,240	5,869	6,405
	3	0,655	0,781	4,709	8,640
Среднее		$0,378 \pm 0,141$ (100 %)	$0,458 \pm 0,165$ (121 %)	$6,216 \pm 0,986$ (100 %)	$9,901 \pm 2,465$ (159 %)
Активная форма	1	0,185	0,300	7,948	14,199
	2	0,063	0,160	5,275	6,069
	3	0,447	0,768	4,148	7,490
Среднее		$0,232 \pm 0,113$ (100 %)	$0,409 \pm 0,184$ (176 %)	$5,791 \pm 1,127$ (100 %)	$9,252 \pm 2,507$ (159 %)

Выращивание растений ячменя в условиях возрастания содержания субстрата НР – KNO_3 привело к дозозависимому возрастанию ростовых характеристик растений (рис. 1, *b*). По мере возрастания концентрации нитрата в среде выращивания наблюдали значительное увеличение как общей активности НР, так и ее активной формы. Так, в случае использования 20 мМ KNO_3 общая активность НР возросла в среднем в 16 раз (табл. 1). Ранее нами отмечалось увеличение количества транскриптов гена *Nar 1* фермента с ростом концентрации нитрата в среде выращивания [5]. Увеличение количества транскриптов НР приводило и к усилению синтеза ее молекул *de novo* [3–5]. Добавление НП к раствору KNO_3 (20 мМ) приводило к усилению роста растений ячменя (рис. 1, *c*) и возрастанию как общей активности НР, так и ее активной формы

в среднем в 1,6 раза по сравнению с аналогичными показателями у растений, выращенных только на растворе KNO_3 (табл. 1).

Таким образом, показана положительная корреляция между ростом растений и количеством субстрата НР, определяющим ее активность, а также возрастание как общей активности НР, так и ее активной формы при добавлении к воде и раствору KNO_3 кофакторов фермента в виде НП. Это может свидетельствовать о лимитировании активности НР на уровне ее кофакторов как в норме, так и при возрастании содержания НР-белка.

Ранее нами установлено, что выращивание растений ячменя на растворе NaCl (150 мМ) приводит к подавлению роста растений, развития их корневой системы и незначительно сказывается на общей активности НР (90 %) и ее активной формы (96 %) по сравнению с таковыми у контрольных растений [8]. Добавление НП к раствору соли незначительно (на 5 %) увеличивало общую активность фермента и на 17–20 % его активную форму (рис. 2, *a*). Добавление НП к растворам соли, содержащим индуктор НР – KNO_3 (5, 10 и 20 мМ), увеличивало как общую активность фермента (на 5, 13 и 16 %), так и его активную форму (на 17, 20 и 31 %) (рис. 2, *a*).

Увеличение активности НР под действием НП в присутствии NaCl (150 мМ) и KNO_3 (20 мМ) повышало солеустойчивость растений, что проявлялось в усилении их ростовых характеристик (рис. 2, *b*), а также в возрастании на 21 % содержания пролина по сравнению с аналогичными показателями у растений варианта « $\text{NaCl} + \text{KNO}_3$ » (рис. 3, *a*).

Экзогенная АЛК в присутствии индуктора НР (молекул KNO_3) также способствует повышению солеустойчивости растений ячменя, усиливая их ростовые процессы, а именно увеличивая высоту растений и ширину листовой пластинки, а также повышая количество пролина, транскриптов НР, ее активность и содержание НР-белка [9, 10, 17]. В табл. 2 представлены результаты одного из опытов, в котором растения выращивали индивидуально на растворе NaCl (150 мМ), либо на растворе NaCl с добавлением KNO_3 (20 мМ) или АЛК (40 и 60 мг/л), либо на растворе NaCl с добавлением KNO_3 и АЛК. Отчетливо видно, что сумма стимулирующих эффектов, оказываемых на НР индивидуальными веществами (KNO_3 и АЛК), равна эффекту, наблюдаемому при их совместном присутствии, причем при оценке активности как общей НР, так и ее активной формы (табл. 2). Совместный стимулирующий эффект двух индивидуальных веществ (аддитивный эффект) на активность НР указывает на независимые, но однонаправленные механизмы их действия, что подкрепляется данными о влиянии обоих соединений на экспрессию одного и того же гена фермента [5, 9, 10].

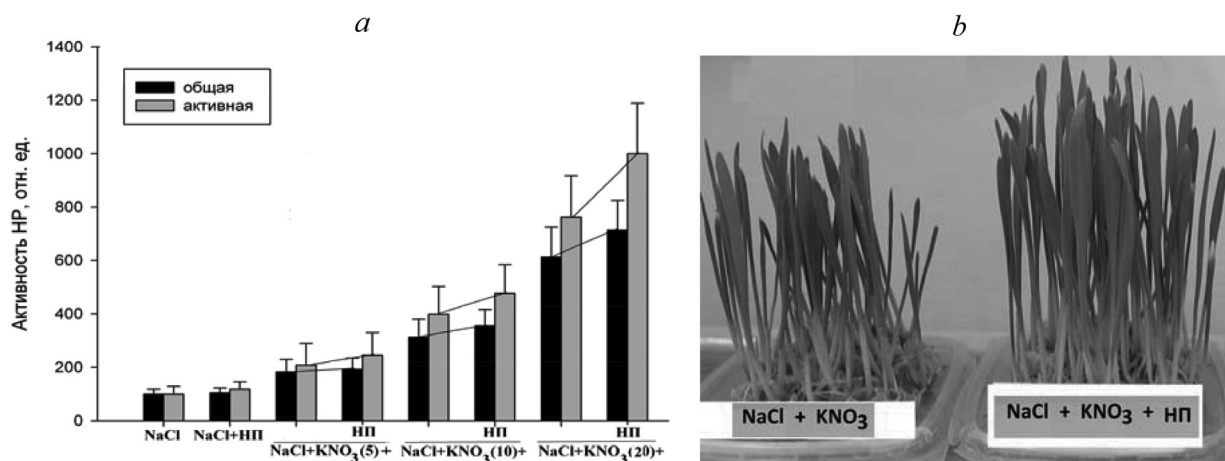


Рис. 2. Влияние НП на активность НР (*a*), а также на ростовые показатели (*b*) зеленых проростков ячменя, выращенных в растворах NaCl (150 мМ) с добавлением KNO_3 (5, 10 и 20 мМ) и НП. На рисунке (*b*) использовали 20 мМ KNO_3 . Линии на рисунке (*a*) соединяют столбцы соответствующих активностей вариантов « $\text{NaCl} + \text{KNO}_3$ » и « $\text{NaCl} + \text{KNO}_3 + \text{НП}$ »

Fig. 2. Influence of NP on NR activity (*a*), and growth (*b*) of green barley seedlings grown in NaCl (150 мМ) solution with addition of KNO_3 (5, 10 and 20 мМ) and NP. The lines in the figure (*a*) connect the columns of respective activities of variants « $\text{NaCl} + \text{KNO}_3$ » and « $\text{NaCl} + \text{KNO}_3 + \text{NP}$ »

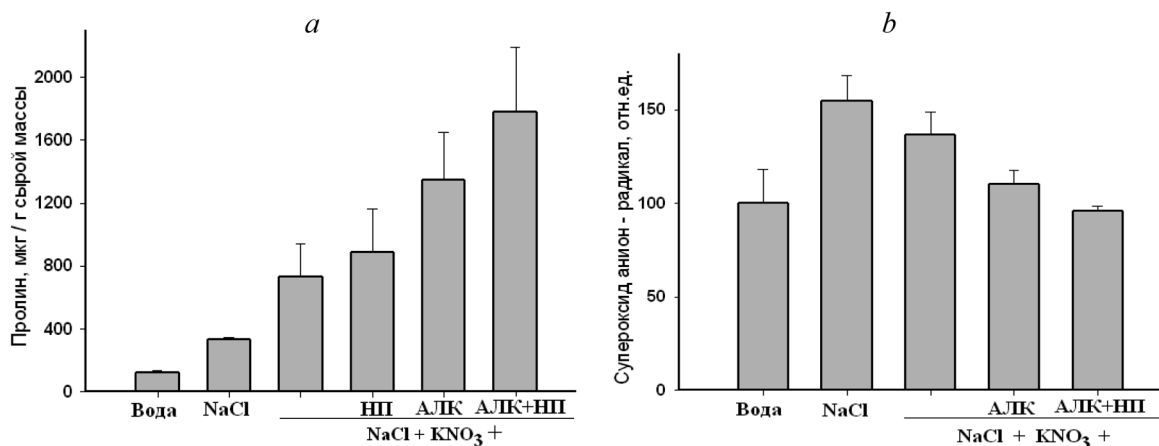


Рис. 3. Содержание свободного пролина (a) и способность к генерации супероксид анион-радикала (b) в растениях ячменя, выращенных в воде, растворе, содержащем 150 мМ NaCl с добавками 20 мМ KNO₃, НП, 80 мг/л АЛК, либо без добавок

Fig. 3. The content of free proline (a) and ability to generate superoxide anion-radical (b) in barley plants grown in water, in 150 mM NaCl solution with or without addition of 20 mM KNO₃, 80 mg/l ALA and NP

Добавление НП к солевому раствору, содержащему 150 мМ NaCl, индуктор (KNO₃) и активатор экспрессии гена НР (АЛК), приводящее к увеличению количества транскриптов и содержания НР-белка, способствовало повышению солеустойчивости растений, что проявилось в увеличении содержания в них антистрессора пролина (на 32 % по сравнению с вариантом «NaCl + KNO₃ + АЛК») (рис. 3, a). Увеличение содержания пролина под действием НП в условиях засоления растений может быть прямым следствием возрастания в них содержания молекул активной НР и, следовательно, способности ассимилировать неорганический азот, превращать его в глутаминовую кислоту и затем в пролин.

Содержание активных форм кислорода, оцениваемое по способности растений генерировать супероксид анион-радикал, возросло на 54 % в растениях варианта «NaCl» по сравнению с водным контролем (рис. 3, b). Последовательное добавление к солевому раствору KNO₃ (20 мМ), АЛК (80 мг/л) и наконец НП привело к постепенному снижению способности генерировать супероксид анион-радикал в растениях вариантов «NaCl + KNO₃», «NaCl + KNO₃ + АЛК» и «NaCl + KNO₃ + АЛК + НП» по сравнению с растениями, выращенными в растворе NaCl (рис. 3, b). Эти величины по сравнению с вариантом «NaCl» составили 89, 71 и 62 % соответственно.

Таблица 2. Величина стимуляции активности НР в растениях ячменя, выращенных в растворе NaCl (150 мМ) с добавлением KNO₃ (20 мМ); экзогенной АЛК (40 и 60 мг/л); KNO₃ (20 мМ) + АЛК (40 мг/л); KNO₃ (20 мМ) + АЛК (60 мг/л) по сравнению с активностью фермента в растениях, выращенных в 150 мМ растворе NaCl (контроль – 100 %)

Table 2. Amount of stimulation (%) of NR activity in barley plants grown in NaCl solution (150 mM) with addition of KNO₃ (20 mM); exogenous ALA (40 and 60 mg/l); KNO₃ (20 mM) + ALA (40 mg/l); KNO₃ (20 mM) + ALA (60 mg/l) as compared with enzyme activity in plants grown in 150 mM NaCl solution (control – 100 %)

Вариант	Общая активность НР, %	Активная форма НР, %
NaCl (150) – контроль	100	100
NaCl (150) + KNO ₃ (20)	173	202
NaCl (150) + АЛК (40)	38	58
Сумма индивидуальных эффектов KNO ₃ и АЛК	211	260
NaCl (150) + KNO ₃ (20) + АЛК (40)	242	252
NaCl (150) + KNO ₃ (20)	173	202
NaCl (150) + АЛК (60)	33	76
Сумма индивидуальных эффектов KNO ₃ и АЛК	206	278
NaCl (150) + KNO ₃ (20) + АЛК (60)	202	289

Заклучение. Таким образом, предоставление кофакторов НР в виде НП растениям, выращиваемым на воде, растворах KNO_3 , а также в условиях засоления, создаваемого NaCl в присутствии KNO_3 и/или АЛК, либо в их отсутствии, приводило к возрастанию как общей активности НР, так и ее активной формы, что указывает на лимитирование активности НР на уровне ее кофакторов при описанных выше условиях. Повышение активности НР в присутствии НП сопровождалось повышением содержания пролина, что при засолении растений уменьшало окислительный стресс, снижая способность растений генерировать супероксид анион-радикал. Таким образом, использование трех агентов – субстрата НР (KNO_3), экзогенной АЛК и кофакторов НР в виде НП – способствовало формированию высокой солеустойчивости растений ячменя на ранних стадиях их вегетации, проявившейся в стимуляции ростовых процессов, повышении активности ключевого фермента ассимиляции неорганического азота – НР, повышенном накоплении пролина и снижении уровня АФК, определяемом по способности растений генерировать супероксид анион-радикал.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б11МС-017).

Acknowledgement

Work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Project no. B11MS-017).

Список использованных источников

- Garg, S. K. Role and hormonal regulation of nitrate reductase activity in higher plants: a review / S. K. Garg // *Plant Sci. Feed.* – 2013. – Vol. 3. – P. 13–20.
- Foyer, C. H. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. / C. H. Foyer, M. Parry, G. Noctor // *J. Exp. Bot.* – 2003. – Vol. 54. – P. 585–593.
- Участвуют ли белки теплового шока в регуляции экспрессии гена нитратредуктазы *Agrostemma githago* L. при внезапном повышении температуры? / В. В. Кузнецов [и др.] // *Физиология растений.* – 1991. – Т. 38, № 5. – С. 970–979.
- Kende, H. Nitrate reductase in *Agrostemma githago*. Comparison of the inductive effects of nitrate and cytokinin / H. Kende, T. C. Shen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1972. – Vol. 286. – P. 118–125.
- Bezaei, Z. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants / Z. Bezaei, R. A. Sherbakov, N. G. Averina // *J. of Plant Growth Regulation.* – 2014. – Vol. 33, N 309. – P. 745–750.
- Savidov, N. A. Regulation of Mo-cofactor, NADH- and NAD(P)H-specific nitrate reductase activities in the wild type and two nar-mutant lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) / N. A. Savidov, B. I. Tokarev, S. H. Lips // *J. of Experim. Botany.* – 2013. – Vol. 48, N 309. – P. 847–855.
- Garg, N. Nitrate reductase activity in roots and leaves of chickpea cultivars under salt stress. / N. Garg, R. Singla // *Span. J. Agric. Res.* – 2005. – Vol. 3. – P. 248–252.
- Роль метаболизма азота в формировании солеустойчивости ячменя / Н. Г. Аверина [и др.] // *Физиология растений.* – 2014. – Т. 61, № 1. – С. 106–113.
- Bezaei, Z. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl -stressed barley seedlings / Z. Bezaei, N. G. Averina, R. A. Sherbakov // *Acta Physiol. Plant.* – 2015. – Vol. 37, N 11. – P. 1–8.
- Аверина, Н. Г. Молекулярные механизмы регуляции нитратредуктазы экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках ячменя, выращенных в условиях засоления хлоридом натрия / Н. Г. Аверина, З. Бейзаеи, Р. А. Щербак // *Докл. нац. акад. наук Беларуси.* – 2015. – Т. 59, № 4. – С. 95–101.
- Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточ. инженерии. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 413 с.
- Средство за регулиране на нитратното съдържание в растенията : пат. BG 60673B1, Република България / И. С. Желязков, И. Н. Минков, П. И. Душкова, Е. К. Нешева. – Оpubл.: 29.12.1994.
- Influence of nitrotyrosine on the early stages of chlorophyll synthesis in wheat / V. T. Toneva [et al.] // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 28, N 1–2. – P. 92–98.
- Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism / K. Sumithra [et al.] // *Plant Growth Regul.* – 2006. – Vol. 50. – P. 11–22.
- Misra, N. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram / N. Misra, A. K. Gupta // *Plant Sci.* – 2005. – Vol. 169. – P. 331–339.
- Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы / Б. Ю. Шорнинг [и др.] // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65, № 12. – С. 1612–1617.
- Механизмы формирования устойчивости растений ячменя к солевому стрессу под действием 5-аминолевулиновой кислоты / Н. Г. Аверина [и др.] // *Физиология растений.* – 2010. – Т. 57, № 6. – С. 849–856.

References

- Garg S. K. Role and hormonal regulation of nitrate reductase activity in higher plants: a review. *Plant Science Feed*, 2013, vol. 3, pp. 13–20.
- Foyer C. H., Parry M., Noctor G. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 2003, vol. 54, pp. 585–593.

3. Kuznetsov V. V., Roshchupkin B. V., Kuznetsov V. V., Borisova N. N., Yatsenko I. A. Whether heat shock proteins in the regulation of nitrate reductase gene expression *Agrostemma githago* L. with a sudden rise in temperature? *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology], 1991, vol. 38, no. 5, pp. 970–979. (in Russian).
4. Kende H., Shen T. C. Nitrate reductase in *Agrostemma githago*. Comparison of the inductive effects of nitrate and cytokinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1972, vol. 286, pp. 118–125.
5. Beyzaei Z., Sherbakov R. A., Averina N. G. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2014, vol. 33, no. 309, pp. 745–750.
6. Savidov N. A., Tokarev B. I., Lips S. H. Regulation of Mo-cofactor, NADH- and NAD(P)H-specific nitrate reductase activities in the wild type and two nar-mutant lines of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 2013, vol. 48, no. 309, pp. 847–855.
7. Garg N., Singla R. Nitrate reductase activity in roots and leaves of chickpea cultivars under salt stress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2005, vol. 3, pp. 248–252.
8. Averina N. G., Beizai Z., Shcherbakov R. A., Usatov A. V. The role of nitrogen metabolism in the formation of the salt tolerance of barley. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology], 2014, vol. 61, no. 1, pp. 106–113. (in Russian).
9. Averina N. G., Beizai Z., Shcherbakov R. A. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, vol. 37, no. 11, pp. 1–8.
10. Averina N. G., Beizai Z., Shcherbakov R. A. Molecular mechanisms of regulation of nitrate reductase exogenous 5-aminolevulinic acid in barley grown in sodium chloride salinity conditions. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2015, vol. 59, no. 4, pp. 95–101. (in Russian).
11. Averina N. G., Yaronckaya E. B. Biosynthesis of tetrapyrroles in plants. Minsk, Belarusian science, 2012. 413 p. (in Russian).
12. Zhelyazkov I. S., Minkov I. N., Dushkova P. I., Nesheva E. K. Tool of regulation contents of nitrate in plant. Patent BG, no. 60673B1, 1994. (in Bulgarian).
13. Toneva V. T., Dimitrova S. D., Pavlova B. I., Minkov I. N. Influence of nitropryrine on the early stages of chlorophyll synthesis in wheat. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 2002, vol. 28, no. 1–2, pp. 92–98.
14. Sumithra K., Jutur P. P., Carmel B. D., Reddy A. R. Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiate*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regulation*, 2006, vol. 50, pp. 11–22.
15. Misra N., Gupta A. K. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Science*, 2005, vol. 169, pp. 331–339.
16. Shorning B. Yu., Smirnova E. G., Yaguzhinskii L. S., Vanyushin B. F. The need for education for development of etiolated seedlings of superoxide wheat. *Biochemistry*, 2000, vol. 65, no. 12, pp. 1612–1617. (in Russian).
17. Averina N. G., Gritskevich E. R., Verhilovskaya I. V., Usatov A. V., Yaronckaya E. B. Mechanisms of formation of barley plant resistance to salt stress under the action of 5-aminolevulinic acid. *Fiziologiya rastenii* [Plant Physiology], 2010, vol. 57, no. 6, pp. 849–856. (in Russian).

Сведения об авторах

Аверина Наталья Георгиевна – гл. науч. сотрудник, профессор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: averina@ibp.org.by.

Щербakov Ростислав Александрович – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sherbakov@ibp.org.by.

Недведь Елена Леонардовна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nedved_e@tut.by.

Минков Иван – профессор, заведующий кафедрой. Пловдивский университет им. Паисия Хилендарски (ул. Цар Асен, 24, 4000, г. Пловдив, Болгария). E-mail: minkov@argon.acad.bg.

Для цитирования

Влияние нитропирина на повышение солеустойчивости растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) / Н. Г. Аверина [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 33–39.

Information about the authors

Averina Nataliya Georgievna – Chief researcher, Professor. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: averina@ibp.org.by.

Sherbakov Rostislav Alexandrovich – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sherbakov@ibp.org.by.

Nedved Elena Leonardovna – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nedved_e@tut.by.

Minkov Ivan N. – Professor, Head of the Department. Plovdiv University (24, Tsar Asen Str., 4000, Plovdiv, Republic of Bulgaria). E-mail: minkov@argon.acad.bg.

For citation

Averina N. G., Sherbakov R. A., Nedved E. L., Minkov I. N. Nitropirin contributes to the enhancement of plant salt tolerance of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Vestnyak Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 33–39.

Г. Г. Верещако, Н. В. Чуешова, Е. В. Цуканова, М. А. Бакшаева

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

РАДИАЦИОННОЕ ПОРАЖЕНИЕ СПЕРМАТОГЕННЫХ КЛЕТОК И ЭПИДИДИМАЛЬНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПОСЛЕ ВНЕШНЕГО ОБЛУЧЕНИЯ

Изучено влияние внешнего ионизирующего облучения в дозе 1,0 Гр на репродуктивную систему крыс-самцов. Установлено, что в начальном периоде после облучения наблюдается ускорение процесса сперматогенеза, что подтверждается повышением количества сперматогоний, прелептотенных сперматоцитов, сперматоцитов первого порядка и округлых сперматид. Одновременно отмечаются снижение числа эпидидимальных сперматозоидов и их жизнеспособность, значительная гибель зрелых половых клеток путем апоптоза и некроза. Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) и акрозина в эпидидимальных сперматозоидах на 3-и сутки после облучения уменьшается, в то же время в отдаленном периоде активность ГФДГ в этом периоде не отличается от контроля при повышенном уровне акрозина (почти в 2,8 раза). Ухудшение количественных и качественных характеристик эпидидимальных сперматозоидов у облученных животных, по-видимому, приведет к снижению фертильности экспериментальных животных.

Ключевые слова: внешнее облучение в дозе 1,0 Гр, репродуктивная система крыс-самцов, сперматогенез, сперматозоиды, жизнеспособность, индекс фрагментации ДНК (индекс DFI), апоптоз, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, акрозин, фруктоза.

G. G. Vereschako, N. V. Chueshova, E. V. Tsukanova, M. A. Bakshayeva

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

RADIATION INJURY SPERMATOGENIC CELLS AND SPERMATOOA RATS WISTAR AFTER EXTERNAL EXPOSURE

It was studied the effect of external radiation (1.0 Gy) on the reproductive system of male rats. It is established that in the initial period after irradiation, acceleration of the process of spermatogenesis is observed, which is confirmed by an increase in the number of spermatogonia, preleptotene spermatocytes, and spermatocytes of the first order and round spermatids. Simultaneously, a decrease in the number of epididymal spermatozoa and their viability, a significant death of mature sex cells by apoptosis and necrosis. The activity of GDD and acrosin in epididymal spermatozoa decreases on the 3rd day after irradiation, while in the long-term period the activity of GFDG does not differ from control at an increased level of acrosin (almost 2.8 times). The deterioration of quantitative and qualitative characteristics of epididymal spermatozoa in irradiated animals, apparently, will lead to a decrease in the fertility of experimental animals.

Keywords: external exposure at dose 1.0 Gy, male rats reproductive systems, spermatogenesis, spermatozoa, viability, DNA fragmentation index (index DFI), apoptosis, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), acrosyn, fructose.

Введение. Репродуктивная система самцов млекопитающих, включая человека, обеспечивающая процесс воспроизводства, обладает высокой чувствительностью к воздействию антропогенных факторов окружающей среды и является одним из важнейших объектов для исследования. За последние годы наряду с традиционными методами ее оценки все большее распространение получают новые технологии, включая проточную цитофлуориметрию, современные биохимические и молекулярные методы исследования, изучается процесс программированной гибели клеток и др., что позволяет в большей степени раскрыть механизм реализации эффектов в сперматогенных клетках тестикулярной ткани и сперматозоидах при действии различных негативных факторов [1, 2].

Несмотря на значительное количество работ, посвященных проблеме влияния ионизирующей радиации на репродуктивную систему самцов [3–5], использование современных методов исследования радиационного поражения сперматогенных клеток и зрелых сперматозоидов представляет значительный интерес. Как известно, среди сперматогенных клеток самыми радиочувствительными являются сперматогонии и сперматоциты (клетки начальных этапов дифференцировки), а наиболее радиорезистентными – сперматозоиды, т. е. радиорезистентность клеток к облучению повышается по мере их дифференцировки [3].

Эффекты в половых клетках разных стадий дифференцировки в ткани семенника и зрелых сперматозоидов животных, а также в различные сроки после внешнего острого облучения в дозе 1,0 Гр с помощью молекулярно-биохимических методов изучены недостаточно.

Цель настоящей работы – исследование ряда показателей сперматогенных клеток тестикулярной ткани и эпидидимальных сперматозоидов крыс-самцов в различные сроки после внешнего острого радиационного воздействия в дозе 1,0 Гр.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар (исходный возраст 4,5 мес., масса $344,85 \pm 2,01$ г), находившихся на стандартном пищевом рационе вивария и имевших свободный доступ к питьевой воде. Контролем служили животные аналогичного возраста и пола ($n = 5-6$), содержащиеся в таких же условиях.

Все крысы-самцы были разделены на две группы: I – контроль (интактные животные); II – животные, облученные в дозе 1,0 Гр. Внешнее однократное облучение в дозе 1,0 Гр проводили на установке ИГУР (^{137}Cs , мощность дозы 43 сГр/мин). Опыты проводили на 3-и и 30-е сутки после воздействия.

Предварительно взвешенных животных подвергали декапитации, выделяли семенники с придатками (эпидидимисы) и семенные пузырьки, абсолютную массу которых оценивали с точностью до 1 мг с последующим расчетом относительной массы. Для количественного анализа различных типов сперматогенных клеток методом ДНК-проточной цитометрии (цитофлуориметр Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США) использовали клеточную суспензию, полученную из тестикулярной ткани [6]. По содержанию ДНК сперматогенные клетки были классифицированы как сперматогонии (2С), сперматоциты в S-фазе, сперматоциты первого порядка (4С), круглые (1С), удлинённые (НС1) и продолговатые (НС2) сперматиды. Зрелые половые клетки выделяли из эпидидимиса, подсчитывали их количество в камере Горяева [7], определяли их жизнеспособность [8], индекс фрагментации ДНК (DFI) [9], количество апоптотических и некротических сперматозоидов [10], а также активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) [11] и акрозина [12, 13]. В семенных пузырьках определяли содержание фруктозы [14].

Полученные данные обрабатывали с помощью общепринятых методов биологической статистики, используя пакеты программ Excel и GraphPad Prism 5. При сравнении двух независимых групп по количественному признаку применяли критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$

Результаты и их обсуждение. Установлено, что масса органов репродуктивной системы крыс-самцов на 3-и сутки после внешнего острого облучения в дозе 1,0 Гр почти не изменяется, за исключением статистически значимого снижения этого показателя для абсолютной массы семенных пузырьков на 13,0 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю (табл. 1). Отсутствие существенных изменений массы органов репродуктивной системы, и прежде всего семенников, при действии острого ионизирующего излучения, вероятно, обусловлено тем, что эти изменения отмечаются, как правило, при облучении в дозах свыше 2,0 Гр [15].

Т а б л и ц а 1. Влияние внешнего облучения в дозе 1,0 Гр на массу органов репродуктивной системы, количество сперматогенных клеток различных популяций в тестикулярной ткани и некоторые показатели эпидидимальных сперматозоидов крыс на 3-и сутки после воздействия
 T a b l e. 1. Influence of external radiation dose of 1.0 g per ton of the organs of the reproductive system, the number of spermatogennh cells of different populations of testicular tissue and some indicators of epididymal sperms rats on day 3 after exposure

Исследуемый показатель	Контроль	Облучение в дозе 1,0 Гр	% к контролю
<i>Масса органов репродуктивной системы</i>			
АМ семенников, г	$1,95 \pm 0,06$	$1,90 \pm 0,05$	97,44
ОМ семенников, %	$0,50 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,02$	100,00
АМ эпидидимисов, г	$0,62 \pm 0,013$	$0,61 \pm 0,018$	98,39
ОМ эпидидимисов, %	$0,16 \pm 0,003$	$0,16 \pm 0,005$	100,00
АМ семенных пузырьков, г	$1,48 \pm 0,07$	$1,29 \pm 0,05^*$	87,16
ОМ семенных пузырьков, %	$0,38 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	89,47

Окончание табл. 1

Исследуемый показатель	Контроль	Облучение в дозе 1,0 Гр	% к контролю
<i>Сперматогенные клетки тестикулярной ткани, %</i>			
Сперматогонии (2С)	8,88 ± 0,57	10,50 ± 0,32*	118,24
Прелептотенные сперматоциты (S-фаза)	2,86 ± 0,09	3,05 ± 0,04	106,64
Сперматоциты первого порядка	6,21 ± 0,25	7,02 ± 0,49	113,04
Сперматиды округлые	45,55 ± 2,32	53,75 ± 0,94*	118,00
Сперматиды удлинённые	23,01 ± 0,82	18,22 ± 1,32*	79,18
Сперматиды продолговатые	12,99 ± 2,11	6,43 ± 0,81*	49,50
<i>Эпидидимальные сперматозоиды</i>			
Количество клеток, ×10 ⁶ /г	7,38 ± 0,36	6,45 ± 0,50	87,40
Жизнеспособность, %	78,17 ± 3,10	57,00 ± 1,93*	72,92
DFI, %	3,31 ± 0,15	2,69 ± 0,46	81,27
Апоптотические сперматозоиды, %	0,18 ± 0,03	0,88 ± 0,23*	488,89
Некротические сперматозоиды, %	1,78 ± 0,12	2,40 ± 0,15*	134,83
ГФДГ, мЕд	5,99 ± 1,77	3,98 ± 0,56	66,44
Акрозин, мг/мин	2,20 ± 0,72	0,89 ± 0,47	40,45
<i>Семенные пузырьки</i>			
Фруктоза, ммоль/л	9,38 ± 0,91	8,02 ± 0,60	85,50

Примечание. АМ – абсолютная масса; ОМ – относительная масса; DFI – индекс фрагментации ДНК; ГФДГ – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. * – достоверно при $p < 0,05$. То же в табл. 2.

Облучение крыс-самцов в дозе 1,0 Гр оказывает существенное влияние на процесс сперматогенеза. Так, при анализе распределения различных популяций сперматогенных клеток на 3-и сутки после радиационного воздействия наблюдается ускорение начальных этапов их дифференцировки. Это выражается в повышении количества сперматогоний (до 118,2 %), прелептотенных сперматоцитов (до 106,6 %) и сперматоцитов первого порядка (до 113,0 %). Однако статистически значимый характер это повышение имеет только в отношении числа сперматогоний.

Количество круглых сперматид, которые образуются в результате деления сперматоцитов первого порядка и являются гаплоидными клетками (1С), также достоверно повышается (до 118,0 %). В дальнейшем на стадии формирования (трансформации) сперматид в сперматозоиды число удлинённых и продолговатых сперматид значительно снижается и составляет по отношению к контролю 79,2 % ($p < 0,05$) и 49,5 % ($p < 0,05$) соответственно.

Существенное уменьшение количества продолговатых сперматид в тестикулярной ткани отражается на продукции спермиогенеза, так как количество эпидидимальных сперматозоидов в группе облучённых животных имеет тенденцию к снижению (до 87,4 %), а их жизнеспособность падает до 72,9 % ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. В этот период (3-и сутки) облучение крыс в дозе 1,0 Гр индуцирует гибель половых клеток, о чем свидетельствует статистически значимое увеличение (почти в 5 раз) числа некротических и особенно апоптотических сперматозоидов.

Анализ активности ГФДГ и акрозина в эпидидимальных сперматозоидах показал, что на 3-и сутки после облучения отмечается значительное их снижение, но из-за значительной вариабельности полученных данных они не являются достоверными.

Спустя 1 мес. после внешнего облучения в дозе 1,0 Гр изменений абсолютной и относительной массы органов репродуктивной системы облучённых животных не выявлено (табл. 2). К этому времени процесс сперматогенеза по сравнению с начальным сроком наблюдения (3-и сутки) в тестикулярной ткани практически нормализуется на всех его стадиях. При этом сохраняется тенденция к уменьшению числа продолговатых сперматид до 86,9 %. Изучение количественных и качественных характеристик сперматозоидов, выделенных из эпидидимисов облучённых животных, напротив, показывает значительное ухудшение изучаемых показателей по сравнению с таковыми при первом сроке наблюдения. Прежде всего необходимо отметить статистически значимое уменьшение количества зрелых половых клеток, выделенных из эпидидимиса. Их число

составляет всего 55,0 % по отношению к контролю при низкой жизнеспособности клеток (76,8 %, $p < 0,05$). Количество апоптотических и некротических сперматозоидов возрастает более чем в 5,5 и 4 раза соответственно. В то же время активность ГФДГ в исследуемых клетках в этом периоде не отличается от контроля при повышенном уровне (почти в 2,8 раза) акрозина.

Содержание фруктозы в семенных пузырьках, которая является основным источником энергообеспечения сперматозоидов, имеет тенденцию к снижению, что указывает на некоторое ухудшение обеспечения этим энергетическим субстратом клеток в начальном периоде после воздействия (3-и сутки) и его повышение к 30-м суткам (до 115,9 % по отношению к контролю), что, вероятно, связано с количеством зрелых половых клеток.

Т а б л и ц а 2. Влияние внешнего облучения в дозе 1,0 Гр на массу органов репродуктивной системы, количество сперматогенных клеток различных популяций в тестикулярной ткани и некоторые показатели эпидидимальных сперматозоидов крыс на 30-е сутки после воздействия

Table 2. Influence of external radiation dose of 1.0 g per ton of the organs of the reproductive system, the number of spermatogennyh cells of different populations of testicular tissue and some indicators of epididymal sperms rats on the 30th day after exposure

Исследуемый показатель	Контроль	Облучение в дозе 1,0 Гр	% к контролю
<i>Масса органов репродуктивной системы</i>			
АМ семенников, г	1,87 ± 0,05	1,76 ± 0,06	94,12
ОМ семенников, %	0,47 ± 0,01	0,44 ± 0,02	93,62
АМ эпидидимисов, г	0,64 ± 0,03	0,63 ± 0,02	98,44
ОМ эпидидимисов, %	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	106,67
АМ семенных пузырьков, г	1,37 ± 0,13	1,42 ± 0,06	103,65
ОМ семенных пузырьков, %	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,02	105,88
<i>Сперматогенные клетки тестикулярной ткани, %</i>			
Сперматогонии (2 С)	6,41 ± 0,33	6,86 ± 0,18	107,02
Прелептотенные сперматоциты (S-фаза)	1,98 ± 0,15	2,04 ± 0,15	103,03
Сперматоциты первого порядка	3,73 ± 0,31	4,22 ± 0,19	113,14
Сперматиды округлые	40,53 ± 2,65	42,77 ± 2,04	105,53
Сперматиды удлинённые	16,89 ± 0,93	15,70 ± 1,32	92,95
Сперматиды продолговатые	30,36 ± 2,39	26,40 ± 1,74	86,96
<i>Эпидидимальные сперматозоиды</i>			
Количество клеток, ×10 ⁶ /г	8,45 ± 0,29	4,65 ± 0,58*	55,03
Жизнеспособность, %	68,83 ± 1,78	52,83 ± 1,94*	76,76
DFI, %	5,20 ± 0,41	5,44 ± 0,32	104,62
Апоптотические сперматозоиды, %	0,67 ± 0,21	3,68 ± 0,91*	549,25
Некротические сперматозоиды, %	1,00 ± 0,15	3,85 ± 0,55*	385,00
ГФДГ, мЕд	4,04 ± 0,66	4,24 ± 0,85	104,95
Акрозин, мг/мин	1,64 ± 0,69	4,58 ± 0,98	279,27
<i>Семенные пузырьки</i>			
Фруктоза, ммоль/л	9,66 ± 1,35	11,19 ± 0,73	115,84

Таким образом, внешнее облучение крыс-самцов в дозе 1,0 Гр не оказывает существенного влияния на массу органов репродуктивной системы в различные сроки после облучения. На 3-и сутки после воздействия процесс сперматогенеза на начальных этапах дифференцировки сперматогенных клеток ускоряется, однако в отдаленном периоде он почти нормализуется. В то же время количество эпидидимальных сперматозоидов и их жизнеспособность у облученных животных достоверно снижаются на 3-и сутки после воздействия, а к 30-м суткам они уменьшаются еще в большей степени. Облучение также индуцирует значительное увеличение числа некротических и апоптотических сперматозоидов. Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии внешнего облучения в дозе 1,0 Гр на спермиогенез, что, вероятно, приведет к падению оплодотворяющей способности животных.

Заклученне. Таким образом, внешнее облучение в дозе 1,0 Гр, не оказывая существенного влияния на массу органов репродуктивной системы крыс-самцов, стимулирует процесс сперматогенеза в начальном периоде после облучения (3-и сутки), что подтверждается повышением количества сперматогоний, прелептотенных сперматоцитов и сперматоцитов первого порядка и круглых сперматид. Для эпидидимальных сперматозоидов облученных животных (3-и, 30-е сутки) выявляется выраженная негативная реакция на воздействие, которая заключается не только в достоверной гибели зрелых половых клеток за счет индукции апоптоза и некроза, но и в значительном снижении их жизнеспособности. Ухудшение количественных и качественных характеристик эпидидимальных сперматозоидов у облученных животных, по-видимому, вызовет снижение фертильности экспериментальных животных.

Список использованных источников

1. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клин. лаб. диагностике: в 2 т. / В. В. Алексеев [и др.] ; под ред. А. И. Карпищенко. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – Т. 1. – 470 с.
2. Клиническая андрология / под ред. В. Б. Шилла, Ф. Комхаира, Т. Харгрива. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 800 с.
3. Москалев, Ю. И. Отдаленные последствия радиационного поражения. Неопухолевые формы / Ю. И. Москалев, В. Н. Стрельцова // Итоги науки и техники. Радиационная биология. – М.: ВИНТИ, 1987. – Т. 6. – С. 141–149.
4. Кондратенко, В. Г. Действие ионизирующей радиации на семенники млекопитающих / В. Г. Кондратенко // Успехи соврем. биологии. – 1977. – Т. 83, вып. 2. – С. 305–319.
5. Верещако, Г. Г. Биохимические изменения в семенниках млекопитающих при действии ионизирующих излучений / Г. Г. Верещако, А. М. Ходосовская, Е. Ф. Конопля // Успехи соврем. биол. – 1998. – Т. 118, вып. 5. – С. 630–644.
6. Suresh, R. Quantitation of spermatogenesis by DNA flow cytometry: comparative study among six species of mammals / R. Suresh, G. R. Aravindan, N. R. Moudgal // J. Biosci. – 1992. – Vol. 17, N 4. – P. 413–419.
7. Влияние радиационного облучения на витаминный статус и сперматогенез крыс / В. В. Евдокимов [и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1997. – Т. 123, № 5. – С. 524–527.
8. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – Geneva: WHO Press, 2010. – 271 p.
9. Evenson, D. P. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons with Other Techniques / D. P. Evenson, K. L. Larson, L. K. Jost // J. Andrology. – 2002. – Vol. 23, N 1. – P. 25–43.
10. The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages / D. Bukowska [et al.] // Veterinarni Medicina. – 2011. – Vol. 56, N 5. – P. 248–254.
11. Низкие концентрации H₂O₂ активируют систему антиоксидантной защиты сперматозоидов человека / В. В. Евдокимов [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 9. – С. 1431–1439.
12. Химическая природа антиоксидантов и их действие при замораживании семени барана / В. К. Милованов [и др.] // Животноводство. – 1981. – № 9. – С. 45–46.
13. Активность акрозина в криоконсервированных спермиях человека / А. В. Дунаевская [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 65–70.
14. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В. В. Долгов [и др.]. – М.; Тверь: Триада, 2006. – 145 с.
15. Топалова, С. Масса и клеточность семенников крыс после γ -облучения в различных дозах / С. Топалова, Т. Пантев // Пробл. рентгенологии и радиобиологии (НРБ). – 1985. – Т. 6, № 1. – С. 47–52.

References

1. Alekseev V. V., Alipov A. N., Andreev V. A., Antonov V. G. Medical laboratory technology: a guide for clinical laboratory diagnostics, ed. by Karpishchenko A. I., 3rd ed., rev. and add. Moscow, GEOTAR, Media, 2012, vol. 1. 472 p. (in Russian).
2. Clinical andrology, ed. by Scilla V. B., Komhaira F., Hargriva T. Moscow, GEOTAR, Media, 2011. 800 p. (in Russian).
3. Moskalev Yu. I., Streltsova V. N. The long-term effects of radiation damage. Non-tumoral forms. *The results of science and technology. Radiation Biology*. Moscow, VINITI, 1987, vol. 6, pp. 141–149. (in Russian).
4. Kondratenko V. G. Effects of ionizing radiation on mammalian testicles. *Uspehi sovremennoi biologii* [Advances of Modern Biology], 1977, vol. 83, no. 2, pp. 305–319. (in Russian).
5. Vereshchako G. G., Khodosovskaya A. M., Konoplya E. F. Biochemical changes in the testes of mammals under the action of ionizing radiation. *Uspehi sovremennoi biologii* [Advances of Modern Biology], 1998, vol. 118, no. 5, pp. 630–644. (in Russian).
6. Suresh R., Aravindan G. R., Moudgal N. R. Quantitation of spermatogenesis by DNA flow cytometry: comparative study among six species of mammals. *Journal of Bioscience*, 1992, vol. 17, no. 4, pp. 413–419. doi: 10.1007/BF02720096.
7. Evdokimov V. V., Kodentsova V. M., Vrzhesinskaya O. A., Yakushina L. M., Erasova V. I., Kirpatovsiky V. I., Sakharov I. Y. Influence of radiation on vitamin status and spermatogenesis in rats. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 1997, vol. 123, no. 5, pp. 524–527. (in Russian).

8. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed., Geneva, WHO Press, 2010, 271 p.
9. Evenson D. P., Larson K. L., Jost L. K. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons with Other Techniques. *Journal of Andrology*, 2002, vol. 23, no. 1, pp. 25–43.
10. Bukowska D., Kempisty B., Sikora J., Jackowska M., Wozna M., Antosik P., Piotrowska H., Bunda J., Jaskowski J. M. The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. *Veterinarni Medicina*, 2011, vol. 56, no. 5, pp. 248–254.
11. Evdokimov V. V., Barinov K. V., Turovetsky V. B., Muronets V. I., Schmalhausen E. V. Low concentrations of H₂O₂ activate antioxidant defense system of human spermatozoa. *Biohimiya* [Biochemistry], 2015, vol. 80, no. 9, pp. 1431–1439. (in Russian).
12. Milovanov V. K., Koltsov E. A., Shaydullina I. N., Varnavskih V. A. The chemical nature of antioxidants and their behavior when freezing semen of sheep. *Jivotnovodstvo* [Animal Breeding], 1981, no. 9, pp. 45–46. (in Russian).
13. Dunaevskaya A. V., Chub N. N., Kramar M. I., Rodionova V. L. Akrozin activity in cryopreserved human spermatozoa. *Problemye kriobiologii* [Problems of Cryobiology], 2003, no. 1, pp. 65–70. (in Russian).
14. Dolgov V. V., Lugovskaya S. A., Fanchenko N. D., Mironov I. I., Nazarov E. K., Rakova N. G., Rakov S. S., Selivanov T. S., Shchelochkov A. M. Laboratory diagnosis of male infertility. Moscow, Tver, Triada, 2006. 145 p. (in Russian).
15. Topalova S., Pantev T. The mass and cellularity rat testis after γ -irradiation in different doses. *Problemi rengenologii i radiobiologii (Narodnaja Respublika Bolgarii)* [Problems of Radiology and Radiobiology (Populus Reipublicae Bulgaria)], 1985, vol. 6, no. 1, pp. 47–52. (in Russian).

Информация об авторах

Верещако Геннадий Григорьевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: vereschako2@tut.by.

Чуешова Наталья Владимировна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: natalya-chueshova@tut.by.

Цуканова Елена Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: elenatsukanova14@gmail.com.

Бакшаева Маргарита Александровна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: m.bakshaeva@yandex.ru.

Для цитирования

Радиационное поражение сперматогенных клеток и эпидидимальных сперматозоидов крыс линии Вистар после внешнего облучения / Г. Г. Верещако [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 40–45.

Information about the authors

Vereschako Gennady Grigorievich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: vereschako2@tut.by.

Chueshova Natalya Vladimirovna – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: natalya-chueshova@tut.by.

Tsukanova Elena Vladimirovna – Junior researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: elenatsukanova14@gmail.com.

Bakshayeva Margarita Alexandrovna – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: m.bakshaeva@yandex.ru.

For citation

Vereschako G. G., Chueshova N. V., Tsukanova E. V., Bakshayeva M. A. Radiation injury spermatogenic cells and spermatozoa rats Wistar after external exposure. *Vestsi Natsy-anal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 40–45.

А. В. Левый, Е. В. Воронкова, Ю. В. Полюхович, А. П. Ермишин

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ДНК-МАРКЕРЫ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ И К Y-ВИРУСУ У ОБРАЗЦОВ ДИКОГО АЛЛОТЕТРАПЛОИДНОГО ВИДА КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM STOLONIFERUM*

Мексиканский аллотетраплоидный дикий вид картофеля *Solanum stoloniferum* Schldt. (серия *Longipedicellata*) представляет собой источник ряда ценных для селекции генов. Однако естественные репродуктивные барьеры между *S. stoloniferum* и культурным картофелем существенно затрудняют интрогрессию генов этого вида в селекционный материал. Ранее нами впервые показана возможность получения диплоидных гибридов в скрещиваниях между *S. stoloniferum* и диплоидными линиями *S. tuberosum*, что значительно упрощает этот процесс. Однако неясно, какие из ценных генов дикого вида, расположенные на разных геномах, удастся перенести к диплоидным межвидовым гибридам.

Целью настоящего исследования было отобрать генотипы аллотетраплоидного вида с максимально широкой представленностью ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу и Y-вирусу. Отобранные генотипы будут вовлечены в гибридизацию с диплоидами *S. tuberosum*, что позволит изучить перенос маркеров с геномом А (или В) дикого вида в диплоидные гибриды, в том числе при использовании других методов вовлечения в селекцию генофонда *S. stoloniferum*.

В результате изучения 26 образцов *S. stoloniferum* выделен PI 205522, у которого имелись маркеры к генам устойчивости к фитофторозу (*Rpi-sto1*) и Y-вирусу картофеля (*Ry-sto* и *Ry-fsto*). Отсутствие расщепления по маркерам у потомства от самоопыления PI 205522 свидетельствует о гомозиготном состоянии этих генов. Сиквенс фрагмента маркера 1521/518 образца PI 205522 показал его гомологию (99 %) с известными последовательностями гена *Rpi-sto1* *S. stoloniferum* и *Rpi-blb1* *S. bulbocastanum* образцов этих видов, имеющих высокую устойчивость к фитофторозу.

Ключевые слова: картофель, *Solanum stoloniferum*, ДНК-маркеры, гены устойчивости, PVY (вирус Y картофеля), фитофтороз.

A. V. Levy, E. V. Voronkova, Y. V. Polyukchovich, A. P. Yermishin

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

REPRESENTATIVENESS OF DNA-MARKERS OF LATE BLIGHT AND PVY-RESISTANCE GENES IN ACCESSIONS OF WILD ALLOTETRAPLOID POTATO SPECIES *SOLANUM STOLONIFERUM*

Wild allotetraploid potato species from Mexico *Solanum stoloniferum* Schldt. (series *Longipedicellata*) is considered to be a source of the range of valuable for breeding genes. Nevertheless, natural reproductive barriers between *S. stoloniferum* and cultivated potatoes considerably hamper introgression of genes of this species into breeding material. We were the first who demonstrated earlier the possibility of production of diploid hybrids in crosses between *S. stoloniferum* and *S. tuberosum* diploid lines that can substantially simplify this process. However, it is not clear which of the wild species genes situated on different genomes may be transferred to diploid interspecific hybrids. The purpose of the study was to select wild species genotypes with the widest range of DNA-markers of LB- and PVY-resistance genes. They will be used in crosses with *S. tuberosum* diploid lines to investigate the transfer of the markers along with A (or B) genome of the wild species to diploid hybrids as well as in application of other methods of involvement of *S. stoloniferum* into breeding.

As a result of study 26 accessions of wild allotetraploid species *S. stoloniferum*, the PI 205522 had been selected carrying markers of *Rpi-sto1*, *Ry-sto* and *Ry-fsto* genes. Lack of segregation on the markers in offspring from self-pollination of PI 205522 indicated about homozygous state of these genes. Sequence of the part of the 1521/518 marker in PI 205522 had shown its homology (99 %) with known sequences of genes *Rpi-sto1* of *S. stoloniferum* and *Rpi-blb1* of *S. bulbocastanum* of the accessions of these species having high LB-resistance.

Keywords: potato, *Solanum stoloniferum*, DNA-markers, resistance genes, PVY (potato virus Y), LB (late blight).

Введение. Мексиканский вид картофеля *Solanum stoloniferum* Schldt. (серия *Longipedicellata*) представляет собой источник ряда ценных генов, включение которых в генетический пул культурного картофеля *S. tuberosum* позволило бы селекционерам в значительной степени продвигаться в создании сортов, устойчивых к болезням, вредителям и неблагоприятным факторам внешней среды. Однако естественные репродуктивные барьеры между *S. stoloniferum* и культурным картофелем существенно затрудняют интрогрессию ценных генов этого вида в селекционный материал.

S. stoloniferum, как и другие представители серии *Longipedicellata*, является полным (геномным) аллоплоидом с геномом AABB с дисомным наследованием признаков и относится к классификационной группе 4x (2EBN) видов, которая считается наиболее древней среди представителей серии *Petota*. В силу его дисомности и эффективной плоидности (или EBN, от англ. *endosperm balance number*), равной 2, он не может свободно скрещиваться с тетраплоидным *S. tuberosum*, являющимся тетрасомным 4x (4EBN) видом. Этот вид при отсутствии презиготных барьеров легко скрещивается с дигаплоидами *S. tuberosum* (2x (2EBN)) и другими 2x (2EBN) видами с образованием триплоидных 3x (2EBN) гибридов. Такие триплоиды являются жизнеспособными, однако в силу значительных нарушений мега- и микроспорогенеза, как правило, полностью стерильны, что явилось эволюционной причиной обособления аллотетраплоидов от диплоидных видов картофеля [1].

Для вовлечения в селекцию генофонда *S. stoloniferum* и других аллополиплоидных видов используют сложные схемы скрещиваний, включающие манипуляции с плоидностью, а также различные методы биотехнологии растений [2–9]. Однако такие подходы сопряжены не только с технической сложностью получения фертильных жизнеспособных гибридов, но и со сложностью дальнейшего их использования в селекции. К их недостаткам следует отнести прежде всего то, что отбор по селекционно-ценным признакам (интрогрессия селекционно-ценных генов дикого вида) проводится среди высокополиплоидного (в лучшем случае тетраплоидного) и анеуплоидного селекционного материала, для которого характерно сложное расщепление. Требуется достаточно много времени для стабилизации плоидности селекционного материала на тетраплоидном уровне, элиминации нежелательных признаков дикого вида. Многие из методов преодоления межвидовых барьеров технически сложны и в большинстве случаев недостаточно результативны.

В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси изучена возможность получения диплоидных гибридов в скрещиваниях между *S. stoloniferum*, а также дикими аллотетраплоидными видами картофеля *S. acaule*, *S. fendleri*, *S. polytrichon* и дигаплоидами *S. tuberosum* [10–12]. Впервые установлено, что среди межвидовых гибридов наряду с ожидаемыми триплоидами можно отобрать диплоидные генотипы, способные скрещиваться с дигаплоидами *S. tuberosum*. Полученные диплоидные гибриды являются жизнеспособными и могут легко использоваться в дальнейших скрещиваниях на диплоидном уровне.

Данные, полученные с применением SSR- и RAPD-маркеров, подтвердили интрогрессию видоспецифических локусов дикого и культурного родительских видов как в триплоидные, так и в диплоидные межвидовые гибриды на основе аллотетраплоидных видов. Потеря части локусов дикого вида при неизменном уровне локусов культурного картофеля позволила сделать вывод, что образование диплоидных гибридов при скрещивании аллотетраплоидных видов с дигаплоидами *S. tuberosum*, вероятно, происходит путем оплодотворения моноплоидной (n , 1EBN, содержащей геном A или B(A')) яйцеклетки аллотетраплоидного вида нормальной пылью (n , 1EBN, содержащей геном A) дигаплоида *S. tuberosum* [12].

В силу того, что получение диплоидных межвидовых гибридов на основе аллотетраплоидных видов, очевидно, связано с переносом в селекционный материал лишь одного из геномов (предположительно генома A), возникает вопрос: какие из ценных генов дикого вида можно перенести с помощью этого метода, а какие – невозможно. Для ответа на этот вопрос необходимо точно установить: 1) какой из геномов дикого аллотетраплоидного вида представлен в диплоидных гибридах (A, B или тот и другой у разных генотипов); 2) с какой частотой могут быть представлены в гибридах определенные гены (например, гены устойчивости к болезням), имеющиеся у родительского дикого вида. Последний показатель зависит от аллельного состояния гена (гомозигота или гетерозигота) у родительских генотипов и его геномной локализации. В контексте изучаемой проблемы второй аспект представляет наибольший интерес: если выяснится, что у диплоидных гибридов встречается исключительно геном A, то гены, расположенные на геноме B, будет невозможно интрогрессировать в селекционный материал с помощью этого метода.

Для *S. stoloniferum* разработан ряд ДНК-маркеров, использование которых может быть полезным при изучении указанной проблемы. Во-первых, имеются весьма специфичные SCAR-маркеры

COSII 5B и FLintB₄₆₉, которые применяются в филогенетических исследованиях для идентификации генома В аллотетраплоидных диких видов картофеля [13]. Во-вторых, нашли применение в селекции ДНК-маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (PVY), интрогрессированные в сорта картофеля от *S. stoloniferum* [14, 15]. Наконец, у *S. stoloniferum* выявлен функциональный гомолог гена *Rpi-blb1* долговременной устойчивости к фитофторозу широкого спектра действия мексиканского диплоидного 1 EBN вида *S. bulbocastanum*. Для его идентификации (он был обозначен как *Rpi-stol*) вполне пригодны ДНК маркеры, разработанные для детекции *Rpi-blb1* [16].

Цель настоящей работы – изучение представленности ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу *Rpi-stol* и PVY (*Ry-sto* и *Ry-fsto*) у образцов коллекции *S. stoloniferum*. Предполагалось выделить образцы, имеющие наибольшее количество названных маркеров. Эти образцы будут использованы при изучении особенностей интрогрессии генетического материала дикого аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* в селекционный материал путем получения диплоидных гибридов при их гибридизации с фертильными дигиплоидами *S. tuberosum*, а также при использовании других методов получения межвидовых гибридов.

Материалы и методы исследования. Объектом исследований являлись 26 образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* (семена получены из генетического банка по картофелю NRSP-6, США).

Выделение и очистку ДНК осуществляли из листьев выращиваемых в теплице растений с использованием наборов DNA purification Kit производства фирмы Thermo Scientific (ЕС) в соответствии с рекомендациями производителя и рядом модификаций, разработанных специально для выделения ДНК из свежесобранных зеленых листьев картофеля [17]. Измерение концентрации и степени очистки ДНК выполняли на спектрофотометре Ultrospec 3300.

Проводили ПЦР-анализ ДНК образцов *S. stoloniferum* на наличие ДНК-маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY и гену *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу. Для детекции локусов генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* использовали ДНК-маркеры SCARysto₄₁₀₀ и CAPS GP122/*EcoRV*₇₁₈ соответственно [14, 15], для детекции локусов гена *Rpi-stol* – маркеры 517/1519₇₅₀, RB₈₂₀ и 1521/518₇₀₄ [16]. Синтез праймеров осуществлен в ОДО «Праймтех» (г. Минск). Реакции амплификации проводили на автоматическом программируемом термоциклере фирмы PE Applied Biosystems (США) (GenAmp System 2700). Праймеры и режимы ПЦР описаны в методических рекомендациях [17, 18]. Специфические фрагменты ДНК идентифицировали после горизонтального электрофореза продуктов амплификации в 1,5 %-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия в течение 1–1,5 ч при напряжении в 80 В и силе тока 6 мА. Визуализацию фрагментов проводили в ультрафиолетовом свете с использованием прибора гель-документирования Quantum ST4 1100.

Секвенировали фрагмент ДНК размером 671 п. н. гена *Rpi-stol*, полученного в результате амплификации праймера 1521/518₇₀₄ у *S. stoloniferum* PI 205522 с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 310/3130/3130xl согласно методике, описанной в руководстве [19]. Редактирование суммарной нуклеотидной последовательности и анализ результатов

```

361 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 420 S. stoloniferum PI205522. локус 517/1519750
3320 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 3379 S. stoloniferum Rpi-pt1EU884422.1
3320 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 3379 S. stoloniferum Rpi-sto1 EU884421.1
85967 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 6026 S. bulbocastanum Rpi-blb1 AY426259.
3320 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT 3379 S. bulbocastanum Rpi-blb1 (RGA2) AY336128.1
9179 AGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTA----- GCACTAGAGAGTCTCCCT 89220 S. bulbocastanum хромосома VIII AY303171.1

```

Фрагмент секвенированного локуса 1521/518₇₀₄ образца PI 205522 *S. stoloniferum* и соответствующих последовательностей ДНК разных генотипов *S. stoloniferum* и *S. bulbocastanum*, представленных в базах данных NCBI. Показано наличие делеции размером 18 п. н. у неустойчивого к фитофторозу образца *S. bulbocastanum* AY303171.1 в области ДНК, комплементарной обратному праймеру (выделена серым цветом) для идентификации маркера 1 and 1' [21], сцепленного с признаком высокой устойчивости к фитофторозу. У образца PI 205522 делеция в области ПЦР ДНК-маркера отсутствует

A fragment of the sekvenir locus 1521/518704 of sample PI 205522 *S. stoloniferum* and corresponding DNA sequences of different genotypes of *S. stoloniferum* and *S. bulbocastanum*, represented in NCBI databases. It was shown the existence of deletion size 18 p. n. from unsustainable to phytophthorosis sample *S. bulbocastanum* AY 303171.1 in the field of DNA, complementary reverse Primer (dimmed) for identification of marker 1 and 1' [21], concatenated with a sign of high resistance to phytophthorosis. Sample PI 205522 deletion in the field of DNA PCR-marker is missing

секвенирования осуществляли с помощью пакета программ Chromas Pro Version 1.5, степень идентичности полученных последовательностей последовательностям, включенным в базу данных NCBI, – при помощи пакетов программ NCBI Standard Nucleotide BLAST по процедуре blastn [20].

Результаты и их обсуждение. Результаты ПЦР-анализа ДНК образцов *S. stoloniferum* на наличие ДНК-маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY и гену *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу представлены в таблице.

Результаты ПЦР-анализа ДНК образцов *S. stoloniferum* на наличие ДНК-маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY и *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу
The results of PCR-analysis of DNA samples of *S. stoloniferum* on DNA markers of genes *Ry-sto* and *Ry-fsto* resistance to PVY and *Rpi-stol* resistance to late blight

Образец	ПЦР-маркеры генов устойчивости к PVY		ПЦР-маркеры гена <i>Rpi-stol</i>		
	SCARysto4 ₁₀₀	GP122/ <i>EcoRV</i> ₇₁₈	517/1519 ₇₅₀	RB ₈₂₀	1521/518 ₇₀₄
PI 160224	+	0	0	0	0
PI 160225	+	0	0	0	0
PI 160226	+	+	0	0	+
PI 160372	+	0	0	0	0
PI 161152	+	0	0	0	0
PI 186544	+	+	0	0	0
PI 195164	+	0	0	0	0
PI 195167	+	0	0	0	+
PI 201849	+	+	0	0	+
PI 201855	+	0	0	0	+
PI 205510	+	0	0	0	0
PI 205522	+	+	+	+	+
PI 230477	+	0	0	0	0
PI 230490	+	+	0	0	+
PI 230557	+	0	0	0	+
PI 239411	+	0	0	0	0
PI 243458	+	+	0	0	+
PI 275252	+	0	0	0	0
PI 310964	+	0	0	0	0
PI 310980	+	+	0	0	0
PI 473534	+	+	0	0	+
PI 498287	+	0	0	0	0
PI 558462	+	0	0	0	0
PI 586948	+	0	0	0	0
PI 595472	+	0	0	0	0
PI 653763	+	+	0	0	0

Результаты свидетельствуют о наличии полиморфизма среди образцов *S. stoloniferum* по наличию ДНК-маркера гена *Ry-fsto* устойчивости к PVY и ДНК-маркеров гена *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу. Исследования показали, что образцы *S. stoloniferum* PI 160226, PI 201849, PI 205522, PI 230490, PI 243458, PI 473534 являются вероятными носителями как маркеров генов *Ry-sto* и *Ry-fsto* устойчивости к PVY, так и гена *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу. Наибольший интерес представляет образец PI 205522, у которого представлены все изученные ДНК маркеры.

Поскольку *S. stoloniferum* практически не образует клубни в условиях Беларуси, были получены семена от самоопыления этого и других образцов дикого вида. Детекция маркеров генов *Ry-fsto* и *Rpi-stol* у 28 растений, выращенных из семян PI 205522, показала отсутствие расщепления по маркерам обоих генов, что свидетельствует об их гомозиготном состоянии у данного образца и его самоопыленного потомства. Следовательно, при расчете частоты переноса этих генов в межвидовые гибриды с участием сеянцев PI 205522 фактор их аллельного состояния можно не учитывать.

В потомстве от самоопыления других образцов *S. stoloniferum*, у которых были детектированы маркеры гена *Rpi-stol* (см. таблицу), имело место расщепление (т. е. исходные растения являлись гетерозиготными по этому гену). Такие генотипы представляют интерес для изучения сопряженности наличия маркеров названного гена у гибридов с уровнем полевой устойчивости к фитофторозу.

По результатам BLAST-анализа последовательности нуклеотидов фрагмента маркера 1521/518₇₀₄ образца PI 205522 *S. stoloniferum* высокие степени перекрытия выявлены с двумя известными образцами *S. stoloniferum* – EU884421.1 и EU884422.1 (93 %) и с тремя образцами *S. bulbocastanum* – AY426259.1, AY336128.1 и AY303171.1 (99 %). С обоими образцами *S. stoloniferum* и с первыми двумя образцами *S. bulbocastanum* степень совпадения последовательности нуклеотидов составила 99 %, с третьим образцом этого вида – 97 %. Сравнение последовательности анализируемого фрагмента ДНК, ограниченного областью маркера 1 and 1' [21], сцепленного с признаком высокой устойчивости к фитофторозу, выявила высокую степень совпадения (99 %) с обоими образцами *S. stoloniferum* и с первыми двумя образцами *S. bulbocastanum* (отмечена лишь одна замена цитозина на аденин у этого образца по сравнению с известными). Образец *S. bulbocastanum* AY303171.1 имел делецию 18 п. н. в области, которую амплифицирует обратный праймер маркера 1and 1', которая характерна для рецессивного аллеля гена *Rpi-blb1* (см. рисунок), не дающего устойчивости к фитофторозу [16].

Как показали проведенные исследования, у всех изученных образцов *S. stoloniferum* присутствовал ДНК-маркер SCARysto4₁₀₀ гена *Ry_{sto}*. (см. таблицу). По-видимому, последовательность ДНК-маркера является специфической для генома *S. stoloniferum* и может быть сцеплена как с доминантным, так и рецессивным аллелем гена *Ry_{sto}*. При разработке маркера использовалась расщепляющаяся популяция, полученная в результате гибридизации высокоустойчивого к PVY венгерского сорта White Lady, происходящего от межвидового гибрида на основе *S. stoloniferum* [22]. Маркер SCARysto4₁₀₀ относится к ДНК-маркерам генов устойчивости, которые представляют собой последовательности ДНК, расположенные в непосредственной близости от гена, благодаря чему косегрегируют с ним в потомстве этого сорта и других сортов, происходящих от межвидового гибрида, являющегося источником этого гена. Последовательности маркеров интрогрессированы в селекционный материал от диких видов непосредственно с генами, маркерами которых они являются, и попадают в новые сорта в процессе селекции, как правило, совместно. Однако в генофонде диких видов, от которых они интрогрессированы, они могут быть не сцеплены с генами устойчивости [21].

Таким образом, для того чтобы выяснить, ассоциирован ли маркер SCARysto4₁₀₀ у образцов *S. stoloniferum* с устойчивостью к PVY, необходимы дополнительные испытания. Для целей нашего исследования этот вопрос значения не имеет: любой из имеющихся в распоряжении маркеров образцов дикого вида может быть использован в изучении особенностей переноса соответствующего гена в диплоидные межвидовые гибриды 4x *S. stoloniferum* × 2x *S. tuberosum*.

В отличие от SCAR-маркера ysto4₁₀₀, маркер CAPS GP122/*EcoRV*₇₁₈ гена *Ry-fsto* был представлен лишь у части образцов *S. stoloniferum* (у 9 из 26), что предполагает его связь с признаком устойчивости к патогену у этого дикого вида. Однако и такое предположение требует подтверждения. Для дальнейших исследований нами отобраны семена образца PI 205522, являющиеся носителями маркера GP122/*EcoRV*₇₁₈.

Поскольку гены *Ry-sto* и *Ry-fsto* уже достаточно давно используются в селекции картофеля и представлены у ряда сортов, проблема их повторной интрогрессии в селекционный материал не является актуальной. Для нас представляют интерес лишь маркеры данных генов. Это не относится к гену *Rpi-sto1*: насколько нам известно, в литературе отсутствуют сведения о переносе этого гена в генетический пул культурного картофеля, по крайней мере традиционными методами, отличными от генно-инженерных. Поэтому нами использовано одновременно несколько маркеров этого гена и проведено секвенирование полученных продуктов амплификации, чтобы убедиться, что речь идет о функционально активных аллелях. Предполагается в ближайшее время проведение полевых испытаний сеянцев и гибридов – носителей маркеров данного гена, а также разработка новых подходов для его интрогрессии в селекционный материал, не ограниченных получением диплоидных гибридов 4x *S. stoloniferum* × 2x *S. tuberosum*.

Так как ни ген *Rpi-blb1*, ни его гомолог *Rpi-sto1* в настоящее время не представлены в коммерческих сортах картофеля, ДНК-маркеров для их идентификации в рамках маркер-ассоциированного отбора не разработано. М. Wang [16] предложен набор из трех маркеров для идентификации этого гена у образцов диких видов, который использован в настоящем исследовании.

Прямой (F) праймер маркера 517/1519₇₅₀ расположен выше стартового кодона гена, а обратный (R) – в области интрона (т. е. область амплификации затрагивает NBS-домен и часть интрона). Маркер RB₈₂₀ (BLB1F/R) соответствует LRR-области гена. Прямой праймер маркера 1521/518₇₀₄ захватывает часть области LRR, которую амплифицирует RB₈₂₀, а обратный праймер расположен ниже стоп-кодона. Таким образом, этот набор маркеров покрывает значительную часть гена и прилегающие к нему районы.

Маркеры гена *Rpi-sto1* представлены у образцов *S. stoloniferum* не так часто, как маркеры генов устойчивости к PVY и соответствующий гомолог гена мексиканского диплоидного вида *S. bulbocastanum*. Ген *Rpi-sto1* с помощью всех трех пар праймеров детектирован только у одного образца *S. stoloniferum* (PI 205522) из 26 проанализированных (см. таблицу) и у 28 семян его потомства от самоопыления. У 8 образцов дикого вида присутствовал один из маркеров (1521/518₇₀₄). Амплификацию только отдельных маркеров можно объяснить наличием аллельных вариантов гена *Rpi-sto1* у изученного набора образцов дикого вида, которые способны амплифицировать лишь часть из использованных маркеров.

М. Wang [16] выявлены 2 образца *S. stoloniferum* (из 11 проанализированных), у которых присутствовали все 3 вышеупомянутых маркера гена *Rpi-sto1*, у 1 образца – только маркер 1521/518₇₀₄. У *S. bulbocastanum*, по данным этого автора, частота гена *Rpi-blb1* составила 56 % (из 249 изученных генотипов).

По мнению [16], доминантный аллель гена *Rpi-sto1*, с которым связана высокая устойчивость к фитофторозу, отличается от рецессивного аллеля делецией в 18 п. н. Из-за этого маркер 1521/518₇₀₄ у неустойчивых генотипов амплифицируется лишь частично, до места делеции. Также было показано, что неустойчивые генотипы не амплифицируют маркер 1 and 1' [21]), расположенный в пределах 1521/518₇₀₄. Это дало основание предположить, что делеция затрагивает область, которую амплифицирует один из праймеров 1 and 1'. Секвенированный нами фрагмент 1521/518₇₀₄ полностью включает область маркера 1 and 1'. Его последовательность практически полностью совпадает с аналогичной последовательностью ДНК клонированного гена *Rpi-sto1* двух образцов *S. stoloniferum* и гена *Rpi-blb1* двух образцов *S. bulbocastanum*, выделенных из генотипов, обладающих высокой устойчивостью к фитофторозу. Один из образцов *S. bulbocastanum* (AY 303171.1) из международных баз данных имел делецию 18 п. н., которая затрагивала последовательность, амплифицируемую обратным праймером маркера 1 and 1'. Очевидно, этот образец имеет рецессивный аллель гена *Rpi-blb1*. Полученные нами результаты подтвердили значительную ценность для селекции отобранного нами образца PI 205522: интрогрессия в селекционный материал имеющегося у него аллеля гена *Rpi-sto1* имеет большое практическое значение.

Локализация в геноме *S. stoloniferum* генов устойчивости к PVY неизвестна. Однако можно предположить, что они расположены на геноме А, так как успешно интрогрессированы в селекционный материал. Получение диплоидных гибридов между *S. stoloniferum* и дигиплоидами *S. tuberosum* и анализ их ДНК на предмет наличия маркеров этих генов и маркеров генома В (например, COSII 5B и FLintB₄₆₉ [13]) позволит получить точный ответ на этот вопрос. Что касается гена *Rpi-sto1*, с высокой степенью вероятности можно предположить, что он расположен на геноме В, который гомологичен геномам диплоидных мексиканских видов картофеля, в частности *S. bulbocastanum*. Следовательно, его интрогрессия вышеупомянутым диплоидным межвидовым гибридам может быть затруднена. Вероятно, потребуется разработка новых методов решения этой проблемы.

Заключение. Таким образом, в результате изучения представленности ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY и фитофторозу у 26 образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* установлено, что у всех изученных образцов присутствовал маркер SCARysto4₁₀₀ гена *Ry-sto* устойчивости к PVY. Маркер GP122/*EcoRV*₇₁₈ гена *Ry-fsto* устойчивости к PVY был представлен у 9 образцов. Все использованные маркеры гена *Rpi-sto1* высокой долговременной устойчивости к фитофторозу имелись только у образца PI 205522. У этого образца присутствовали также оба маркера генов устойчивости к PVY, что дало основание отобрать его для дальнейшего

изучения особенностей интрогрессии генов устойчивости к болезням дикого вида в селекционный материал при использовании разных методов получения межвидовых гибридов. Отсутствие расщепления по маркерам генов *Ry-fsto* и *Rpi-sto1* у потомства от самоопыления PI 205522 свидетельствует о гомозиготном состоянии этих генов у данного образца. Сиквенс фрагмента 671 п. н. маркера 1521/518₇₀₄ PI 205522 показал его гомологию (99 %) с известными последовательностями гена *Rpi-sto1* *S. stoloniferum* и *Rpi-blb1* *S. bulbocastanum*, ранее идентифицированными у образцов с высокой устойчивостью к фитофторозу.

Благодарность

Статья подготовлена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б16Р-103).

Acknowledgement

Work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Project no. B16R-103).

Список использованных источников

1. Ермишин, А. П. Генетические особенности аллотетраплоидных диких видов картофеля (*Solanum*) как объекта селекции / А. П. Ермишин // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 1. – С. 23–31.
2. Lamm, R. Investigation of some tuber-bearing *Solanum* hybrids / R. Lamm // Hereditas. – 1953. – Vol. 39, N 2. – P. 97–112.
3. Camadro, E. L. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *S. tuberosum* L. using 2n eggs / E. L. Camadro, J. C. Espinillo // Am. Potato J. – 1990. – Vol. 67. – P. 737–750.
4. Brown, C. R. Introgression of *Solanum acaule* germplasm from the endosperm balance number 2 gene pool into the cultivated endosperm balance number 4 potato gene pool via triplandroids / C. R. Brown, K. Adiwilaga // Genome. – 1990. – Vol. 33. – P. 273–278.
5. Iwanaga, M. Breaking of the cross ability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum* / M. Iwanaga, R. Freyre, K. Watanabe // Euphytica. – 1991. – Vol. 52, N 3. – P. 183–191.
6. Watanabe, K. N. Potato germ plasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression / K. N. Watanabe, C. Arbizu, P. Schmiediche // Genome. – 1992. – Vol. 35, N 1. – P. 53–57.
7. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. II Assessment of breeding value of tetraploid F₁ hybrids between tetrasomic tetraploid *S. tuberosum* and *S. acaule* / K. N. Watanabe [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1994. – Vol. 88, N 2. – P. 135–140.
8. Characterization of somatic hybrids between tetraploid *Solanum tuberosum* L. and dihaploid *S. acaule* / T. Yamada [et al.] // Breeding Sci. – 1997. – Vol. 47. – P. 229–236.
9. Rokka, V.-M. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.) / V.-M. Rokka // Plant Cell Reports. – 1998. – Vol. 18. – P. 82–88.
10. Воронкова, Е. В. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schldt. и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / Е. В. Воронкова, В. М. Лисовская, А. П. Ермишин // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 8. – С. 1065–1073.
11. Лисовская, В. М. Интрогрессия генетического материала диких аллотетраплоидных видов картофеля в диплоидные селекционные формы *Solanum tuberosum* L.: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / В. М. Лисовская, Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. навук Беларусі. – Минск, 2009. – 20 с.
12. Ермишин, А. П. Представленность специфических RAPD-локусов родительских видов у триплоидных и диплоидных гибридов между аллотетраплоидными видами картофеля и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова // Докл. Нац. акад. навук Беларусі. – 2014. – Т. 58, № 2. – С. 97–103.
13. Соколова, Е. А. Молекулярные маркеры генов устойчивости и геномов-доноров устойчивости картофеля к фитофторозу: метод. указания / Е. А. Соколова, О. А. Фаина, Э. Е. Хавкин; Всерос. науч.-исслед. ин-т с.-х. биотехнологии Россельхозакад. – М.: [б. и.], 2013. – 25 с.
14. Development of a locus-specific marker and localization of the *Ry_{sto}* gene based on linkage to a catalase gene on chromosome XII in the tetraploid potato genome / I. Cernak [et al.] // Breed. Sci. – 2008. – Vol. 58. – P. 309–314.
15. *Ry-fsto* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars / B. Flis [et al.] // Mol. Breed. – 2005. – Vol. 15. – P. 95–101.
16. Wang, M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species. PhD thesis / M. Wang; University of Wageningen. – Wageningen, 2007. – P. 43–58.
17. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: метод. рекомендации / А. П. Ермишин [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2010. – 60 с.
18. Методы вовлечения в селекцию 1 EBV диких диплоидных видов картофеля и скрининга селекционного материала на наличие генов устойчивости к фитофторозу: метод. рекомендации / А. П. Ермишин [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2014. – 58 с.
19. Воронкова, Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа для оценки потенциальной токсичности и аллергенности белковых продуктов трансгенов генно-инженерных растений (на примере ГМ-картофеля, устойчивого к колорадскому жуку): метод. рекомендации / Е. В. Воронкова, В. И. Лукша, А. П. Ермишин. – Минск: Право и экономика, 2014. – 72 с.

20. NCBI Standard Nucleotide BLAST [Электронный ресурс] // NCBI. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. – Дата доступа: 09.06.2016.

21. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene RB derived from a wild potato species / L. M. Colton [et al.] // *Crop Sci.* – 2006. – Vol. 46. – P. 589–594.

22. Cernak, I. Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene Ry_{sto} , and the identification of new markers / I. Cernak // *Acta Biol. Hungarica.* – 2008. – Vol. 59, N 2. – P. 195–203.

References

1. Yermishin A. P. Genetic features of allotetraploid wild potato species (*Solanum*) as an object of selection. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2014, no. 1, pp. 23–31. (in Russian).
2. Lamm R. Investigation of some tuber-bearing *Solanum* hybrids. *Hereditas*, 1953, vol. 39, no. 2, pp. 97–112.
3. Camadro E. L., Espinillo J. C. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *S. tuberosum* L. using 2n eggs. *American Potato Journal*, 1990, vol. 67, pp. 737–750.
4. Brown C. R., Adiwilaga K. Introgression of *Solanum acaule* germplasm from the endosperm balance number 2 gene pool into the cultivated endosperm balance number 4 potato gene pool via triplandroids. *Genome*, 1990, vol. 33, pp. 273–278.
5. Iwanaga M., Freyre R., Watanabe K. Breaking of the cross ability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica*, 1991, vol. 52, no. 3, pp. 183–191.
6. Watanabe K. N., Arbizu C., Schmiediche P. Potato germ plasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression. *Genome*, 1992, vol. 35, no. 1, pp. 53–57.
7. Watanabe K. N., Watanabe K. N., Orrillo M., Vega S., Masuelli R., Ishiki K. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. II Assessment of breeding value of tetraploid F_1 hybrids between tetrasomic tetraploid *S. tuberosum* and *S. acaule*. *Theoretical and Applied Genetic*, 1994, vol. 88, no. 2, pp. 135–140.
8. Yamada T., Misoo S., Ishii T., Takaoka K., Kamijima O. Characterization of somatic hybrids between tetraploid *Solanum tuberosum* L. and dihaploid *S. acaule*. *Breeding Science*, 1997, vol. 47, pp. 229–236.
9. Rokka, V.-M. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports*, 1998, vol. 18, pp. 82–88.
10. Voronkova E. V., Lisovskaya V. M., Yermishin A. P. Diploid hybrids between allotetraploid wild potato species *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schltld. and dihaploids *Solanum tuberosum* L. *Genetika* [Genetics], 2007, vol. 43, no. 8, pp. 1065–1073. (in Russian).
11. Lisovskaya V. M. The introgression of the genetic material of wild allotetraploid potato species into diploid selection forms *Solanum tuberosum* L., Abstract of Ph. D. dissertation, Genetics. *Institut genetiki i tsitologii Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi* [Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus], Minsk, 2009, 20 p. (in Russian).
12. Yermishin A. P., Voronkova E. V. Representation of specific RAPD loci of parental species in triploid and diploid hybrids between allotetraploid potato species and digaploid *Solanum tuberosum* L. *Doklady Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2014, vol. 58, no. 2, pp. 97–103. (in Russian).
13. Sokolova E. A., Fadina O. A., Khavkin E. E. Molecular markers of resistance genes and donor genomes of potato resistance to late blight: methodical guidelines. Moscow, All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 2013, 25 p. (in Russian).
14. Cernak I., Decsi K., Nagy S., Wolf J., Polgar Z., Gulyas G., Hirata Yu., Taller J. Development of a locus-specific marker and localization of the Ry_{sto} gene based on linkage to a catalase gene on chromosome XII in the tetraploid potato genome. *Breeding Science*, 2008, vol. 58, pp. 309–314.
15. Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Zyta D., Gebhardt C., Marczewski W. Ry_{fsto} gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding*, 2005, vol. 15, pp. 95–101.
16. Wang M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species: Ph. D. thesis. University of Wageningen, Wageningen, 2007, pp. 43–58.
17. Yermishin A. P., Voronkova E. V., Savchuk A. V., Luksha V. I., Poliukchovich Y. V., Makchanko O. V., Lisovskaya V. M. Evaluation of the initial potato material for breeding for resistance to diseases and pests with the help of specific PCR markers: methodological recommendations. Minsk, Law and Economics, 2010, 60 p. (in Russian).
18. Yermishin A. P., Poliukchovich Y. V., Voronkova E. V., Savchuk A. V., Gukasjan O. N., Drobiazina P. E., Sokolova E. A., Fadina O. A., Khavkin E. E. Methods of involving wild diploid species of potatoes in the selection of 1 EBN and screening of breeding material for the presence of resistance genes to late blight: guidelines. Minsk, Law and Economics, 2014, 58 p. (in Russian).
19. Voronkova E. V., Luksha V. I., Yermishin A. P. Methods of molecular genetic analysis for assessing the potential toxicity and allergenicity of protein products of transgenes of genetically engineered plants (GM-potato, resistant to the Colorado beetle): methodological recommendations. Minsk, Law and Economics, 2014, 72 p. (in Russian).
20. NCBI Standard Nucleotide BLAST. *NCBI*. Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (Accessed: 09.06.2016).
21. Colton L. M., Groza H. I., Wielgus S. M., Jiang J. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene RB derived from a wild potato species. *Crop Science*, 2006, vol. 46, pp. 589–594.
22. Cernak I. Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene Ry_{sto} , and the identification of new markers. *Acta Biologica Hungarica*, 2008, vol. 59, no. 2, pp. 195–203.

Информация об авторах

Левый Александр Васильевич – аспирант. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: a30413@mail.ru.

Воронкова Елена Васильевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Полюхович Юлия Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Ермишин Александр Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ermishin@igc.by.

Для цитирования

ДНК-маркеры генов устойчивости к фитофторозу и к Y-вирусу у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum* / А. В. Левый [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 46–54.

Information about the authors

Levy Alexander Vasilievich – Postgraduate student. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a30413@mail.ru.

Voronkova Elena Vasilievna – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Polyukchovich Yulija Vladimirovna – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Yermishin Alexander Petrovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetic and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ermishin@igc.by.

For citation

Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukchovich Y. V., Yermishin A. P. DNA-markers of late blight and Y resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 46–54.

С. А. Лабор¹, В. И. Степура², И. И. Степура¹, В. Ю. Смирнов³¹*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь*²*Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь*³*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь***ОКСОФЕРРИЛЬНЫЕ ФОРМЫ МИОГЛОБИНА
И ГЕМОГЛОБИНА В ПРИСУТСТВИИ ФЕНОЛСОДЕРЖАЩИХ
СОЕДИНЕНИЙ КАТАЛИЗИРУЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ
ТРАНСФОРМАЦИЮ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ**

С помощью спектрально-флуоресцентных методов и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показано, что после инкубации тиамина с миоглобином и пероксидом водорода в водном растворе образуются тиохром, оксодигидротиохром и тиаминдисульфид.

При добавлении тирозина или парацетамола в раствор метмиоглобина, пероксида водорода и тиамина резко повышается выход тиохрома, а выход оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида снижается. В присутствии высоких концентраций парацетамола или тирозина тиамин превращается в тиохром, а выход оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида полностью ингибируется.

Тиаминмонофосфат и тиаминдифосфат, в отличие от тиамина, стабильны и не окисляются даже после длительной инкубации в смеси с метмиоглобином и пероксидом водорода. Фосфорные эфиры тиамина не окисляются в соответствующие фосфаты тиохрома в отсутствие монофенолов.

Образование димеров тирозина, а также димеров и олигомеров парацетамола замедляется в присутствии тиамина и его фосфорных эфиров. Обсуждается механизм сопряженного окисления тиамина и его фосфорных эфиров с окислением монофенолов в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином и пероксидом водорода.

Ключевые слова: метмиоглобин, метгемоглобин, оксоферрильные формы, ферри-форма, оксодигидротиохром, тиаминдисульфид, тиохром, феноксильные радикалы, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат.

S. A. Labor¹, V. I. Stsiapura², I. I. Stepuro¹, V. Yu. Smirnov³¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus*²*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus*³*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus***IN THE PRESENCE OF PHENOL-CONTAINING COMPOUNDS OXOFERRYL
FORMS OF MYOGLOBIN AND HEMOGLOBIN CATALYZE OXIDATIVE TRANSFORMATION
OF THIAMINE AND ITS DERIVATIVES**

Using HPLC, absorption and fluorescence spectroscopy methods it was shown that incubation of thiamine with myoglobin and hydrogen peroxide in aqueous solution resulted in formation of thiochrome, oxodihydrothiochrome, and thiaminedisulfide.

If tyrosine or paracetamol are present in incubation mixture besides metmyoglobin, hydrogen peroxide, and thiamine we observed significant growth of thiochrome yield and formation of oxodihydrothiochrome and thiaminedisulfide decreased. At high excesses of paracetamol or tyrosine the production of oxodihydrothiochrome and thiamine disulfide were inhibited and thiochrome was the only product of thiamine oxidation.

In comparison to thiamine, its phosphate esters (thiamine monophosphate and thiamine diphosphate) are stable in presence of metmyoglobin and hydrogen peroxide and even prolonged times of incubation did not lead to their oxidative transformations. However, addition of monophenol compounds to the incubation mixture leads to oxidation of thiamine phosphate esters to the corresponding thiochrome phosphates.

From the other side, formation of tyrosine dimers and oligomers is lowered down in presence of thiamine and its phosphate esters. Mechanism of coupled oxidation of thiamine and its phosphate esters with oxidation of monophenols in peroxidase reaction catalyzed by metmyoglobin and hydrogen peroxide is discussed.

Keywords: myoglobin, hemoglobin, hemoprotein, oxoferryl form, ferri-form, oxodihydrothiochrome, thiaminedisulfide, thiochrome, metmyoglobin, methemoglobin, tyrosine radicals, thiaminpirofosfat, thiamin diphosphate.

Введение. Результаты многочисленных исследований показали, что при взаимодействии пероксида водорода с гемопротейнами, в том числе с миоглобинами и гемоглобинами, формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопротейнов, которые окисляют биомолекулы и инициируют перекисное окисление липидов [1, 2]. Пероксид водорода образуется в организме как вследствие прямой неэнзиматической реакции дисмутации супероксидов, так и в результате реакции, катализируемой СОД, а также генерируется аминоксидазой и глюкозооксидазой. Кроме того, постоянно образуют пероксид водорода макрофаги, клетки эндотелия. Перекисное окисление липидов сопровождается образованием органических пероксидов [3, 4].

Следует отметить, что оксоферрильные формы гемопротейнов могут образовываться не только в реакциях с пероксидами, но и при взаимодействии с пероксинитритом [5].

Стационарная концентрация пероксида водорода в крови вследствие разрушения каталазой и глутатионпероксидазой при нормальных условиях не превышает 0,2 нМ. Однако даже под действием этой низкой концентрации пероксида водорода метгемоглобин (или гемоглобин) постоянно окисляется с образованием оксоферрильной формы гемоглобина с радикалом, локализованным на белковой глобуле.

Обе оксоферрильные формы гемоглобина (соединение I и соединение II) [6] обнаружены в крови при физиологических условиях. Концентрация пероксида водорода в крови и тканях сильно возрастает при патологических состояниях, например при ишемии-реперфузии, и может достигать 10 мкМ и выше в сердечной мышце при ишемии [7].

Цель работы – изучение сопряженного пероксидазного окисления тиамин и фенольных соединений, катализируемого оксоферрильными формами миоглобина лошади и оксоферрильными формами гемоглобина человека.

Материалы и методы исследования. В работе использовали тиамин, тиохром тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, парацетамол и миоглобин из сердца лошади (фирма Sigma, США), аминокислоты: *L*- и *D*-тирозин, *D,L*-аргинин, *D,L*-гистидин, *D,L*-валин, *D,L*-фенилаланин, *L*-серин, *D*-аспарагиновая кислота, *D,L*-треонин, а также феррицианид и гемин (Fluka, США). Все другие реагенты высокой очистки производства России и Беларуси.

Продукты окислительной трансформации тиамин, полученные после инкубации тиамин с метмиоглобином в присутствии пероксида водорода, разделяли на индивидуальные соединения на хроматографе Agilent-1100, сорбент Zorbax-extend-C18.

Оксигемоглобин получали из свежей донорской крови по известному методу [8]. Количество оксигемоглобина в растворе определяли, используя молярные коэффициенты поглощения $\epsilon_{412} = 125\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ или $\epsilon_{542} = 14\,250 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. Метгемоглобин получали путем добавления 10–20-кратного молярного избытка феррицианида к оксигемоглобину. От избытка низкомолекулярных соединений отделялись методом гельфильтрации на сефадексе *G*-25. Концентрацию метгемоглобина определяли, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{630} = 3700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ (рН 7,2). Оксоферрильные формы гемоглобина получали, добавляя 100–1000-кратные молярные избытки пероксида водорода к метгемоглобину. Полоса Сорс метгемоглобина с максимумом при 407 нм ($\epsilon_{407} = 190\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) после добавления пероксида водорода смещалась до 418 нм ($\epsilon_{418} = 110\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$), рН 7,5. Концентрацию метгемоглобина и оксоферрильных форм гемоглобина в растворе определяли с помощью метода наименьших квадратов, разделяя спектр поглощения смеси на индивидуальные спектры. В качестве стандартов использовали спектры поглощения метгемоглобина и оксоферрильной формы гемоглобина. Концентрацию метмиоглобина в нейтральной или слабокислой среде определяли, измеряя оптическую плотность при 408 и 630 нм ($\epsilon_{408} = 188\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, $\epsilon_{630} = 3900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$), а при значении рН 9,5 использовали коэффициент поглощения для полосы Сорс с максимумом при 411 нм ($\epsilon_{411} = 119\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) [9]. Концентрацию оксоферрильных форм миоглобина определяли, измеряя поглощение при 421 нм ($\epsilon_{421} = 111\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) [10].

К раствору метмиоглобина (1–10 мкМ) добавляли 100–1000-кратный молярный избыток H_2O_2 в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0). После смешивания компонентов через 5–10 мин инкубации контролировали спектрофотометрически полноту образования оксоферрильной формы по положению полосы Сорс. Избыток H_2O_2 разрушали, добавляя в раствор каталазу.

Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения при 240 нм ($\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) [11], концентрацию пероксида водорода в водных растворах – добавляя избыток KI, концентрацию образовавшегося молекулярного йода – используя коэффициент молярной экстинкции $26\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

Дитиروزин получали путем добавления к 2 мМ тирозина 10 мкМ метмиоглобина и 2 мМ пероксида водорода. Реакцию проводили в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,5). После 30-минутной инкубации в реакционную смесь добавляли пероксид водорода и снова инкубировали при комнатной температуре. Образование дитиروزина контролировали спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{315} = 5000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ (pH 7,5) [12], а также флуоресцентным методом. Возбуждение флуоресценции проводили при длине волны 315 нм, а интенсивность флуоресценции измеряли при 410 нм [13].

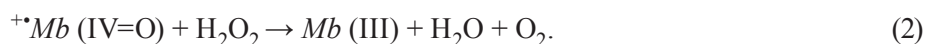
Концентрацию тиохрома определяли флуоресцентным методом (длина волны возбуждения 365 нм, длина волны флуоресценции 450 нм). В качестве стандарта использовали коммерческий тиохром фирмы Sigma (США) [14].

Измерения концентраций ферри- и оксоферрильных форм миоглобина и гемоглобина осуществляли на спектрофотометре Cary-100 (США), измерения бифенольной флуоресценции и флуоресценции тиохрома – на спектрофлуориметре CM2203 («Солар», Беларусь).

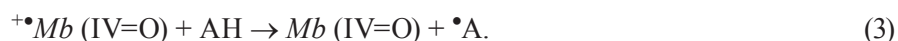
Результаты и их обсуждение. После смешивания метмиоглобина с пероксидом водорода наблюдали образование оксоферрильных форм миоглобина ${}^+Mb$ (IV=O) (соединение I), которые легко регистрируются спектрофотометрически [2]:



Один эквивалент окислителя расходуется на образование оксоферрильной формы гема (Mb (IV=O)), а другой эквивалент окислителя расходуется на образование порфиринового катиона π -радикала [15]. При избытке пероксида водорода относительно концентрации гемопротейна белок проявляет каталазную активность, т. е. оксоферрильная форма ${}^+Mb$ (IV=O) может реагировать с другой молекулой пероксида водорода с образованием метмиоглобина и кислорода (реакция 2):



В присутствии доноров электронов образуется соединение II:



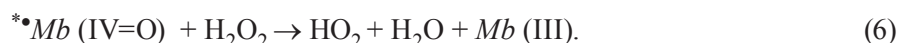
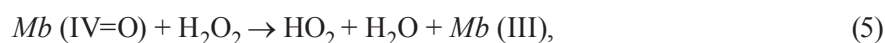
В отсутствие легкоокисляющихся субстратов AH, являющихся донорами электронов, происходит быстрый перенос электронов с аминокислотных остатков тирозина на порфирин-радикал с образованием тирозильных радикалов, которые аутоокисляются в долгоживущие орто-семихинонные радикалы тирозина. Тирозин-103 в миоглобине находится вблизи гема миоглобина и поэтому с наибольшей вероятностью образуется свободный радикал, центрированный на этом остатке [16]. Кроме того, вследствие внутримолекулярного переноса электрона на порфирин-радикал образуется свободный радикал на остатке тирозина-151 [17].

Позднее было показано, что пероксильный радикал формируется на 3-м атоме углерода индольного кольца остатка Trp-14 оксоферрильной формы [18].

Оксоферрильная форма миоглобина (соединение I), захватывает электрон с близлежащих функциональных групп с образованием свободнорадикальной формы метмиоглобина ${}^{\bullet}Mb$ (IV), у которой свободные радикалы центрированы на тирозильных или триптофанильных остатках:



При взаимодействии Mb (IV=O), а также ${}^{\bullet}Mb$ (IV=O) с пероксидом водорода образуются супероксид-анионы:



Образование супероксиданиона способно привести к деградации гема [19]. Коэффициент молярной экстинкции для полосы Соре оксоферрильных форм миоглобина ниже, нежели для полосы Соре метмиоглобина. Оксоферрильные формы миоглобина под действием пероксида водорода восстанавливались до метмиоглобина. Это приводит к расходованию пероксида водорода в реакциях взаимодействия с гемопротеином. Процесс восстановления оксоферрильных форм миоглобина в метмиоглобин под действием пероксида водорода описывается реакциями 2–6. После добавления пероксида водорода для метгемоглобина протекают такие же процессы, как и в случае метмиоглобина.

Нами показано, что в присутствии тиаминна наблюдается возрастание скорости трансформации оксоферрильных форм гемопротеинов в ферри-формы. Процесс восстановления оксоферрильных форм миоглобина или гемоглобина сопровождался окислением тиаминна с образованием тиохрома, оксидигидротиохрома и тиаминдисульфида. Результаты измерений для метмиоглобина представлены в табл. 1.

Таблица 1. Выход продуктов окисления тиаминна (Т) в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином (метМб), в зависимости от концентрации тиаминна и времени инкубации
Table 1. The yield of the products of oxidation of thiamine (T) in the peroxidase reaction catalyzed by metmyoglobin (metMb) depending on the concentration of thiamine and incubation time

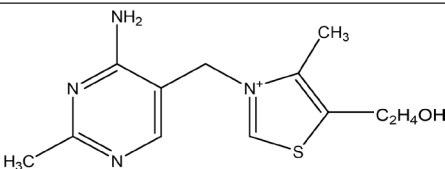
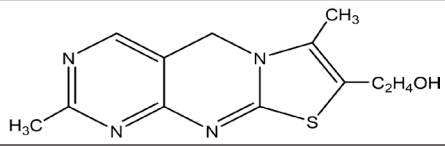
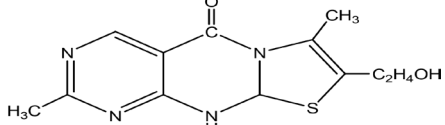
Состав раствора	Время инкубации, ч	ОДТх, мкМ	Тх или Тх-ФФ, мкМ
МетМб (10 мкМ) + Т (1 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,5	–	0,7
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,5	0,2	10
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	24	144	15
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + парацетамол (0,1 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,5	12	275
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + парацетамол (1,0 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,5	–	310
МетМб (10 мкМ) + тиаминдифосфат (0,1 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	2,0	–	> 0,15
МетМб (10 мкМ) + тиаминдифосфат (0,1 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ) + парацетамол (0,1 мМ)	2,0	–	6,82

Тиохром, оксидигидротиохром и тиаминдисульфид были идентифицированы методом восходящей хроматографии на бумаге и методом ВЭЖХ.

Время удерживания соединений-стандартов – тиохрома, оксидигидротиохрома, тиаминдисульфида – хорошо совпадало со временем удерживания соединений, полученных после инкубации тиаминна в растворах, содержащих метмиоглобин и пероксид водорода.

Структурные формулы тиаминна и продуктов окислительной трансформации тиаминна, а также их время удерживания при проведении хроматографии методом ВЭЖХ приведены в табл. 2.

Таблица 2. Структурные формулы тиаминна и продуктов его окислительной трансформации и соответствующее время их удерживания на ВЭЖХ хроматограмме
Table 2. Structural formulas of thiamine and products of its oxidative transformation. Retention times (R_t) of the compounds on HPLC chromatogram are also shown

Структурная схема	Название соединения
	Тиамин (Т) R _t = 9,72 мин
	Тиохром (Тх) R _t = 25,06 мин
	Оксидигидротиохром (ОДТх) R _t = 29,47 мин

Окончание табл. 2

Структурная схема	Название соединения
	Тиаминдисульфид (TS-ST) $R_t = 37,28$ мин
	Тиольная форма тиамин (TSH)
	Трициклическая форма тиамин (ТФТ)

Нами показано, что в присутствии тиамин скорость трансформации оксоферрильных форм гемопротеинов в ферри-формы возрастает. Тиохром обладает интенсивной флуоресценцией, поэтому его образование легко измерить флуоресцентным методом.

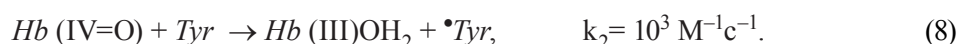
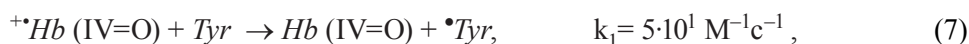
Однако выход тиохрома после инкубации тиамин с ферри-формами гемопротеинов в присутствии пероксида водорода был низок (см. табл. 1).

Тиаминмонофосфат и тиаминдифосфат практически не проникают в гемовый карман оксоферрильных форм гемопротеинов, и выход фосфатов тиохрома незначителен. В табл. 1 приведена концентрация образовавшегося тиохромдифосфата после инкубации в течение 2,0 ч тиаминдифосфата с пероксидом водорода и метмиоглобином.

После добавления фенола к водным растворам, содержащим тиамин и оксоферрильные формы гемопротеинов, резко возрастал выход тиохрома, который являлся в этом случае практически единственным продуктом, ответственным за флуоресценцию. При высоких концентрациях фенола выход тиохрома для раствора, содержащего тиамин, метмиоглобин и пероксид водорода, возрастал более чем в 120 раз по сравнению с растворами без фенола (рис. 1).

Тирозин и тирамин также на 1–2 порядка усиливали катаболизм тиамин (табл. 3). В спектре поглощения смеси, содержащей метмиоглобин, тиамин, *L*-тирозин и пероксид водорода, наблюдали образование тиохрома, который имел полосу поглощения при 365 нм в нейтральной среде (рис. 2). После добавления в раствор тирозина выход тиохрома возрастал от 0,15 до 5,8 мкМ (табл. 3).

Тирозин легко проникал в гемовый карман метгемоглобина и восстанавливал оксоферрильный катион в ферри-катион, а радикал, локализованный на порфириновом цикле, – до нейтральной молекулы порфирина [20]. В результате этих реакций молекула тирозина окислялся с образованием тирозильного радикала:



Ранее показано, что образование тиохрома происходит вследствие взаимодействия тирозильных радикалов с трициклической формой тиамин (ТФТ), а образование тиаминдисульфида – вследствие взаимодействия тирозильных радикалов с тиольной формой (TSH) тиамин (реакции 9 и 10) [2]:



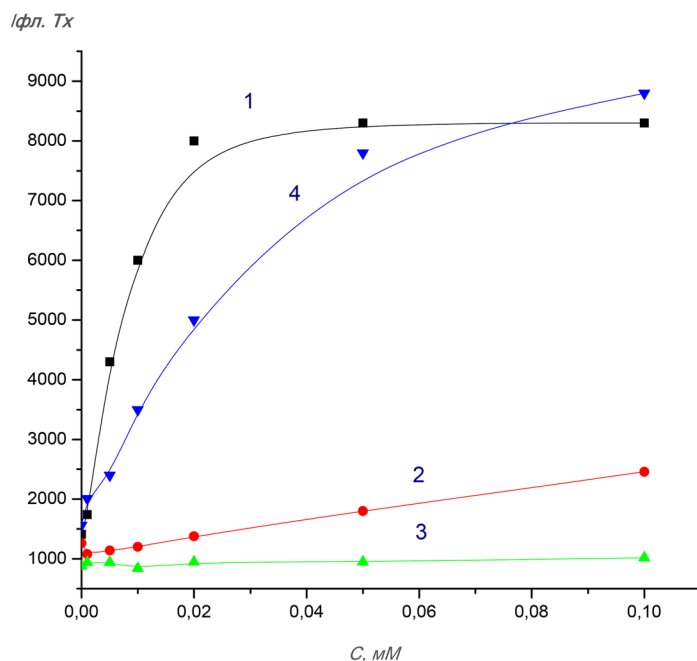


Рис. 1. Кинетика образования тиохрома после инкубации тиаминa с метмиоглобином, пероксидом водорода в зависимости от концентрации фенольных соединений в растворе. Концентрация метгемоглобина – 10 мкМ, тиаминa и пероксида водорода – 1,0 мМ. 1 – парацетамол, 2 – L-тирозин, 3 – салициловая кислота, 4 – фенол. Время инкубации растворов – 1 ч

Fig. 1. Dependence of thiochrome formation kinetics on concentration of phenolic compounds in solution. 1 mM thiamine was incubated with 10 μM metmyoglobin, 1 mM hydrogen peroxide and paracetamol (1), L-tyrosine (2), salicylic acid (3), or phenol (4). Incubation time of the solutions – 1 hour

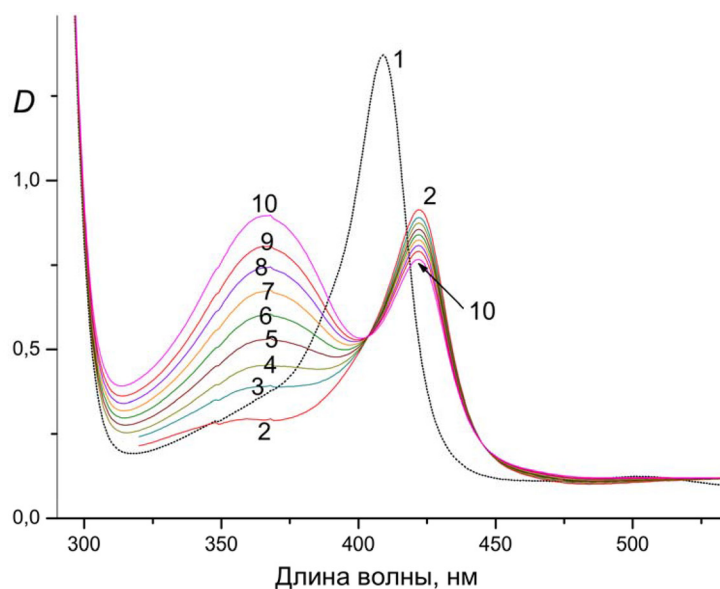


Рис. 2. Спектр поглощения смеси, содержащей метмиоглобин, тиамин, L-тирозин в отсутствие (1) и в присутствии (2–10) пероксида водорода в зависимости от времени инкубации раствора. Каждую последующую запись спектра поглощения раствора производили через 6 мин. Концентрации метмиоглобина – 10 мкМ, тиаминa – 1 мМ, тирозина – 1 мМ, пероксида водорода – 5 мМ (0,05 М калий фосфатный буфер, pH 7,5)

Fig. 2. Absorption spectrum of the mixture containing metmyoglobin, thiamine, L-tyrosine in the absence (1) and presence of hydrogen peroxide (2–10) depending on incubation time of the solution. Time interval between recordings of the absorption spectra – 6 min. 10 μM metmyoglobin was incubated with 1 mM thiamine, 1 mM tyrosine, 5 mM hydrogen peroxide in 0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.5

Таблица 3. Изменение выхода тиохрома после инкубации тиамин с гемоглобином, пероксидом водорода в присутствии фенольных соединений и аминокислот. Концентрация метгемоглобина – 1,0 мкМ, тиамин – 1,0 мМ, фенольного соединения или аминокислоты – 2,0 мМ, пероксида водорода – 2,0 мМ (рН растворов 7,0 ± 0,5)

Table 3. Thiochrome production after thiamine incubation with hemoglobin, hydrogen peroxide in the presence of phenolic compounds and amino acids. Concentration of metmyoglobin – 1.0 μM, thiamine – 1.0 mM, phenolic compounds or amino acids – 2.0 mM, hydrogen peroxide – 2.0 mM (pH 7.0 ± 0.5)

Состав инкубационной смеси	Выход тиохрома, мкМ
МетНб + тиамин + H ₂ O ₂	0,15
МетНб + тиамин + L-валин + H ₂ O ₂	0,15
МетНб + тиамин + DL-аргинин + H ₂ O ₂	0,11
МетНб + тиамин + ацетилсалициловая кислота + H ₂ O ₂	0,32
МетНб + тиамин + салициловая кислота + H ₂ O ₂	0,45
МетНб + тиамин + D-тирозин + H ₂ O ₂	5,80
МетНб + тиамин + тирамин + H ₂ O ₂	4,80
МетНб + тиамин + фенол + H ₂ O ₂	8,10
МетНб + тиамин + парацетамол + H ₂ O ₂	12,2
МетНб + тиамин + дофамин + H ₂ O ₂	0,01
МетНб + тиамин + кверцетин + H ₂ O ₂	0,02

В присутствии парацетамола, тирозина, фенола эффективно протекает также окисление фосфорных эфиров тиамин – тиаминмонофосфата и тиаминдифосфата в соответствующие тиохром фосфаты (табл. 1). Образование фосфатов тиохрома протекает под действием феноксильных радикалов. Поэтому низкая проницаемость фосфатов тиамин совершенно не сказывается на скорости их окисления в соответствующие фосфаты тиамин в присутствии монофенолов. Например, выход тиохром фосфатов, образованных в растворе после инкубации тиаминдифосфата с миоглобином и пероксидом водорода и парацетамолом, сравним по порядку величин с выходом тиохрома, образованного после инкубации тиамин с миоглобином, пероксидом водорода и парацетамолом (табл. 1, 3).

Тирозильные радикалы взаимодействуют между собой и образуют димер – дитирозин (реакция 11):



Структурная формула дитирозина приведена на рис. 3. На спектре поглощения дитирозина в нейтральной и щелочной средах длинноволновой максимум расположен при 315 нм (рис. 4).

Ранее методом ВЭЖХ нами показано, что низкие концентрации метмиоглобина в присутствии пероксида водорода катализируют полимеризацию парацетамола [21]. Реакция полимеризации парацетамола, в отличие от тирозина, не останавливается на стадии образования димеров. Кроме димеров происходит образование тримеров, тетрамеров парацетамола, что сопровождается снижением выхода флуоресценции и длинноволновым сдвигом максимума поглощения в абсорбционном спектре реакционной смеси. Молекулярные веса димеров и олигомеров парацетамола определены с использованием с квадрупольно-времяпролетного tandemного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 в режиме ионизации-электрораспыления (ESI) [21].

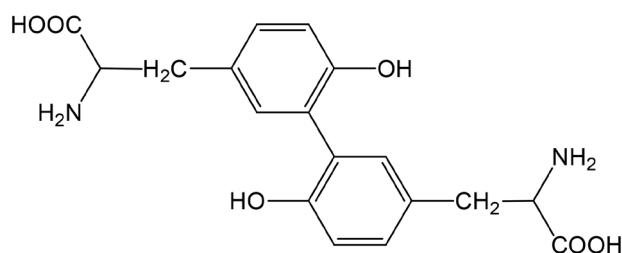


Рис. 3. Структурная формула дитирозина

Fig. 3. Dityrosine structure

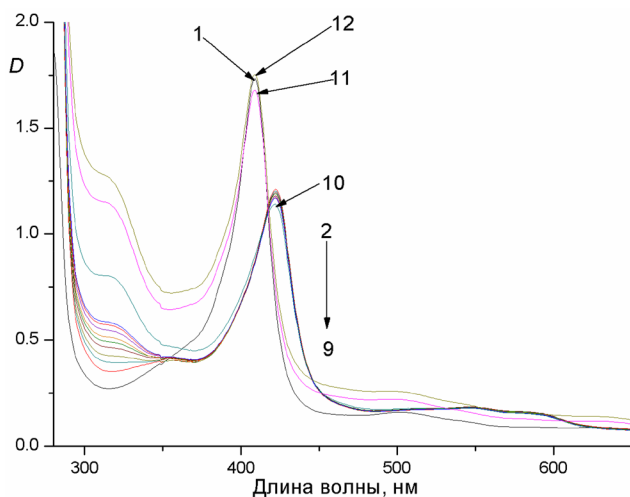


Рис. 4. Спектры поглощения метмиоглобина и тирозина до (1) и после (2–12) смешивания с пероксидом водорода.

Интервалы записи спектров поглощения:

2–9 – через 5 мин, 10 – через 2 ч, 11 – через 4 ч, 12 – через сутки. Концентрация метмиоглобина – 10 мкМ, тирозина – 4 мМ, H_2O_2 – 1 мМ

Fig. 4. Absorption spectra of 10 μ M metmyoglobin and 4 mM tyrosine before (1) and after mixing with 1 mM hydrogen peroxide (2–12). Absorption spectra 2–9 were recorded with time interval 5 min, 10 – 2 hours, 11 – 4 hours, 12 – 24 hours

окислительных превращений даже после длительной инкубации в смеси с метмиоглобином и пероксидом водорода. Образование тиохром-фосфатов наблюдали только после инкубации фосфорных эфиров тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода в присутствии парацетамола или других монофенолов (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 4. Уменьшение выхода дитирозина после инкубации тиамин с миоглобином, пероксидом водорода в зависимости от концентрации тиамин в растворе. Концентрация метмиоглобина – 1,0 и 10,0 мкМ, L-тирозина – 1,0 мМ, пероксида водорода – 1,0 мМ (pH 7,0 \pm 0,5)

Table 4. Decrease in dityrosine formation after thiamine incubation with myoglobin, hydrogen peroxide, depending on concentration of thiamine in the solution. Concentration of metmyoglobin – 1.0 and 10.0 μ M, L-tyrosine – 1.0 mM, hydrogen peroxide – 1.0 mM (pH 7.0 \pm 0.5)

Состав раствора	Концентрация дитирозина, мкМ	Концентрация тиохрома, мкМ	Концентрация тиамин-дисульфида
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + H_2O_2 (1 мМ)	72	–	
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (0,01 мМ) + H_2O_2	69	1,5	0,1
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (0,1 мМ) + H_2O_2	58	7,5	2,0
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (0,5 мМ) + H_2O_2	49	22,5	10,0
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (1,0 мМ) + H_2O_2	29	35	19
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (5,0 мМ) + H_2O_2	11	60	90
МетМб (10 мкМ) + Т (1 мМ) + H_2O_2		0,45	

Мы предполагаем, что в окисление тиамин до тиохрома и тиаминдисульфида вносят небольшой вклад также и тирозильные радикалы, локализованные на поверхности белковой глобулы. Тирозильные радикалы образуются вследствие внутримолекулярного переноса электрона с тирозильных остатков белковых макромолекул к свободным радикалам, локализованным на порфириновых циклах гема. В результате внутримолекулярного переноса электрона порфириновые радикалы восстанавливаются, а на белке возникают долгоживущие тирозильные радикалы. Последние, вероятно, ответственны за образование следовых количеств тиохромдифосфата в отсутствие в реакционной смеси монофенола (табл. 1, предпоследняя строка).

Димеры парацетамола в основном ответственны за бифенильную флуоресценцию ($\lambda_{\text{воз}} = 325$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 425$ нм). Эти результаты находятся в хорошем соответствии с ранее полученными данными об ускорении полимеризации парацетамола под действием пероксидазы хрена и пероксида водорода [22].

Тиамин и его фосфорные эфиры в свою очередь ингибировали образование дитирозина или димеров и олигомеров фенольных соединений, например парацетамола [19, 21]. Выход дитирозина в присутствии тиамин снижался (табл. 4). Снижение образования дитирозина и возрастание выхода тиохрома свидетельствует о том, что в регенерации тирозильных радикалов наряду с тиольной формой тиамин участвует трициклическая форма тиамин, которая окисляется в тиохром.

Полученные результаты позволяют заключить, что вход тиамин в гемовый карман оксоферрильных форм гемопротеинов затруднен. Тиамин-монофосфат и тиаминдифосфат, в отличие от тиамин, еще более стабильны и практически не испытывают

Нами установлено, что пероксидазное окисление тиамин в присутствии монофенолов характеризуется большим ростом скорости окисления тиамин, в то время как в присутствии биофлавоноидов наблюдается четко выраженное ингибирование окисления тиамин. Например, отмечается активация пероксидазного окисления тиамин для фенолов, тирозина, тирамина, салициловой кислоты, парацетамола. Фенол, парацетамол, тирозин, тирамин на 1–2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин под действием оксоферрильных форм миоглобина или оксоферрильных форм гемоглобина. В данном случае реализуется регенерация фенола и других монофенольных соединений за счет окисления тиамин и его производных (реакции 8, 9).

Монофенольные соединения выступают в роли челноков, обеспечивая перенос электронов от тиольной и трициклической форм тиамин к оксоферрильному комплексу гема (реакции 7–10). При достаточно высокой концентрации тиамин (более 5 мМ) образования дитирозина не наблюдали. В этих условиях тирозильные радикалы полностью восстанавливались до молекул тирозина вследствие реакций 7 и 8.

В присутствии монофенольных соединений блокируется протекание реакций двухэлектронного окисления и оксодигидротирохром не образуется (табл. 1). Тирохром образуется вследствие протекания одноэлектронных реакций с радикалами тирозина или радикалами парацетамола (реакция 9).

В качестве челноков выступают также молекулы диоксида азота, обеспечивающие перенос электронов от тиольной и трициклической форм тиамин до оксоферрильного комплекса гема [23].

Кверцетин, диоксифенилаланин (ДОФА), биофлавоноиды, напротив, полностью ингибируют окисление тиамин (табл. 3). Высокая ингибирующая эффективность ДОФА, а также кверцетина, рутина и других биофлавоноидов отражает, во-первых, их большую реакционную способность при взаимодействии с оксоферрильным катионом гема, нежели у монофенолов. Под действием бифенолов очень эффективно происходит восстановление оксоферрильных форм гемопroteинов в ферри-формы. Во-вторых, свободные радикалы кверцетина, биофлавоноидов, вероятно, не способны регенерироваться за счет окисления молекул тиамин и поэтому для них не характерно сопряженное окисление совместно с тиамином.

Заключение. В данной работе нами показано, что при взаимодействии пероксида водорода с ферри-формами миоглобина лошади и гемоглобина человека формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопroteинов, которые окисляют тиамин до тирохрома, оксодигидротирохрома и тиаминдисульфида. Фенольные соединения на 1–2 порядка увеличивают выход тирохрома, но при высоких концентрациях практически полностью ингибируют окисление тиамин а образованием оксодигидротирохрома.

Полученные результаты позволяют заключить, что при окислительном стрессе, когда резко возрастают уровни активных форм кислорода и оксоферрильных форм гемопroteинов, монофенольные соединения усиливают катаболизм тиамин и тиаминдифосфата, окисляя их в тирохром и тиаминдисульфид и соответствующие фосфорные эфиры тирохрома или фосфорные эфиры дисульфида тиамин.

Снижение концентрации тиаминдифосфата при окислительном стрессе может вызывать ингибирование активности тиамин-зависимых ферментов и вносить дополнительный вклад в развитие патофизиологических процессов при окислительном стрессе.

Следовательно, при применении фенольных соединений, в том числе лекарств, содержащих монофенольные структуры (например парацетамола, особенно при длительном его использовании), необходимо дополнительное поступление в организм тиамин или его производных как для снижения токсического действия свободных радикалов парацетамола и продуктов его метаболизма, так и для ускорения разрушения пероксидов водорода и возмещения концентрации тиамин, окисленного в тирохром.

Список использованных источников

1. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа / К. Б. Шумаев [и др.] // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 5. – С. 699–705.
2. Тиамин ингибирует образование дитирозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина / А. И. Степура [и др.] // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 9. – С. 1281–1293.

3. Boveris, A. The cellular production of hydrogen peroxide / A. Boveris, N. Oshino, B. Chance // *Biochem. J.* – 1972. – Vol. 128, N 3. – P. 617–630.
4. Boveris, A. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen / A. Boveris, B. Chance // *Biochem. J.* – 1973. – Vol. 134, N 3. – P. 707–716.
5. Exner, M. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite – mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin / M. Exner, S. Herold // *Chem. Res. in Toxicol.* – 2000. – Vol. 13, N 4. – P. 287–293.
6. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood / D. A. Svistunenko [et al.] // *J. of Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 11. – P. 7114–7121.
7. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiol. Rev.* – 1979. – Vol. 59, N 3. – P. 527–605.
8. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin / R. Benesch [et al.] // *Biochemistry.* – 1972. – N 11. – P. 3576–3582.
9. Antonini, E. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands / E. Antonini, M. Brunori. – Amsterdam: North-Holland Pub. Co., 1971. – 436 p. (Frontiers of Biology; vol. 21).
10. Fenwick, C. pH and driving force dependence of intramolecular oxyferryl heme reduction in myoglobin / C. Fenwick, A. M. English, J. F. Wishart // *J. of the Am. Chem. Soc.* – 1997. – Vol. 119, N 20. – P. 4758–4764.
11. Ostdal, H. Reduction of ferrimyoglobin by b-lactoglobulin / H. Ostdal, B. Daneshvar, L. H. Skibsted // *Free Radical Res.* – 1996. – Vol. 24, N 6. – P. 429–438.
12. Bayse, G. S. The peroxidase-catalyzed oxidation of tyrosine / G. S. Bayse, A. W. Michaels, M. Morrison // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Enzymol.* – 1972. – Vol. 284, N 1. – P. 34–42.
13. Anderson, S. O. Covalent cross-links in a structural protein, resilin / S. O. Anderson // *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum.* – 1966. – Vol. 263. – P. 1–83.
14. Stepuro, I. I. Thiamine and vasculopathies / I. I. Stepuro // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* – 2005. – Vol. 72, N 2. – P. 115–127.
15. Raven, E. L. Chemical reactivity of the active site of myoglobin / E. L. Raven, A. G. Mauk // *Adv. Inorg. Chem.* – 2001. – Vol. 51. – P. 1–49.
16. Tew, D. The myoglobin protein radical coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H₂O₂-mediated cross-linking of sperm whale myoglobin / D. Tew, P. R. O. de Montellano // *J. of Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, N 33. – P. 17880–17886.
17. Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin / R. M. Gunther [et al.] // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 330, N 3. – P. 1293–1299.
18. Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide / J. A. De Gray [et al.] // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 272, N 4. – P. 2359–2362.
19. Stepuro, I. I. Oxidized thiamine derivatives. Mechanisms of formation under exposure to reactive nitrogen and oxygen species and in hemoprotein – catalyzed reactions / I. I. Stepuro, V. I. Stepuro. – [S. l.]: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014. – 280 p.
20. Herold, S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite / S. Herold // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2004. – Vol. 36, N 5. – P. 565–579.
21. Лабор, С. А. Механизм окисления тиамин и его фосфорных эфиров в псевдопероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином, в присутствии парацетамола / С. А. Лабор // *Белорусские лекарства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 17–18 нояб. 2016 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние химии и наук о Земле, Ин-т биоган. химии Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: С. А. Усанов, Е. Н. Калинин, П. Т. Петров. – Минск, 2016. – С. 116–123.*
22. Potter, D. W. Identification of acetaminophen polymerisation products catalysed by horseradish peroxidase / D. W. Potter, D. W. Miller, J. A. Hinson // *Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 290. – P. 12174–12180.
23. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide / I. I. Stepuro [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 2012. – Vol. 77, N 1. – P. 41–55.

References

1. Shumaev K. B., Petrova N. E., Zabbarova I. V., Topunov A. F., Lankin V. Z., Ruuge E. K. Interaction of oxoferrylmyoglobin and dinitrozyl iron complexes. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, vol. 69, no. 5, pp. 699–705. (in Russian).
2. Stepuro A. I., Adamchuk R. I., Oparin A. Yu., Stepuro I. I. Thiamine inhibits formation of dityrosine, a specific marker of oxidative injury, in reactions catalyzed by oxoferryl forms of hemoglobin. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, vol. 73, no. 9, pp. 1281–1293. (in Russian).
3. Boveris A., Oshino N., Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 1972, vol. 128, no. 3, pp. 617–630.
4. Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 1973, vol. 134, no. 3, pp. 707–716.
5. Exner M., Herold S. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite – mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Chemical Research in Toxicology*, 2000, vol. 13, no. 4, pp. 287–293.
6. Svistunenko D. A., Patel R. P., Voloshchenko S. V., Wilson M. T. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no. 11, pp. 7114–7121.
7. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 1979, vol. 59, no. 3, pp. 527–605.
8. Benesch R., Benesch E., Renthall R., Maeda N. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry*, 1972, no. 11, pp. 3576–3582.

9. Antonini E., Brunori M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. Amsterdam, Nort-Holland Pub. Co., 1971, 436 p., Frontiers of Biology, vol. 21.
10. Fenwick C. W., English A. M., Wishart J. F. pH and driving force dependence of intramolecular oxyferryl heme reduction in myoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, vol. 119, no. 20, pp. 4758–4764.
11. Ostdal H., Daneshvar B., Skibsted L. H. Reduction of ferrimyoglobin by b-lactoglobulin. *Free Radical Research*, 1996, vol. 24, no. 6, pp. 429–438.
12. Bayse G. S., Michaels A. W., Morrison M. The peroxidase-catalyzed oxidation of tyrosine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1972, vol. 284, no. 1, pp. 34–42.
13. Anderson S. O. Covalent cross-links in a structural protein, resilin. *Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum*, 1966, vol. 263, pp. 1–83.
14. Stepuro I. I. Thiamine and vasculopathies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, vol. 72, no. 2, pp. 115–127.
15. Raven E. L., Mauk A. G. Chemical reactivity of the active site of myoglobin. *Adv. Inorg. Chem.*, 2001, vol. 51, pp. 1–49.
16. Tew D., de Montellano P. R. O. The myoglobin protein radical coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H202-mediated cross-linking of sperm whale myoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, vol. 263, no. 33, pp. 17880–17886.
17. Gunther R. M., Tschirret-Guth R. A., Witkowska H. E., Fann C. Y., Barr P. D., De Montellano P. R. O., Mason P. R. Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin. *Biochemical Journal*, 1988, vol. 330, no. 3, pp. 1293–1299.
18. DeGray J. A., Gunther M. R., Tschirret-Guth R., de Montellano P. R. O., Mason R. Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 1997, vol. 272, no. 4, pp. 2359–2362.
19. Stepuro I. I., Stepuro V. I. Oxidized thiamine derivatives. Mechanisms of formation under exposure to reactive nitrogen and oxygen species and in hemoprotein – catalyzed reactions, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014, 280 p.
20. Herold S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, vol. 36, no. 5, pp. 565–579.
21. Labor S. A., Stepuro V. I., Smirnov V. Yu., Stepuro I. I., Shuriberko A. V., Yancevich A. V. Mechanism of oxidation of thiamine and its phosphate esters in pseudoperoxidase reaction catalyzed by metmyoglobin in the presence of paracetamol. *Materialy Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. "Belorusskie lekarstva"* [Materials International Scientific and Practical Conference "Belarus drugs"], Minsk, 2016, pp. 116–123. (in Russian).
22. Potter D. W., Miller D. W., Hinson J. A. Identification of acetaminophen polymerisation products catalysed by horseradish peroxidase. *Biological Chemistry*, 1985, vol. 290, pp. 12174–12180.
23. Stepuro I. I., Oparin A. Y., Stsiapura V. I., Maskevich S. A., Titov V. Y. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide. *Biochemistry (Moscow)*, 2012, vol. 77, no. 1, pp. 41–55.

Информация об авторах

Лабор Светлана Алексеевна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: swet.labor2010@yandex.by.

Степура Виталий Иванович – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник, доцент. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: stsiapura@gmail.com.

Степура Иван Иванович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, доцент. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: scepura@gmail.com.

Смирнов Виталий Юрьевич – ст. науч. сотрудник, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vit_sm@mail.ru.

Для цитирования

Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамин и его производных / С. А. Лабор [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 55–65.

Information about the authors

Labor Svetlana Alekseevna – Postgraduate student, Junior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK, 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: swet.labor2010@yandex.by.

Stsiapura Vitali Ivanovich – Ph. D. (Phys. and Math.), Leading researcher, Assistant Professor. Yanka Kupala Grodno State University (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: stsiapura@gmail.com.

Stepuro Ivan Ivanovich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher, Assistant Professor. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK, 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: scepura@gmail.com.

Smirnov Vitaly Yurjevich – Senior Researcher, Assistant Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vit_sm@mail.ru.

For citation

Labor S. A., Stsiapura V. I., Stepuro I. I., Smirnov V. Yu. In the presence of phenol-containing compounds oxoferryl forms of myoglobin and hemoglobin catalyze oxidative transformation of thiamine and its derivatives. *Vestsi Natsy-anal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 55–65.

Д. В. Дубовик¹, А. Н. Скуратович¹, Д. Миллер², Е. В. Спиридович³, Ю. К. Виноградова⁴

¹Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,

Минск, Республика Беларусь

²Ландшафтный Арборетум Университета Миннесоты, Часка, Миннесота, США

³Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

⁴Главный ботанический сад Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

ЧУЖЕРОДНАЯ ФРАКЦИЯ ФЛОРЫ НА ПЛАНТАЦИЯХ КЛЮКВЫ КРУПНОПЛОДНОЙ *OXYCOCCUS MACROCARPOS* (AIT.) PURSH В БЕЛАРУСИ

Проведена оценка устойчивости во вторичном ареале выявленных ранее чужеродных видов клюквы крупноплодной и действенности предпринимаемых мер контроля их расселения на плантациях в двух районах Брестской области. Из 23 новых для флоры Беларуси чужеродных видов после 3 лет планомерных работ по их искоренению (2011–2014) у 3 видов сократилась численность популяции, у 7 она сохранилась стабильно низкой, у 10 – стабильно высокой, а 3 вида, у которых увеличилась численность популяции, вселились в естественные фитоценозы. После усиления мер борьбы в течение 2015–2016 гг. численность всех новых чужеродных видов существенно снизилась. Наибольшей устойчивостью отличаются *Persicaria sagittata* и *Lycopus uniflorus*, проективное покрытие которых на некоторых чеках и в близлежащем заболоченном лесу достигает 40 %.

Ключевые слова: инвазия, чужеродные виды растений, плантации клюквы, Беларусь.

D. V. Dubovik¹, A. N. Skuratovich¹, D. R. Miller², E. V. Spiridovich³, Yu. K. Vinogradova⁴

¹V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²University of Minnesota Landscape Arboretum, Chaska, Minnesota, USA

³Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

⁴Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

ALIEN SPECIES ON PLANTATIONS *OXYCOCCUS MACROCARPOS* (AIT.) PURSCH IN BELARUS

Invasive potential and control effectiveness were evaluated on 23 North American alien weed species within plantations of American cranberry (*Oxycoccus macrocarpos*) in two districts of the Brest region in Belarus. Among the 23 alien species, after three years (2011–2014) of control efforts, 3 species have reduced their populations, 7 have maintained stable low populations, 10 have retained consistently high populations, and 3 species have increased population size and moved into natural plant communities. As a result of intensification of control measures in 2015–2016 the number of invasive alien species was reduced considerably. However, *Persicaria sagittata* and *Lycopus uniflorus* demonstrated resistance to the control measures and their projected cover within plantations and wet peat land forest communities could reach 40 % in certain areas.

Keywords: invasion, alien species, cranberry, *Oxycoccus*, *Vaccinium*, Belarus.

Введение. В США клюкву крупноплодную *Oxycoccus macrocarpos* (Ait.) Pursh (= *Vaccinium macrocarpon* Ait.) культивируют уже более 200 лет. На клюквенных плантациях, основные из которых сосредоточены в штатах Висконсин, Массачусетс и Нью-Джерси, отмечено 179 сорных аборигенных видов растений [1]. В Висконсине к наиболее опасным сорнякам клюквы относятся *Lysimachia terrestris*, *Solidago* spp., *Rubus hispidus*, *Populus deltoides*, *Eupatorium maculatum* и 7 таксонов комплекса *Hypericum* spp. [2]. В штате Массачусетс в качестве злостных засорителей культуры помимо упомянутых сорняков отмечены *Cuscuta gronovii* и *Toxicodendron radicans* [3], а в штате Нью Джерси экономический ущерб причиняют *Apios americana*, *Erechtites hieracifolia*, *Bidens frondosa*, *Solidago* spp., *Aster* spp., *Cuscuta* spp., *Lysimachia terrestris*, *Acer rubrum* [4].

Борьба с фитопатогенами и сорняками на американских плантациях клюквы ведется постоянно. За вегетационный сезон менеджеры по защите растений должны давать заключение о состоянии насаждений не менее 14 раз [5, 6]. Для уничтожения сорняков используются гербициды. Отмечен положительный эффект глифосата и тербацила в борьбе с аборигенными видами *Aster subspicatus* Nees, *Spiraea douglasii* C., *Carex vesicaria* L. [6]. В последнее время в Нью-Джерси испытывается экспериментальный гербицид последнего поколения ВКС-АА10717 фирмы Bayer [4].

Первые опытные плантации клюквы на территории бывшего СССР были заложены в Ганцевичском районе Беларуси в 1980 г. из материала ботанических садов, а через 2 года для закладки промышленной плантации черенки были закуплены уже непосредственно в штате Висконсин. В 2010–2013 гг. в Беларуси на промышленных плантациях клюквы крупноплодной Д. Дубовиком, А. Скуратовичем и, независимо от них, М. Джусом [7–9] обнаружен комплекс чужеродных видов растений североамериканского происхождения, диаспоры которых (семена и вегетативные части) были непреднамеренно занесены из США с посадочным материалом. Из примерно 40 североамериканских сорняков 22 явились новыми для флоры Беларуси, из них 16 – новыми натурализовавшимися видами для флоры Европы [7].

К новым для флоры Европы отнесены: *Aster ontarionis* Wiegand., *Campanula aparinoides* Pursch., *Cicuta bulbifera* L., *Eleocharis obtusa* (Willd.) Schult., *Eutrochium maculatum* (L.) E. E. Lamont (= *Eupatorium maculatum* L., *E. dubium* auct. non Willd.), *Hypericum boreale* (Britton) E. P. Bicknell (*H. mutilum* L. s. l.), *Hypericum ellipticum* Hook., *Juncus brevicaudatus* (Engelm.) Fernald., *Lycopus uniflorus* Michx. (*L. virginicus* auct. non L.), *Lysimachia terrestris* (L.) Britton, Sterns et Poggenb., *Myriophyllum farwellii* Morong, *Penthorum sedoides* L., *Persicaria sagittata* (L.) H. Gross (*Truellum sagittatum* (L.) Soják), *Stellaria longipes* Goldie, *Triadenum fraseri* (Spach) Gleason (*Hypericum fraseri* (Spach) Steud), *Viola pallens* (Banks ex Ging.) Brainerd. (рис. 1).

К новым для флоры Беларуси видам, помимо перечисленных выше, относятся *Agrostis scabra* Willd. (*A. hyemalis* auct. non (Walt.) Britt.), *Carex crawfordii* Fernald, *Hypericum canadense* L., *Ludwigia palustris* (L.) Elliott, *Scirpus cyperinus* (L.) Kunth. и *Solidago graminifolia* (L.) Salisb. = *Euthamia graminifolia* (L.) Nutt. В 2015–2016 гг. на Ганцевичской НЭБ «Журавинка» (за пределами

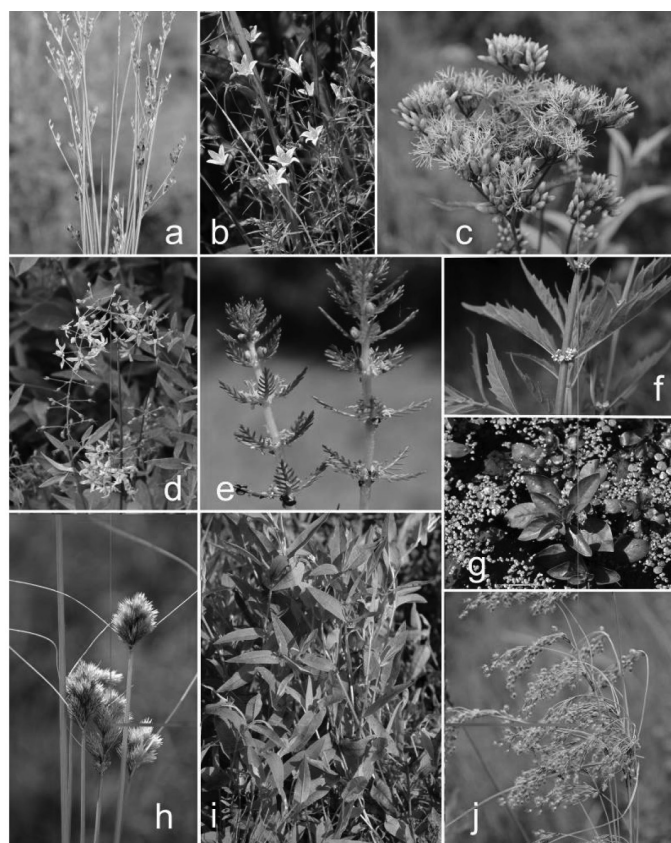


Рис. 1. Чужеродные североамериканские виды: а – *Juncus brevicaudatus*; б – *Campanula aparinoides*; в – *Eutrochium maculatum*; д – *Lysimachia terrestris*; е – *Myriophyllum farwellii*; ф – *Lycopus uniflorus*; г – *Ludwigia palustris*; h – *Carex crawfordii*; i – *Persicaria sagittata*; j – *Scirpus cyperinus*

Fig. 1. Alien species of North American: а – *Juncus brevicaudatus*; б – *Campanula aparinoides*; в – *Eutrochium maculatum*; д – *Lysimachia terrestris*; е – *Myriophyllum farwellii*; ф – *Lycopus uniflorus*; г – *Ludwigia palustris*; h – *Carex crawfordii*; i – *Persicaria sagittata*; j – *Scirpus cyperinus*

чеков) отмечен еще один новый для Беларуси заносный таксон многолетних американских астр (предположительно *гибрид* *A. lanceolatus* Willd. × *A. dumosus* L.)

Установлено [7], что конкурентные взаимоотношения этих видов с аборигенными таксонами пока слабые и значительная часть выявленных растений не распространяется за пределы плантаций, однако некоторые из них обладают высоким инвазионным потенциалом и в дальнейшем могут расселиться не только в республике, но и в сопредельных странах. Руководителям хозяйств были даны научные рекомендации по борьбе с наиболее агрессивными чужеродными видами. По рекомендации ученых на плантациях несколько лет проводили планомерные работы по искоренению чужеродных растений: пескование, ручную прополку, затопление, обработку гербицидами. Для химической обработки использовали агрегат, который «прокатывался» над чеком и смазывал Раундапом те сорные растения, которые превосходили клюквенный «ковер» по высоте. Верхняя часть побега с точкой роста у сорняков таким образом «выжигалась», но непосредственно на клюкву гербицид не попадал. Однако борьба с сорняками идет с переменным успехом.

Объекты и методы исследования. В июле 2014 г. члены Комиссии по инвазионным видам растений Совета ботанических садов России и Беларуси во время экспедиционного выезда участников международного семинара «Стратегия и методы ботанических садов по сохранению и устойчивому использованию биоразнообразия природной флоры-II» (авторы данной статьи) собрали гербарный материал (MSK, MSKH) и провели общую оценку устойчивости выявленных ранее чужеродных видов и действенность предпринимаемых мер контроля их расселения на Ганцевичской научно-экспериментальной базе «Журавинка» ЦБС НАН Беларуси (Ганцевичский район Брестской области; 52°45'42" с. ш., 26°25'40" в. д.) и в ОАО «Полесские журавины» (Пинский район Брестской области; 52°18'29" с. ш., 26°42'07" в. д.). В 2016 г. плантацию Ганцевичской НЭБ обследовали дважды – в июле и сентябре.

Исследования проводили маршрутным методом, обследовали непосредственно чеки с клюквой, борта чековых каналов и прилегающие к плантациям участки, где ранее производилось складирование остатков после очистки клюквы. Особое внимание уделялось участкам, где ранее Д. Дубовиком, А. Скуратовичем были обнаружены чужеродные виды североамериканского происхождения. Динамику численности видов определяли по отсутствию/присутствию их на описанном ранее участке, по расширению площади популяции и по появлению на плантации новых инициальных микропопуляций. Общее проективное покрытие рассчитывали как среднее из проективного покрытия видов на 14 чеках размером 1 га каждый.

В 2014 г. на Ганцевичской НЭБ за пределами плантации заложены пробные площадки размером 1×1 м со 100 %-ным проективным покрытием для каждого из 3 модельных таксонов: *Aster lanceolatus* × *A. dumosus*, *Persicaria sagittata* и *Lycopus uniflorus*. В июле и сентябре 2016 г. на этих площадках (по 3 для каждого вида) проведена оценка численности «сбежавших» в естественный фитоценоз видов.

Определение растений проведено с помощью ключей американских «Флор» [9, 10]. Названия видов приведены согласно базе данных Tropicos (www.tropicos.org). Правильность определения североамериканских видов подтвердил участвующий в экспедиционном выезде доктор Даниэль Миллер, специалист по сорным растениям. Собранные гербарные образцы приведенных в статье видов хранятся в Гербарии Института экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (MSK) и в гербарии Центрального ботанического сада НАН Беларуси (MSKH), небольшая часть дублетов передана в Гербарий БИН РАН (LE) и Гербарий ГБС РАН (MHA).

Результаты и их обсуждение. Все новые для региона чужеродные виды можно считать довольно устойчивыми: за 5 лет наблюдений ни один из них не выпал. Хотя некоторые таксоны после применяемых мер борьбы и представлены лишь единичными особями, они смогли сформировать банк семян в почве, поскольку ежегодно появляются то на одном, то на другом чеке, меняя локализацию в соответствии с датой проведения последней обработки. Часть видов смогли «ускользнуть» за пределы плантаций и закрепиться лишь там.

Наблюдается динамика численности отмеченных ранее чужеродных видов в обоих изученных локалитетах. Только 9 из 22 выявленных североамериканских видов произрастают на обеих плантациях (*Cicuta bulbifera*, *Lycopus uniflorus*, *Lysimachia terrestris*, *Persicaria sagittata*, *Triadenum fraseri*, *Viola pallens*, *Agrostis scabra*, *Carex crawfordii*, *Scirpus cyperinus*), причем их обилие

и численность варьируются по годам. Только в локалитете на Ганцевичской НЭБ отмечены *Campanula aparinoides*, *Aster lanceolatus* × *A. dumosus*, *Eutrochium maculatum* и *Juncus breviacaudatus*, тогда как в Пинском районе встречены *Eleocharis obtusa*, *Hypericum ellipticum*, *H. boreale*, *H. canadense*, *Myriophyllum farwellii*, *Penthorum sedoides*, *Stellaria longipes*, *Ludwigia palustris*, *Solidago graminifolia* и *Aster ontarionis*.

Кроме явно заносных растений (непосредственно из Северной Америки) на обеих этих плантациях растут и другие чужеродные североамериканские виды (*Conyza canadensis* (L.) Cronq., *Solidago canadensis* L., *Bidens frondosa* L., *B. connata* Willd., *Epilobium adenocaulon* Hausskn., *E. pseudorubescens* Skvortz., *Juncus tenuis* Willd., *Erechtites hieracifolius* (L.) Raf. ex DC., *Elodea nuttallii* (Planchon) St. John, *Lemna turionifera* Landolt, *Xanthoxalis stricta* (L.) Small и др.), которые в Беларуси распространены уже довольно широко. Факт попадания их сюда с посадочным материалом дискусионен, возможно, они распространились из сопредельных территорий. Однако такие виды, как *Spiraea alba* Du Roi и *S. tomentosa* L., вряд ли могли распространиться таким путем, поскольку на соседних территориях они в качестве заносных растений не встречаются, появление их с посадочным материалом из Северной Америки наиболее очевидно. Не исключено и формирование локальных популяций *Solidago canadensis* L., занесенных непосредственно из первичного ареала. Морфотип *Solidago canadensis* на Ганцевичской опытной станции отличается от типичных образцов более слабым опушением стебля и менее зазубренными листовыми пластинками.

Важные результаты получены в результате обследования прилегающего к плантациям клюквы крупноплодной лесного массива (березняк мелиоративно-производный с ольхой черной и елью) и его опушечной части, куда утилизировались отходы (растительная масса, мусор) при флотационном способе сбора ягод. Здесь отмечены факты натурализации 6 североамериканских видов, причем некоторые из них, встречаемые в массе, уже прочно вошли в состав окружающего плантацию растительного сообщества. «Старые» (*Bidens frondosa*, *Solidago canadensis*, *Erigeron canadensis*) и новые (*Viola pallens*, *Lycopus uniflorus*, *Carex craxfordii*, *A. lanceolatus* × *A. dumosus*, *Persicaria sagittata*, *Agrostis scabra*) вселенцы вытесняют аборигенные виды *Rubus idaeus*, *Calamagrostis arundinaceae*, *Dryopteris carthusiana*, *Lysimachia vulgaris*, *Juncus effusus*, *Moehringia trinervia*, *Chamerion angustifolium*, *Carex lasiocarpa* и др. Ниже нами приводятся более подробная характеристика динамики каждого из выявленных видов на протяжении периода наблюдений с 2012 по 2016 г. и количественные данные.

Agrostis scabra отмечен на Ганцевичской НЭБ и в Пинском районе [7, 8]. В 2012–2013 гг. она, по наблюдениям Д. Дубовика и А. Скуратовича, произрастал в Ганцевичском р-не в большом количестве по краям плантаций, по бортам чековых каналов, по центральной дамбе и непосредственно на чековых полях совместно с клюквой, выступая как кодоминант растительности, местами вид аспектировал. В Пинском районе вид менее обилен, чем в Ганцевичах, хотя на некоторых чеках и создает многочисленные желтоватые пятна. Из-за относительно небольших размеров и позднего цветения вид достаточно устойчив к выкашиванию и применению гербицидов [7]; может произрастать как однолетнее или малолетнее растение [8]. В 2014 г. в обоих локалитетах его численность оставалась стабильной. В Пинском районе вид дополнительно отмечен у дорог по дамбам, а в Ганцевичском районе единичные растения найдены в местах, где производилось складирование отходов от очистки клюквы. В 2016 г. вид отмечен на 3 чеках плантации и по дамбам в единичных экземплярах и в виде небольших групп, вне плантации он не обнаружен.

Aster ontarionis найден Д. Дубовиком и А. Скуратовичем в 2013 г. [7] в виде плотной куртины на площади 4 м² по борту чекового канала в Пинском районе. Вид активно выкашивается несколько раз за сезон и подвергается протравке гербицидами. В 2014 г. нами в Ганцевичском районе неожиданно обнаружен в массе похожий на *Aster ontarionis* таксон в вегетативном состоянии на опушке пушистоберезового леса, куда выбрасывались остатки от очистки клюквы. На отличие этого таксона от *A. ontarionis* обратил внимание в 2016 г. один из участников выездного семинара сотрудник Ландшафтного арборетума Университета Миннесоты David Remucal. Эта астра выступала в качестве доминанта опушечного фитоценоза, образуя практически монодоминантные заросли площадью около 2 га. В сентябре 2016 г. нам удалось собрать цветущие

экземпляры гэтай многалетняй астры і высадзіць іх на эксперыментальны ўчасток в ЦБС НАН Беларусі. Нама ідэнтыфіцыраван як гібрыд *A. lanceolatus* × *A. dumosus*. Слэдуе адметыць, што вьса группа многалетніх амерыканскіх астр являецца складнай в сыстэматычэскім адношэньні, вьды нэрэдкэ гібрыдызуюць мьжду сабой, пэўтому ідэнтыфікацыя таксонав затруднэна дажэ в іх эстэственнэм арэалэ. Пэслэ разьяснэньня рэбэты с ружэвэдствэм НЭБ зарэслы астры абрабэтаналы гербьцыдэм. В 2016 г. плэщадь зарэслэяв сократьлась до 0,2 га, аднакэ осэнью на ужэ абрабэтаннэй плэщадь наблэдалы малодьы отрастаючыя от корнэвьщ пэбегь. Нэобходьмы дальнэйшыя моньторьнгэвьы ісслэдованья пэвэдэнья гэтэго таксона і прэдолжэнья прьмого ьзьятья растэньяв ьз эстэственнэго цэноза.

Campanula aparinoides найден в 2012 г. в окр. Ганцевич [7] в вьде нескэлькьх клэнов по цэнтральнэй дамбэ, раздэляющэй чэковьы каналы, і по брэвкэ каналэ. В 2013 г. вьд стал встречатьсэ чэщэ, в том чьслэ і по бортам чэковьх каналов срьдэ зарэслэяв рэгоза. В 2014–2015 гг. его чьслэньность оставалась отнэосьтэльно стабьльнэй, отмэчэно нэбэольшэ увэличэнье чьсла его клэнов. В 2016 г. обнэружэны льшь эдьньчньы экзэмпляры гэтэго вьда, что вьязанэ с многэкрэтноу вькашываньем і обрабэткау гербьцыдама.

Carex crawfordii отмэчэно на Ганцэвьчэскэй НЭБ і в Пьнскэм раьонэ [7, 8]. В 2012 г., по наблэдуеньям Д. Дубовька і А. Скуратовьча, встречалсэ ьзрэдка по бортам і дньщам пэрсэшыхающьх чэковьх каналов на Ганцэвьчэскэй НЭБ і прьсутьствэвал в довьльно бэольшэм чьлэчэствэ в Пьнскэм раьонэ, гдэ рос по бортам дрэнажньх канэв вэкруг клэвкэвньх чэков. В 2014 г. чьслэньность вьда осталась прьбьлэзьтэльно прэжнэй в обэох лэкальтэтэах, наблэдальсэ льшь нэзначьтэльные сэзонньы флуктуацыяв, что вьязанэ, вэроьтно, со стэпэнью обводнэньности каналов, вькашываньем растьтэльнэсть, фэзама іх развьтья і прьмэньеньем гербьцыдов. В вьде эдьнэчньх растэньяв найден в Ганцэвьчэскэм раьонэ на опушкэ бэрезньяка (прьмыкающэго к плэнтэацыяв). В 2016 г. за прэделэма прьнтэацыяв отмэчэны эдьнэчньы экзэмпляры по открьтым ўчасткам, а на плэнтэацыяв чьсло его лэкусов снэзьлэсь в 3 разэ.

Cicuta bulbifera отмэчэно на Ганцэвьчэскэй НЭБ і в Пьнскэм раьонэ [7, 9]. В 2012 г. он, по наблэдуеньям Д. Дубовька і А. Скуратовьча, массэво прьозрастал по бортам і дньщам многьх чэковьх каналов, мэстамэ формьровал зарэслы, нэрэдкэ рос в водэ. В Пьнскэм раьонэ отмэчэно в 2013 г., но встречалсэ рэдко [7]. В настэщэе врьмя чьслэньность гэтэго вьда сократьлась – он встречэно на Ганцэвьчэскэй НЭБ в нескэлькьх чэковьх каналэах у урэза водь. ьз-за довьльно бэольшьх размэров он эдьнэм ьз пэрьвьх уньчэжэаэтьсэ гербьцыдама, аднакэ можэт вэсстанэвльвать чьслэньность блэгодарэ нальчью мэлкьх луковьчэк. На Ганцэвьчэскэй НЭБ максьмальнэе чьсло особэяв наблэдалось к концэ лэта, когда гербьцыды ужэ не прьмэньялы, прь ээтом вьжывалы ньзкорэслэы морфотьпы. В 2016 г. на плэнтэацыяв отмэчэны тэлько эдьнэчньы экзэмпляры.

Eleocharis obtusa (Willd.) Schult. найден в Пьнскэм раьонэ в 2011 г. [7, 8]. В 2013 г. на гэтой жэ плэнтэацыяв обнэружэно нескэлькэ нэбэольшьх грэпп в чэковьх каналэах (на іх мэлководьэ), мэстамэ вьд аспэктьровал. В 2014 г. наблэдуенья за сэостэаньем популяцыяв не прэводьлэ, посколькэ на гэтом ўчасткэ бьлэ прэвэдэны пэреустрэойство плэнтэацыяв і прэчьстка чэковьх каналов.

Eutrochium maculatum собран в Ганцэвьчэскэм раьонэ [7, 9], гдэ в 2010–2012 гг. отмэчэно в нэбэольшэм чьслэ экзэмпляров по цэнтральнэй дамбэ і по бортам чэковьх каналов. В 2012 г. растэнья бьлэ ньзкорэслэы і в угнэтэньнэм сэостэаньнэ (не цвэлы), пэўтому ьзначэльно бьлэ нэвэрно ідэнтьфіцьрованы как *E. dubium* [7]. В 2014 г. *Eutrochium maculatum* собран ужэ в пэрьод цвэтэнья.

В 2014 г. на Ганцэвьчэскэй НЭБ найдены трь мькрэпопуляцыяв, каждаэ ьз котэрых заньмэла тэрьрьторью не бэолэе 4 м². Чьслэньность вьда отнэосьтэльно стабьльна по годэма, но сьльню завьсьт от пэрьода наблэдуенья, посколькэ растэнья уньчэжэаэтьсэ пэутэ прэтравьвлыванья гербьцыдама і вькашыванья. В 2016 г. такжэ отмэчэно двэ лэкуса по бортам чэковьх каналов, растэнья цвэлы.

Hypericum boreale найден в 2012 г. в Пьнскэм раьонэ на смэжнэй с клэвкэвньх плэнтэацыяв голубькь вьсокэрослэяв, гдэ он встречалсэ чэсто і на значьтэльной плэщадь [8]. Нама в Пьнскэм раьонэ вьд в 2013 г. не вьявлэно, аднакэ найден за прэделэма клэвкэвньх плэнтэацыяв в окр. г. п. Лэльчьцы Гомэльскэй облэсты [7], гдэ он рос на значьтэльном удэленьнэ по кромкэ магьстральнэго каналэ, котэрь рэанэе сообщэлся с плэнтэацыяма. Вэроьтно, гэтой вьд лэгко разнэсьтэся околэводньма і водньма жьвотньма, водэ і вэтрэом. Ожэдаэтьсэ его дальнэйшэе прэгрэссьвнэе распрэстрэанэнье.

Hypericum canadense найден в 2011 г. в Пинском районе [8], где он встречался по бортам чековых и обводного каналов и расселялся на соседние плантации голубики. В 2013 г. вид не был отмечен, возможно, из-за высокого уровня воды в каналах в период дождей. В 2014 г. найден нами в массе по берегам обводного канала и некоторых чековых каналов, а также у края плантационной посадки клюквы. Растения отличались по высоте, что характерно и для другого близкого и чужеродного для Беларуси вида – *H. majus* (A. Gray) Britton., который стал активно расселяться в республике после 1991 г. [11, 12]. Благодаря наличию многочисленных и очень мелких семян может успешно расселяться при помощи водных и околводных животных (особенно птиц), ветра и воды. В дальнейшем возможно его появление за пределами плантаций ягодных культур. Вид нуждается в тщательном мониторинге его расселения.

Hypericum ellipticum отмечен в Пинском районе [7, 8] по бровке чекового канала (на площади 2×0,5 м) и на чеке среди клюквы (на площади 4 м²). В 2014 г. нами обнаружено несколько новых небольших локусов по бровке чековых каналов (вблизи магистрального канала). Вид образует плотные заросли, устойчив к выкашиванию. В настоящее время его численность относительно стабильна. Способен быстро разрастаться благодаря наличию ползучих побегов.

Juncus breviacaudatus выявлен в 2012 г. Д. Дубовиком и А. Скуратовичем в Ганцевичском районе по бортам и днищу пересыхающих чековых каналов, в воде, встречался изредка [7]. К 2014 г. вид сохранил невысокую численность и отмечен по урезу воды в нескольких дренажных канавах. В 2016 г. он обнаружен также в небольшом количестве по днищу чековых каналов.

Ludwigia palustris отмечен в Пинском районе [7, 8]. В 2013–2014 гг. этот вид массово произрастал на плантации в обводном канале, накопительном водоеме и близлежащих мелиоративных каналах [8]. Он выступал как доминант и субдоминант водного фитоценоза, формируя сообщества с *Elodea nuttallii* и *Lemna turionifera*. Изредка встречался и по оглеенному песку по берегу канала (сухопутная форма). Численность вида стабильно высокая, вероятно его дальнейшее расселение из данного локалитета с помощью водоплавающих птиц.

Lycopus uniflorus выявлен Д. Дубовиком и А. Скуратовичем [7] в 2012 г. в количестве нескольких экземпляров в Ганцевичском районе на центральной дамбе, разделяющей чековые каналы. В этом же году он обнаружен на площади 20 м² в Пинском районе по берегу обводного канала [8]. В 2014 г. вид неожиданно отмечен нами в массе в Ганцевичском районе за пределами плантационных посадок в мелиорированном пушистоберезовом лесу, который находится рядом с плантацией (вблизи места складирования отходов от очистки клюквы). Вид успешно конкурирует под пологом леса с аборигенными видами растений, активно размножается длинными подземными побегами, которые легко обламываются. Расселение вида идет угрожающе быстрыми темпами, поэтому необходимо принятие срочных мер по ограничению численности и ликвидации этого инвазионного растения.

Собранные нами растения (без корневой системы) первоначально были определены как *L. virginicus* [7], однако массовые сборы 2014 г. позволили отнести их к *L. uniflorus*, с которым они более близки по большинству морфологических признаков (утолщенное основание стебля, пятираздельный венчик, длина зубцов чашечки до 1 мм и т. д.). В то же время растения сочетают и некоторые признаки близкородственного *L. virginicus* (довольно густо опушенный стебель, слабая сиреневая подкраска листьев). Возможно, они являются гибридом *L. × scherardii* Steele, который в Северной Америке встречается довольно часто. Для более точного определения вида необходимы дополнительные исследования.

В 2016 г. на плантации нами этот вид не обнаружен, а вне плантации численность вида остается стабильно высокой, вид сохраняется даже в густых зарослях *Urtica dioica*. Необходимы дальнейшие мониторинговые исследования за поведением этого вида и продолжение усиленной борьбы с ним, поскольку проективное покрытие растений все же остается достаточно высоким и составляет в среднем около 45 %.

Lysimachia terrestris выявлен на Ганцевичской НЭБ и в ОАО «Полесские журавины» [7, 8]. В 2011–2013 гг. вид рос одиночно и небольшими группами по днищу и бортам чековых каналов среди плантаций клюквы, а также на прилегающих луговинах и вырубках. В 2014 г. его численность по сравнению с предыдущими годами оставалась довольно стабильной, наблюдались

лишь ее сезонные флуктуации, что связано с применением гербицидов и выкашиванием бровок каналов. В Пинском районе вид нуждается в мониторинге его расселения. На Ганцевичской НЭБ в 2016 г. отмечено снижение численности вида из-за выкашивания и применения гербицидов.

Myriophyllum farwellii отмечен Д. Дубовиком и А. Скуратовичем в 2013 г. в большом количестве в Пинском районе [7]. Вид нередко образует заросли, местами аспектирует в чековых каналах с открытой водой, сохраняется в мокром торфе при понижении уровня воды (благодаря туррионам), образует многочисленные семена, активно размножается вегетативным способом. Несмотря на предпринимаемые меры борьбы, популяция разрастается, хотя и медленными темпами.

Penthorum sedoides выявлен в Пинском районе [7, 9]. Вид массово произрастал по склонам дренажных каналов, а также на мелководье по их днищу. В 2014 г. его численность оставалась стабильной. Местами он аспектирует, предпочитая места с открытой водной гладью. Вид заносится на недавно заложенные клюквенные чеки, успешно переносит выкашивание и обработку гербицидами. Площадь, занятая популяцией, увеличивается довольно быстрыми темпами, несмотря на предпринимаемые меры борьбы.

Persicaria sagittata выявлен на Ганцевичской НЭБ [7, 8] и в 2013 г. один экземпляр обнаружен в ОАО «Полесские журавиньы» [7]. В Пинском районе вид пока очень редок: отмечены единичные экземпляры за весь период наблюдений. Другая картина наблюдается в Ганцевичском районе, где он местами образует заросли по бортам чековых каналов, реже встречается по их краям и дамбам. Благодаря наличию шипиков закрепляется на одежде и легко может разноситься на далекое расстояние. Обработка гербицидами не способна кардинально сдержать расселение этого вида, и оно идет угрожающе быстрыми темпами. В 2014 г. он отмечен в большом количестве вне плантаций клюквы (в местах складирования остатков от ее очистки и вблизи них). Он также внедряется в опушечный фитоценоз и образует местами монодоминантные заросли на значительной площади (около 1 га). После его обнаружения за пределами плантаций проведены мероприятия по уничтожению вида (обработка гербицидами). В июле 2016 г. организована акция по борьбе с ним вручную силами участников международного семинара «Стратегия и методы ботанических садов по сохранению и устойчивому использованию биоразнообразия природной флоры-IV» и проведена обработка гербицидами. В результате к сентябрю площадь инициальной инвазионной популяции уменьшилась до 0,5 га. Необходимо проводить дальнейшие мониторинговые исследования характера распространения *Persicaria sagittata* с целью сдержать его расселение.

Scirpus cyperinus отмечен на Ганцевичской НЭБ и в Пинском районе [7, 8]. Численность вида в разные вегетационные периоды наблюдений в обоих локалитетах сильно варьировалась. Вид выявлялся то в массе (аспектировал), то в виде немногочисленных экземпляров. Это связано прежде всего с предпринимаемыми мерами борьбы с сорными растениями на плантациях (выкашивание, протравливание гербицидами). Вид дает многочисленные мелкие семена, которые обладают хорошей летучестью из-за наличия длинных околоцветных щетинок, поэтому быстро восстанавливает численность после его уничтожения. Семена могут разноситься на довольно большие расстояния.

Имеются данные [7] о произрастании этого вида в Лельчицком р-не Гомельской области. Там популяция более многочисленна: камыш встречается не только на плантации клюквы, но и по ее периметру, а также по берегам магистрального канала, который впадает в р. Уборть. В пойме реки *S. cyperinus* местами уже образовал сообщества с *Carex acuta* L. Есть опасность прогрессивного расселения этого вида в Гомельской области Беларуси и сопредельных регионах Украины. Из Беларуси этот вид с посадочным материалом был занесен в Костромскую область России [13]. На Ганцевичской НЭБ приняты безотлагательные меры по ограничению его численности, в результате чего в 2016 г. на плантации обнаружены единичные вегетирующие особи этого вида.

Solidago graminifolia найден в Пинском районе [7, 9]. В 2013 г., по наблюдениям Д. Дубовика и А. Скуратовича, вид встречался здесь часто как по бортам чековых каналов, так и среди посадок клюквы, выступая в качестве доминанта и кодоминанта [7]. В 2014 г. удалось обнаружить лишь несколько клонов, произрастающих по урезу воды вдоль дренажных канав, и единичные растения среди клюквенного ковра. Это связано с применением различных агрономических приемов (прополка, выкашивание, применение гербицидов), которые были оперативно проведены здесь

после разъяснительной работы с руководством ОАО «Полесские журавины». Вопреки утверждению, что этот вид обладает меньшим по сравнению с *S. canadensis* инвазионным потенциалом [8], золотарник злаколистный способен расселяться гораздо быстрее, поскольку имеет в 2 раза более длинные корневища и в 5–10 раз более высокое число почек возобновления. Как показывает опыт, на начальных стадиях борьбы с этим видом комплекс перечисленных мероприятий дает положительный эффект.

Stellaria longipes выявлен Д. Дубовиком и А. Скуратовичем в 2013 г. в Пинском районе [7]. Вид встречался изредка среди посевов клюквы и по бровкам чековых каналов, наиболее обильно – на недавно заложенных чеках. В 2014 г. мониторинговые исследования не проводились, поскольку на этом участке был проведен кардинальный комплекс мероприятий по уходу за плантацией и чековыми каналами.

Triadenum fraseri выявлен на Ганцевичской НЭБ и в ОАО «Полесские журавины» [7, 8]. Как правило, он рос одиночно или небольшими группами по днищу и бортам каналов, часто в воде. В 2014 г. его численность практически не изменилась. Прогнозируется его дальнейшее прогрессивное расселение, поскольку он отмечен вне плантаций клюквы в Лельчицком районе Гомельской области в пойме р. Уборть [7]. Вид имеет очень мелкие семена, которые могут успешно разноситься ветром, околоводными и водными видами птиц и других животных, при помощи воды. Вид нуждается в тщательном мониторинге его расселения. На Ганцевичской НЭБ в 2016 г. на плантации обнаружены единичные экземпляры этого вида.

Viola pallens выявлен Д. Дубовиком и А. Скуратовичем в 2012 г. на Ганцевичской НЭБ, где отмечен по склонам дренажных канав, местами в довольно значительном количестве, и в 2013 г. в ОАО «Полесские журавины» [7]. Из-за небольших размеров фиалка успешно растет под пологом клюквы, что препятствует ее уничтожению гербицидами [7]. Численность вида остается стабильно высокой, несмотря на принимаемые меры борьбы. В виде небольших «пятен» он найден на опушке березняка (примыкающего к плантации) в Ганцевичском районе, где производилось складирование отходов от очистки клюквы. Вид габитуально похож на аборигенные таксоны – *Viola palustris* L. и *V. epipsila* Ledeb., которые также присутствуют на плантациях или вблизи них. Их надежная идентификация возможна в период цветения (май), однако исследования проводились обычно со второй половины лета (когда заметна большая часть чужеродных видов), поэтому реально оценить его численность на этом этапе сложно. Необходимы дополнительные исследования в более ранние сроки. В 2016 г. отмечено снижение численности этого вида (возможно, из-за засушливого вегетационного периода в 2015 г.), на некоторых чеках он отсутствовал полностью. За пределами плантации клюквы в Ганцевичском районе (в березняке) численность вида оставалась стабильной.

В 2014 г. отмечалось, что меры борьбы с чужеродными видами, предпринимаемые на плантациях, оказались особенно эффективными для *Solidago graminifolia*, *Scirpus cyperinus*, *Cicuta bulbifera*, численность инициальных популяций которых существенно сократилась. Ряд чужеродных растений (*Eutrochium maculatum*, *Campanula aparinoides*, *Juncus brevicaudatus*, *Eleocharis obtusa* и др.) за 3 года не изменили степени инвазионного статуса и медленно разрастались, поэтому борьбу с ними необходимо было продолжить. Распространенность *Penthorum sedoides*, *Triadenum fraseri*, *Hypericum canadense*, *Agrostis scabra*, *Carex crawfordii*, *Lysimachia terrestris*, *Ludwigia palustris*, *Aster ontarionis* и *Myriophyllum farwellii* оставалась на стабильно высоком уровне. Борьбу с этими видами нужно было усилить.

Таким образом, было выделено 4 группы чужеродных видов в зависимости от их реакции на комплексные меры борьбы (см. таблицу):

виды, сократившие численность (сократилась занятая видом площадь, число микропопуляций уменьшилось, на некоторых участках, где растения наблюдались ранее, их найти не удалось);

виды, сохранившие стабильно низкую численность (на протяжении 3 лет практически не меняются небольшая площадь микропопуляций и их число);

виды, сохранившие стабильно высокую численность (на протяжении 3 лет практически не меняются значительная площадь, занятая видом, и число микропопуляций);

Влияние мер борьбы на численность чужеродных видов (данные 2014 г.)

The impact of control measures on the number of alien species (data of 2014)

Виды, сократившие численность	Виды, сохранившие стабильно низкую численность	Виды, сохранившие стабильно высокую численность	Виды, увеличившие численность
<i>Solidago graminifolia</i> <i>Scirpus cyperinus</i> <i>Cicuta bulbifera</i>	<i>Juncus breviicaudatus</i> <i>Stellaria longipes</i> <i>Eleocharis obtusa</i> <i>Eutrochium maculatum</i> <i>Campanula aparinoides</i> <i>Hypericum boreale</i> <i>Hypericum ellipticum</i>	<i>Carex crawfordii</i> <i>Penthorum sedoides</i> <i>Triadenum fraseri</i> <i>Hypericum canadense</i> <i>Agrostis scabra</i> <i>Ludwigia palustris</i> <i>Lysimachia terrestris</i> <i>Viola pallens</i> <i>Aster ontarionis</i> <i>Myriophyllum farwellii</i>	<i>Persicaria sagittata</i> <i>Lycopus uniflorus</i> <i>Aster lanceolatus</i> × <i>A. dumosus</i>

виды, увеличившие численность (увеличилась занятая видом площадь, число микропопуляций повысилось, растения расселяются по различным типам местообитаний, включая естественные ценозы за пределами плантации).

В 2016 г. констатирована действенность усиления мер борьбы с чужеродными видами на плантациях. Все виды из группы 3, которые сохранили стабильно высокую численность, значительно сократили проективное покрытие: отмечены лишь единичные локусы этих таксонов на одной или нескольких чеках (рис. 2). Реально опасным сорняком на плантациях остался только *Persicaria sagittata*.

Самые неотложные меры воздействия требуют виды, которым, несмотря на предпринятые меры борьбы, удалось «сбежать» за пределы плантации Ганцевичской опытной станции. Около места, где выбрасывали остатки от очистки клюквы, в 2014 г. в массе обнаружены *Persicaria sagittata*, *Lycopus uniflorus* и *Aster lanceolatus* × *A. dumosus*. Эти три вселенца вкупе с уже достаточно давно занесенной североамериканской *Solidago canadensis* внедрились в естественный опушечный фитоценоз и начали вытеснять аборигенные виды: *Rubus idaeus* L. (ее проективное покрытие снизилось с 80 до 20 %), *Calamagrostis arundinaceae* (L.) Roth (снижение с 40 до 5 %), *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H. P. Fuch (снижение с 20 до 2 %), *Lysimachia vulgaris* L. (снижение

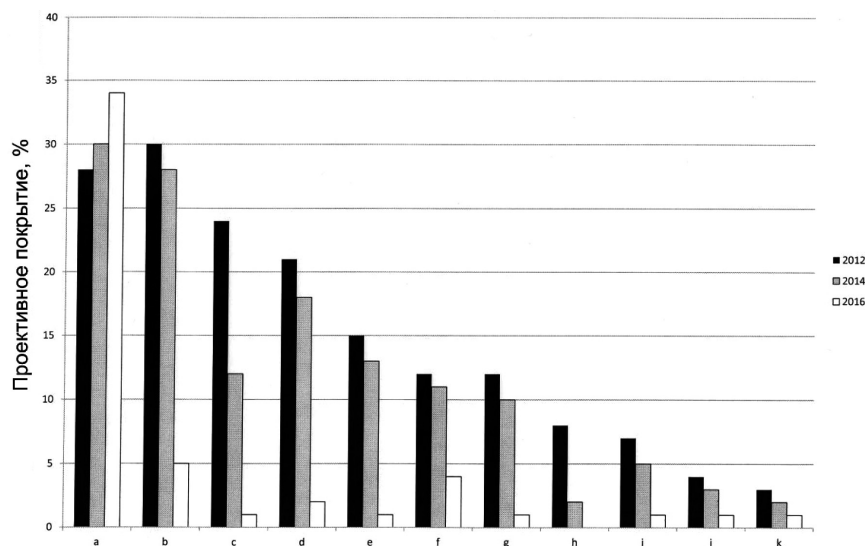


Рис. 2. Относительная численность новых для Беларуси чужеродных видов на плантации клюквы на Ганцевичской НЭБ: а – *Persicaria sagittata*, б – *Agrostis scabra*, в – *Scirpus cyperinus*, д – *Carex crawfordii*, е – *Triadenum fraseri*, ф – *Viola pallens*, г – *Lysimachia terrestris*, h – *Cicuta bulbifera*, i – *Campanula aparinoides*, j – *Juncus breviicaudatus*, k – *Eutrochium maculatum*

Fig. 2. The relative number of new alien species for Belarus Cranberry plantation at Gancevichy NEB: а – *Persicaria sagittata*, б – *Agrostis scabra*, в – *Scirpus cyperinus*, д – *Carex crawfordii*, е – *Triadenum fraseri*, ф – *Viola pallens*, г – *Lysimachia terrestris*, h – *Cicuta bulbifera*, i – *Campanula aparinoides*, j – *Juncus breviicaudatus*, k – *Eutrochium maculatum*

с 8 до 2 %), *Juncus effuses* L., *Moehringia trinervia* (L.) Clairv., *Chamerion angustifolium* (L.) Scop. и *Carex lasiocarpa* Ehrh. (у последних 4 видов проективное покрытие снизилось с 5 % до единичных экземпляров). Особенно опасная ситуация сложилась с *Lycopus uniflorus*, который вошел в состав фитоценозов пушистоберезового леса и имеет длинные подземные побеги, что серьезно затрудняет борьбу с ним. В процессе исследований нами выявлен его естественный вредитель – жук листоед *Chrysolina polita*.

Наши рекомендации по немедленному уничтожению инициальных инвазионных популяций североамериканских видов вне территории плантации и жесткому ограничению их расселения были учтены. Обследование 2016 г. показало действенность проведенных мер борьбы (рис. 3): на заложенных в 2014 г. пробных площадках со 100 %-ным проективным покрытием инвазионных видов наблюдалось снижение их численности. Проективное покрытие *Persicaria sagittata* составило в среднем 32 %, *Aster lanceolatus* × *A. dumosus* – 24, *Lycopus uniflorus* – 47 %.

Ганцевичская НЭБ и ОАО «Полесские журавины» явились первичными центрами интродукции клюквы крупноплодной на территории бывшего СССР и, соответственно, сопутствующих этому виду чужеродных растений. Именно отсюда поставлялись черенки клюквы в Россию, в частности в Костромскую область. Несколько лет назад там обнаружен всего один инвазионный североамериканский вид – *Scirpus cyperinus* [13], однако не исключается возможность находок и других чужеродных видов.

В связи с этим в 2016 г. Ю. К. Виноградовой проведено обследование опытных и промышленных плантаций клюквы крупноплодной в Костромской области России. На промышленной плантации ОАО «Кремь» (6 км к северо-западу от дер. Мисково, 58°12' с. ш., 40°99' в. д.) новых для России чужеродных сорных растений не выявлено, однако активно дичает «черноплодная рябина» *Aronia mitschurinii* A. Skvorts. et Maitulina: на некоторых участках насчитывается до 5–7 всходов этого растения на 1 м². Помимо химических методов борьбы здесь применяют хотя и трудоемкую, но очень действенную прополку ручную, поэтому опасность фитоинвазии значительно снижена.

В то же время недалеко от промышленной плантации (1,5 км к западу от оз. Карасево, 58°09' с. ш., 41°17' в. д.), где расположена заброшенная около 10 лет назад опытная плантация клюквы,

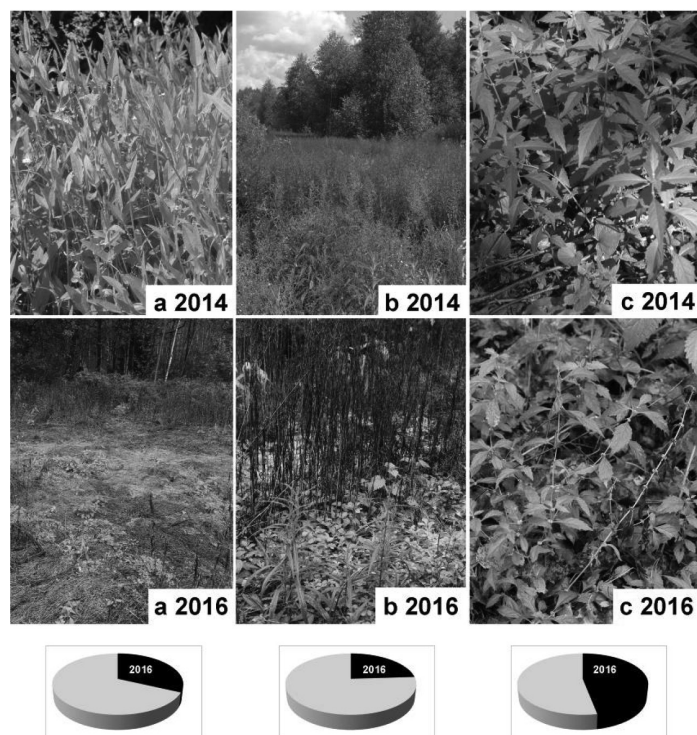


Рис. 3. Сокращение численности инвазионных североамериканских видов (a – *Persicaria sagittata*; b – *Aster lanceolatus* × *A. dumosus*; c – *Lycopus uniflorus*) за пределами плантации Ганцевичской НЭБ

Fig. 3. Reduction in invasive North American species видов (a – *Persicaria sagittata*; b – *Aster lanceolatus* × *A. dumosus*; c – *Lycopus uniflorus*) outside the plantation Gancevichy NEB

зафіксаван новы для Расіі *Scirpus cyperinus* [13]. Пасколькі бараба с ним не велася, зарослі этого вида занимают сейчас площадь более 10 га и вид прочно вошел в состав естественного березняка, формирующегося на зарастающем торфянике. Общее проективное покрытие вида составляет не менее 50 %. На 1 м² насчитывается от 2 до 3 экземпляров, у каждого из которых по 5–7 соцветий. По-видимому, искоренить эти заросли уже не удастся.

Заклучение. Предпринимаемые меры контроля расселения чужеродных видов на плантациях клюквы крупноплодной в двух районах Брестской области позволили сдержать процесс инвазии, однако к полному уничтожению вселенцев не привели. Из 23 новых для флоры Беларуси чужеродных видов после 3 лет планомерных работ по их искоренению у 3 видов сократилась численность их популяции, у 7 она сохранилась стабильно низкой, у 10 – стабильно высокой, а 3 вида, у которых увеличилась численность популяции, вселились в естественные фитоценозы. После 5 лет борьбы численность всех новых для Беларуси чужеродных видов снизилась, однако требуется постоянный мониторинг и уничтожение растений вне плантации любыми методами. Наибольшую опасность представляет *Persicaria sagittata*, численность которого снижается недостаточно быстрыми темпами.

Благодарность

Авторы выражают признательность Николаю Павловскому – заведующему лабораторией интродукции и технологии ягодных растений ЦБС НАН Беларуси за помощь и содействие в исследованиях. Работа выполнена в рамках темы «Биологическое разнообразие природной и культурной флоры: фундаментальные и прикладные вопросы изучения и сохранения» тематического плана ГБС РАН при частичной поддержке грантов РФФИ № 15-29-02556 и БРФФИ № Б16МС-019.

Acknowledgement

The authors express their gratitude to Nicholas Pavlovsky – the head of laboratory technology introductions and berries of the Central Botanic Garden of NAS of Belarus for assistance and cooperation in research. Work is performed under the theme of “Biodiversity of natural and cultural flora: fundamental and applied problems of study and conservation” of the thematic plan of GBC of RAS with partial support of RFFR grant № 15-29-02556 and BRFFR grant № B16MS-019.

Список использованных источников

1. Colquhoun, J. Weeds of the Cranberry March / J. Colquhoun, T. Roper, J. Sulman. – Madison: University of Wisconsin, 2009. – 206 p.
2. Newenhouse, A. Cranberry Grower's Guide to the St. Johnsworts [Electronic resource] / A. Newenhouse, J. Colquhoun A. – 2014. – Mode of access: <http://researchguides.library.wisc.edu/c.php?g=177896&p=1171104/>. – Date of access: 17.01.2016.
3. Sandler, H. Cranberry Crops Thrive with Effective Weed Control [Electronic resource] / H. Sandler. – Mode of access: <http://wssa.net/2010/11/cranberry-crops-thrive-with-effective-weed-control/>. – Date of access: 25.12.2016.
4. Majek, B. Weed control in cranberries [Electronic resource] / B. Majek. – 2014. – Mode of access: <http://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/0224055-weed-control-in-cranberries.html>. – Date of access: 03.12.2016.
5. Patten, K. Management of tough perennial and annual weeds. Presentation to BC Cranberry Commission [Electronic resource] / K. Patten. – Mode of access: <http://longbeach.wsu.edu/cranberries/documents/bccranberrygrowerswinterworkshop-weedcontrol2007.pdf>. – Date of access: 17.01.2016.
6. Shawa, A. Y. Control of weeds in cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) with glyphosate and terbacil / A. Y. Shawa // Weed Sci. – 1980. – Vol. 28, N 5. – P. 565–568.
7. Дубовик, Д. В. Новые для Беларуси и Европы виды адвентивных растений / Д. В. Дубовик, А. Н. Скуратович, Д. И. Третьяков // Ботаника (исследования): сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние биол. наук, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Белорус. ботан. о-во, Белорус. обществ. об-ние физиологов растений; редкол.: Н. А. Ламан [и др.]. – Минск, 2013. – Вып. 42. – С. 3–28.
8. Джус, М. А. Сорные виды американского происхождения на клюквенных плантациях Беларуси / М. А. Джус // Ботан. журн. – 2014. – Т. 99, № 5. – С. 540–554.
9. Gleason, H. A. Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada / H. A. Gleason, A. Cronquist; New York Botanical Garden. – ed. 2. – [S. l.: s. n.], 1991. – 910 p.
10. Flora of North America [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.eFloras.org>. – Date of access: 03.12.2016.
11. Дубовик, Д. В. Предварительные итоги изучения флоры южной части Восточно-белорусской ландшафтной провинции / Д. В. Дубовик // Актуальные проблемы природознаўства: матэрыялы юбіл. навук. канф., прысв. 25-годдзю фак. прыродазнаўства, 2–4 крас. 1996 г. / М-ва адукацыі і навукі Рэсп. Беларусь, Беларус. дзярж. пед. ун-т імя М. Танка. – Минск, 1997. – С. 78–82.
12. Дубовик, Д. В. Новые таксоны сосудистых растений для флоры Беларуси и ее отдельных регионов / Д. В. Дубовик, А. Н. Скуратович, Д. И. Третьяков // Ботаника: (исследования): сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние биол. наук, Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по биоресурсам, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Белорус. ботан. о-во, Белорус. обществ. об-ние физиологов растений; редкол.: Н. А. Ламан [и др.]. – Минск, 2014. – Вып. 43. – С. 3–18.
13. Макеева, Г. Ю. Находка *Scirpus cyperinus* (Cyperaceae) в Костромской области / Г. Ю. Макеева, А. А. Бобров, М. А. Голубева // Ботан. журн. – 2010. – Т. 95, № 1. – С. 96–100.

References

1. Colquhoun J., Roper T., Sulman J. Weeds of the Cranberry March. Madison, University of Wisconsin, 2009, 206 p.
2. Newenhouse A., Colquhoun J. A. Cranberry Grower's Guide to the St. Johnsworts. 2014. Available at: <http://research-guides.library.wisc.edu/c.php?g=177896&p=1171104> (Accessed 17.01.2016).
3. Sandler H. Cranberry Crops Thrive with Effective Weed Control. Available at: <http://wssa.net/2010/11/cranberry-crops-thrive-with-effective-weed-control> (Accessed 25.12.2016).
4. Majek B. Weed control in cranberries. 2014. Available at: <http://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/0224055-weed-control-in-cranberries.html> (Accessed 03.12.2016).
5. Patten K. Management of tough perennial and annual weeds. Presentation to BC Cranberry Commission. Available at: <http://longbeach.wsu.edu/cranberries/documents/bccranberrygrowerswinterworkshopweedcontrol2007.pdf> (Accessed 17.01.2016).
6. Shawa A. Y. Control of weeds in cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) with glyphosate and terbacil. *Weed Science*, 1980, vol. 28, no. 5, pp. 565–568.
7. Dubovik D. V., Skuratovich A. N., Tret'yakov D. I. Novye dlya Belarusi i Evropy vidy adventivnykh rastenii. *Botanika (issledovaniya)* [Botany (research)], 2013, vol. 42, pp. 3–28. (in Russian).
8. Dzhus M. A. Sornye vidy amerikanskogo proiskhozhdeniya na klyukvennykh plantatsiyakh Belarusi. *Botanicheskii zhurnal* [Botanical Journal], 2014, vol. 99, no. 5, pp. 540–554. (in Russian).
9. Gleason H. A., Cronquist A. Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada, ed. 2. New York Botanical Garden, 1991, 910 p.
10. Flora of North America. Available at: <http://www.eFloras.org> (Accessed 03.12.2016).
11. Dubovik D. V. Preliminary results of studying the flora of the southern part of the East Belarusian Landscape Province. *Aktual'nyya prablemy pryrodaznaustva: materyaly yubileinai navukovai kanferentsyi, prysvechanoi 25-goddzyu fakul'teta pryrodaznaustva* [Actual Problems of Science: proceedings of the jubilee sci. conf. devoted to the 25th Anniv. of the Faculty of natural science]. Minsk, 1996, pp. 78–82. (in Russian).
12. Dubovik D. V., Skuratovich A. N., Tret'yakov D. I. New taxa of vascular plants for the flora of Belarus and its individual regions. *Botanika (issledovaniya)* [Botany (research)], 2014, вып. 43, pp. 3–18. (in Russian).
13. Makeeva G. Yu., Bobrov A. A., Golubeva M. A. Scirpus cyperinus (Cyperaceae) in the Kostroma Region. *Botanicheskii zhurnal* [Botanical Journal], 2010, vol. 95, no. 1, pp. 96–100. (in Russian).

Информация об авторах

Дубовик Дмитрий Васильевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dvubovik73@gmail.com.

Скуратович Аркадий Николаевич – ст. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Миллер Даниэль – науч. сотрудник. Ландшафтный Арборетум Университета Миннесоты (3675, MN 55318, Часка, Миннесота, США). E-mail: mille414@umn.edu.

Спиридович Елена Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Spiridovich@cbg.org.by.

Виноградова Юлия Константиновна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Главный ботанический сад РАН, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: gbsad@mail.ru.

Для цитирования

Чужеродная фракция флоры на плантациях клюквы крупноплодной *Oxycoccus macrocarpos* (Ait.) Pursh в Беларуси / Д. В. Дубовик [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 66–77.

Information about the authors

Dubovik Dmitry Vasilievich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dvubovik73@gmail.com.

Skuratovich Arkadzi Nikolaevich – Senior researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Miller Daniel – Scientist. University of Minnesota Landscape Arboretum (3675 Arboretum Drive Chaska, MN 55318, USA). E-mail: mille414@umn.edu.

Spiridovich Elena Vladimirovna – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Spiridovich@cbg.org.by.

Vinogradova Yulia Konstantinovna – D. Sc. (Biol.), Main researcher. Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences (4, Botanicheskaya Str., 127276, Moscow, Russian Federation). E-mail: gbsad@mail.ru.

For citation

Dubovik D. V., Skuratovich A. H., Miller D. R., Spiridovich E. V., Vinogradova Yu. K. Alien species on plantations *Oxycoccus macrocarpos* (Ait.) Pursh in Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 66–77.

А. А. Иманбаева, И. Ф. Белозеров

Мангышлакский экспериментальный ботанический сад, г. Актау, Республика Казахстан

КОМПЛЕКСНАЯ ШКАЛА ДИАГНОСТИКИ ИНТРОДУКЦИОННОЙ ЦЕННОСТИ РАСТЕНИЙ В АРИДНЫХ УСЛОВИЯХ МАНГИСТАУ

Дано описание комплексной шкалы определения интродукционной ценности растений в аридных условиях пустыни Мангистау, включающей 24 диагностических признака, разбитых на четыре раздела (группы): 1) биологическая устойчивость; 2) декоративно-габитуальные свойства; 3) репродуктивная способность; 4) хозяйственно-биологическое и научное значение. Приведены результаты ее апробации на примере 155 видов и форм аборигенной и инорайонной флоры. Предлагается специальная компьютерная программа DInCeR, которая кроме диагностики перспективности интродукции позволяет вводить в память компьютера разнообразную регистрационную информацию о растениях, формировать списки по семействам и родам, готовить делектус семян, подбирать ассортимент по заданным биоэкологическим, декоративным, репродуктивным и озеленительным свойствам. Все хранящиеся в базе данных сведения о таксонах можно отправить на печать, сервер, по электронной почте или экспортировать во внешние редакторы в различных графических и текстовых форматах. В DInCeR также реализована возможность программного вывода географического расположения растений на интерактивную Яндекс-карту в Интернете по заранее определенным координатам в формате GPS или десятичных градусов. В данное время в электронной базе данных программы имеются записи для 814 коллекционных интродуцентов из 5 таксономических отделов, 8 классов, 11 подклассов, 24 надпорядков, 49 порядков, 8 подпорядков, 49 семейств и 111 ботанических родов. На нее в Министерстве юстиции Республики Казахстан получено Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права за № 2339 от 14 декабря 2015 г.

Ключевые слова: интродукционная ценность, перспективность, апробация, шкала, компьютерная программа, базы данных.

A. A. Imanbayeva, I. F. Belozerov

Mangyshlak Experimental Botanical Garden, Aktau city, Republic of Kazakhstan

COMPLEX SCALE OF DIAGNOSTICS OF INTRODUCTION VALUE OF PLANTS IN ARID CONDITIONS OF MANGISTAU

The description of a complex scale of determination of plants introduction in Mangistau desert arid conditions is given. It includes following 24 diagnostic features: 1) biological stability, 2) arts and habitually properties, 3) reproductive ability, and 4) economic-biological and scientific importance. The results of its approbation by the example of 155 species and forms of indigenous flora and flora from other regions are provided. Special computer program – DInCeR is proposed. Program allow to diagnose prospects of introduction and to enter in the computer's memory a variety of registration information about the plants, forming lists for families and genera, to prepare seeds delektus, to select the plant list baswd on bioecological, decorative, landscaping and reproductive characteristics. All stored data can be sent to print in the database information on the taxa database, server, e-mail or exported to external editors in various graphical and text formats. The ability to program the output geographic location of the plant on interactive Yandex map online at predetermined coordinates in the GPS format or decimal degrees is also implemented in DInCeR. There are 814 entries for the collection of exotic species from 5 taxonomic divisions, 8 classes, 11 subclasses, nadporyadkov 24, 49 orders, 8 suborder, 49 families and 111 botanical genera are in the electronic database of the program at this time. Certificate of state registration of the copyright is received for the program from Ministry of Justice of the Republic of Kazakhstan # 2339 dated 14 December 2015.

Keywords: introduction value, prospects, approbation, scale, computer program, databases.

Введение. Крайне жесткие природно-климатические условия пустыни Мангистау, отличающиеся экстрааридностью климата, засоленностью, мелкопрофильностью и бедностью почв и напряженностью ветрового режима, обуславливают очень низкий интродукционный отбор растений, составляющий в среднем за последние более 40 лет всего 2–3 %. Поэтому с самого начала ботанического освоения мангистауского региона очень остро стоит проблема диагностики перспективности растений для интродукции. Имеющиеся разработки по данному вопросу в основном предназначены для лесной и лесостепной природных зон [1–5] и мало подходят для засушливого климата и неблагоприятных почвенно-мелиоративных условий полуострова. Большин-

ство из них включают достаточно узкий перечень диагностических параметров (в основном без декоративных качеств интродуцентов), а кроме того, приоритет, как правило, отдается показателю зимостойкости, который в экстрааридной среде обитания не может рассматриваться в качестве основного. В связи с этим в Мангышлакском экспериментальном ботаническом саду была поставлена задача составления региональной шкалы определения интродукционной ценности растений, которая учитывала бы максимально возможное количество факторов и свойств, связанных с ростом, развитием и применением интродуцентов человеком, а также реакцию растительного организма на особенности пустынной среды обитания.

Материалы и методы исследования. При составлении шкалы одновременно принимали во внимание характер природных условий пустыни Мангыштау, более 40-летний опыт интродукционных исследований в регионе, результаты анализа среднемноголетних биоэкологических свойств коллекционных видов и апробации наиболее распространенных в других ботанических центрах методик определения жизнеспособности и перспективности растений [1–5].

Для реализации шкалы в специальную компьютерную программу использованы 4 языка программирования: Microsoft Visual FoxPro 9 SP2, Visual Basic For Applications 7.0, HTML 4.0 и JavaScript API 2. Для упрощения ввода таксономических единиц использовали базу данных, созданную по списку родов R. K. Brummitt [6]. В основу систематики была положена филогенетическая система А. Л. Тахтаджяна [7].

Результаты и их обсуждение. Структурно разработанная Региональная шкала включает 24 диагностических признака (табл. 1), разбитых на четыре раздела (группы): 1) биологическая устойчивость ($n = 6$); 2) декоративно-габитуальные свойства ($n = 8$); 3) репродуктивная способность ($n = 3$); 4) хозяйственно-биологическое и научное значение ($n = 7$).

Толерантность интродуцентов к условиям среды обитания складывается как сумма баллов их засухо-, соле- и зимоустойчивости, требовательности к плодородию почвы, фитофаго- и газоустойчивости. Оценочные параметры приведены в шкале в порядке уменьшения их значимости в формировании общей устойчивости. К примеру, на засухоустойчивость может приходиться до 30 % ($n = 15$) итоговой балльной суммы ($n = 50$), на газоустойчивость – всего до 10 % ($n = 5$). При оценке декоративно-габитуальных свойств учитывается форма роста, общая декоративность вегетативной части, листопадность, обилие, продолжительность и эстетичность цветения и плодоношения. Максимальное число оценочных баллов – 20. Репродуктивная способность, оцениваемая 10 баллами, диагностируется на основе учета успешности возобновления растений в условиях культуры семенным и вегетативным способами. При определении хозяйственно-биологического и научного значения принимается во внимание возможность их использования в озеленительных, фитомелиоративных, пищевых, кормовых, лекарственных и технических целях, а также учитывается фитооохраный статус. В итоге сумма баллов не должна превышать 20.

Т а б л и ц а 1. Комплексная шкала диагностики интродукционной ценности растений в аридных условиях Мангыштау

Table 1. Comprehensive range of diagnostics of plants introduction values in Mangistau arid conditions

№ признака	Показатель, признак	Оценочные варианты и условия	Оценка, балл
<i>I. Биологическая устойчивость</i>			
1.1	Засухоустойчивость	Очень низкая	0
		Низкая	3
		Средняя	7
		Высокая	12
		Очень высокая	15
1.2	Солевыносливость	Несолевыносливые	0
		Очень слабосолевыносливые	1
		Слабосолевыносливые	2
		Солевыносливые	5
		Наиболее солевыносливые	7
		Солеустойчивые	9
		Наиболее солеустойчивые (галофиты)	10

Продолжение табл. 1

№ признака	Показатель, признак	Оценочные варианты и условия	Оценка, балл
1.3	Зимостойкость	Высокозимостойкие	8
		Зимостойкие	6
		Среднезимостойкие	3
		Малозимостойкие	1
		Незимостойкие	0
1.4	Требовательность к плодородию почвы	Малотребовательные	6
		Среднетребовательные	4
		Требовательные	2
		Очень требовательные	0
1.5	Фитофагоустойчивость	Высокая	6
		Средняя	3
		Низкая	1
		Очень низкая	0
1.6	Газоустойчивость	Газоустойчивые	5
		Относительно газоустойчивые	3
		Слабогазоустойчивые	1
		Негазоустойчивые	0
Итого			50
<i>II. Декоративно-габитуальные свойства</i>			
2.1	Форма роста и продолжительность жизни	Деревья	4
		Кустарники, лианы	3
		Полукустарники, кустарнички, полукустарнички	2
		Многолетние и двулетние травянистые растения, эфемероиды	1
		Однолетние травянистые растения, эфемеры	0
2.2	Оригинальность формы роста	Выражена	1
		Не выражена	0
2.3	Общая декоративность вегетативной части в период вегетации	Очень высокая	3
		Высокая	2
		Средняя	1
		Низкая	0
		Очень низкая	0
2.4	Листопадность	Хвойное вечнозеленое	3
		Хвойное листопадное	2
		Лиственное вечнозеленое	2
		Лиственное полувечнозеленое	1
		Лиственное листопадное	0
2.5	Интенсивность (обилие) цветения	Явно выражена	1
		Слабо выражена или не выражена	0
2.6	Продолжительность цветения, дней	Менее 10	0
		10–25	1
		Более 25	2
2.7	Эстетичность цветения	Очень высокая	4
		Высокая	3
		Средняя	2
		Низкая	1
		Очень низкая	0
2.8	Декоративность плодоношения	Очень высокая	2
		Высокая	1
		Средняя	1
		Низкая	0
		Очень низкая	0
Итого			20
<i>III. Репродуктивная способность</i>			
3.1	Размножается семенами	Хорошо	6
		Удовлетворительно	4
		Плохо	1
		Не размножается	0

Окончание табл. 1

№ признака	Показатель, признак	Оценочные варианты и условия	Оценка, балл
3.2	Размножается вегетативно	Хорошо	4
		Удовлетворительно	3
		Плохо	1
		Не размножается	0
3.3	Размножается при создании специальных условий или при использовании других способов возобновления	Хорошо	2
		Удовлетворительно	1
		Плохо	0
Итого			10
<i>IV. Хозяйственно-биологическое и научное значение</i>			
4.1	Можно использовать: для целей озеленения при создании	древесных массивов и роц	1
		линейных посадок деревьев и кустарников	1
		био групп	3
		солитеров	5
		живых изгородей	4
		вертикальных композиций	8
		почвопокровных композиций	7
		композиций водных растений	7
		газонов	9
		цветников	12
		розариев	14
		не применяется	0
4.2	для фитомелиорации	песков	5
		техногенно загрязненных земель	4
		почвенных массивов, нарушенных ветровой и водной эрозией и хозяйственной деятельностью человека	2
		не применяется	0
4.3	как пищевое	очень ценное	9
		ценное	4
		малоценное	1
		не применяется	0
4.4	как кормовое	очень ценное	8
		ценное	4
		малоценное	1
		не применяется	0
4.5	как лекарственное	очень ценное	7
		ценное	4
		малоценное	2
		не применяется	0
4.6	как техническое	очень ценное	5
		ценное	3
		малоценное	1
		не применяется	0
4.7	Фитоохранный статус	Исчезающее	11
		Редкое	7
		Эндемичное	4
		Реликтовое	3
		Сокращающееся, но не в угрожающих существованию вида размерах (сокращающееся)	2
		Неопределенное	1
Не подвергающееся угрозе сокращения численности (безопасное)			0
Итого (не более)			20
Всего			100

Шкала 100-балльная, ранжированная на 10 классов (групп) ценности интродуцентов (табл. 2).

Ниже приводятся пояснения по некоторым оценочным признакам раздела 1. «Биологическая устойчивость».

Засухоустойчивость. В условиях пустыни Мангистау все культурные растения нуждаются в поливах, а сухость воздуха наблюдается ежегодно в течение всего периода вегетации, особенно в летние месяцы. Поэтому при разделении растений по степени засухоустойчивости нами использован несколько модифицированный вариант шкал С. С. Пятницкого [8] и М. Н. Косаева [1].

Т а б л и ц а 2. Классы, суммы баллов и индексы ценности интродуцентов

Table 2. Classes, total points and indexes values of exotic species

Класс	Сумма баллов	Индекс ценности
I	0–10	Не представляющий ценности
II	11–20	Крайне низкий
III	21–30	Очень низкий
IV	31–40	Низкий
V	41–50	Пониженный
VI	51–60	Средний
VII	61–70	Повышенный
VIII	71–80	Высокий
IX	81–90	Очень высокий
X	91–100	Максимально высокий (эталонный)

Для растений с очень низкой засухоустойчивостью требуется регулярный полив в течение вегетации, летом – не реже 2–3 раз в неделю. В основном в эту группу входят гигрофиты и частично мезогигрофиты. У растений с низкой устойчивостью к засухе необратимый ущерб их росту и развитию наблюдается при перебое с поливом более 15–20 дней. Группа объединяет большинство мезогигрофитных и мезофитные растения. Среднезасухоустойчивые растения могут выжить без полива 20–25 дней, но при этом у них отмечается усыхание до половины листьев и молодых побегов. Сюда входят в основном ксеромезофиты, частично мезофиты и мезоксерофиты. У интродуцентов с высокой засухоустойчивостью заметные негативные признаки, обусловленные засухой, проявляются при 30–35-дневном перерыве в орошении. К данной группе относятся часть мезоксерофитов и большинство ксерофитов. Растения с очень высокой засухоустойчивостью для поддержания достаточно высокой декоративности и прироста также нуждаются в поливе (1 раз в 10–15 дней), но в то же время могут выжить, особенно во взрослом состоянии, без значительных повреждений при полном отсутствии орошения в течение всего вегетационного периода. Группа включает некоторых ксерофитов и всех ультраксерофитов.

Солевыносливость. Разделение интродуцентов на группы проводится в обобщенном виде по классификациям Е. С. Мигуновой [9] и И. А. Смирнова [10]: а) галофиты (вполне успешно произрастают при содержании солей 2,5–3 % и более); б) наиболее солеустойчивые (предельное содержание солей в почве, при котором растения не теряют декоративных и мелиоративных качеств, – 2–3 %); в) солеустойчивые (1,5–2 %); г) наиболее солевыносливые (1,1–1,5 %); д) солевыносливые (0,7–1,1 %); е) слабосолевыносливые (0,4–0,7 %); ж) очень слабосолевыносливые (менее 0,3–0,4 %) и з) несолевыносливые.

Зимостойкость диагностируется по шкале, применяемой в практике работы отдела дендрологии ГБС РАН [2], и по шкале, предложенной А. С. Татаринцевым [11]: а) высокозимостойкие – не повреждаются морозами даже в необычно суровые зимы; б) зимостойкие – незначительно подмерзают (в основном однолетние побеги (до 50–100 % длины) в суровые зимы; в) среднезимостойкие – значительно повреждаются морозами (двухлетние и более старые побеги) в суровые зимы; г) малозимостойкие – заметно подмерзают даже в обычные зимы, а в суровые вымерзают полностью; д) незимостойкие – вымерзают в обычные зимы.

Требовательность к плодородию почвы в узком смысле понимается как требовательность к насыщенности почвы элементами питания (олиготрофы, мезотрофы, мегатрофы и эвтрофы).

Фитофагоустойчивость. Для диагностики применяется схема классификации повреждаемости растений А. Н. Калиниченко [12], при этом исключен индекс 0 («здоровое растение») и группы названы в обратном порядке, но по индексу автора: 1) высокая устойчивость – растение не повреждается вообще вредителями и болезнями или повреждается не более 10 % анатомических органов; 2) средняя – повреждаемость по максимуму составляет 11–25 % поверхности габитуса, сильно пораженные органы не встречаются; 3) низкая (25–50 %); 4) очень низкая – зачастую растения сильно поражается, что приводит к гибели свыше 50 % из них.

Газоустойчивость. Используется деление на группы по И. А. Добровольскому [13] и Т. М. Илькуну [14] на газоустойчивые, относительно газоустойчивые, слабогазоустойчивые и негазоустойчивые.

В соответствии с разделом II шкалы «Декоративно-габитуальные свойства» в связи с низким процентом в местной флоре Мангистау растений долговечных форм роста деревьям и кустарникам присваивается большее количество баллов. При возникновении спорных ситуаций по признакам 2.5 и 2.7. «Обилие» и «Эстетичность цветения» можно оценивать их коллегиально, привлекая 4–5 опытных интродукторов.

Последний раздел шкалы IV («Хозяйственно-биологическое и научное значение») – единственный, построенный по разомкнутому принципу, т. е. сумма оценочных баллов потенциально может выйти за предел отведенных ($n = 20$). Причиной этого стал тот факт, что общая значимость интродуцентов обуславливается одновременно многоплановостью практического использования и ценностью в каждой отдельно взятой отрасли хозяйственной деятельности человека, а также уникальностью с точки зрения сохранения генофонда.

Для проверки объективности оценки перспективности растений первоначально была проведена апробация шкалы на примере представителей дендрофлоры (31 аборигенного и 124 инорайонных видов), различных по форме роста, декоративности, устойчивости и хозяйственному значению. В итоге в IX класс (очень высокая интродукционная ценность) вошли гребенщик ветвистый и можжевельник виргинский (82–83 балла); в VIII класс (высокая ценность) – мяглоплодник критмолистный, лох остроплодный, гребенщики удлинённый и Мейера, гибрид Мейера × удлинённый, саксаул черный и вьюнок персидский (71–76 баллов); в VII класс (повышенная ценность) – вяз приземистый, гребенщик тонкоколосый, рыхлый, Гогенакера и его гибриды с удлинённым и ветвистым, чингил серебристый, селитрянка Шобера, жузгуны Борцова и голова Медузы (62–70 баллов); в VI класс (средняя ценность) – гребенщик Бунге и жестер Синтениса (51–59 баллов); в IV класс (низкая ценность) – гребенщик Литвинова (39 баллов).

Комплексная шкала даже в пределах сравнительно небольшой (155 таксонов) выборки растений местной и инорайонной флоры, преимущественно с высокой и очень высокой биологической устойчивостью, дает существенный разброс оценочных баллов, что подтверждает ее комплексность, объективность и достаточно высокую достоверность, совпадающую с общим предварительным мнением интродукторов о ценности тех или иных таксонов. Распределение таксонов по классам выглядит по сравнению с ранее апробированными шкалами [1–5] почти симметрично относительно «среднего» индекса, на который приходится 23,9 % растений. «Крайне низкая» перспективность диагностирована для 2,6 % учтенных видов и форм; «очень низкая» – для 4,5; «низкая» – для 9,7; «пониженная» – для 16,8; «повышенная» – для 22,6; «высокая» – для 14,2, «очень высокая» – для 5,8 %.

В 2015 г. в МЭБС были завершены работы по переводу Региональной шкалы на электронный язык специальной компьютерной программы DInCeR, которая кроме модуля диагностики интродукционной ценности растений содержит также процедуры, формы и базы данных, предназначенные для ввода и хранения разнообразной регистрационной информации по систематике, расположению в коллекции, ареалам распространения, морфологии, экологии, гербарным образцам, с иллюстрацией фотографий и рисунков таксонов.

Главное меню программы содержит 11 пунктов: «Файл», «Правка», «Ввод», «Поиск», «Просмотр», «Списки», «Гербарий», «Ассортимент», «Базы данных», «Сервис» и «Справка» (рис. 1).

Все 254 поля флористической базы данных разделены на формах ввода и просмотра на 12 групп (страниц): Таксономия (рис. 2, с. 1), Названия, Расположение и ареалы, Морфология, Биологи-

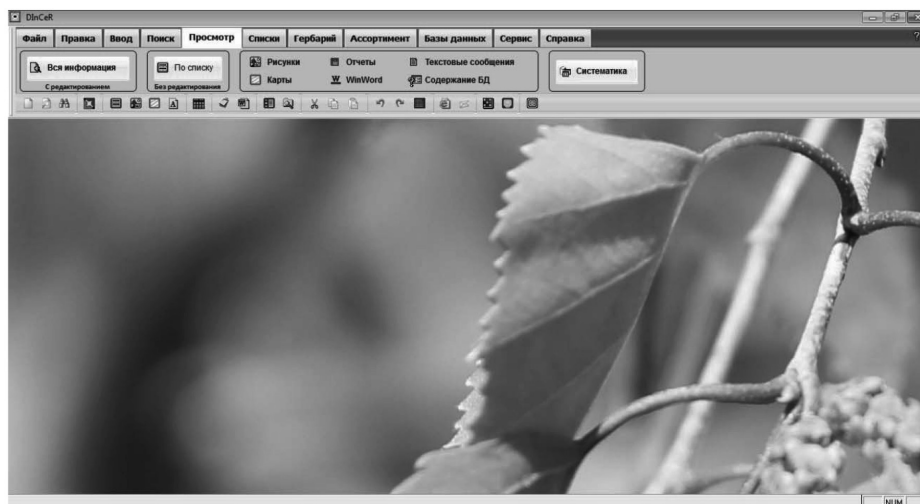


Рис. 1. Главное окно программы DInCeR
Fig. 1. The main window of DInCeR program

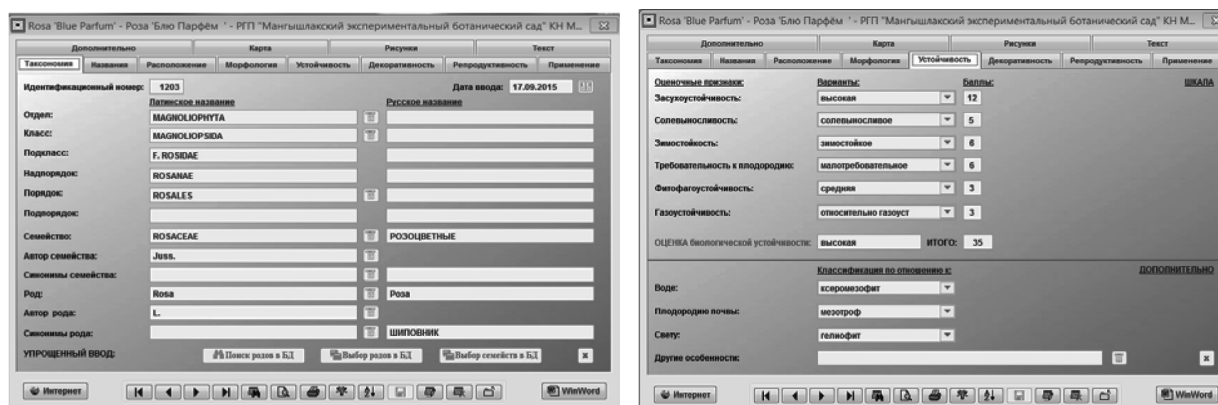


Рис. 2. Вид формы ввода и просмотра информации: страница 1 – таксономия, страница 2 – устойчивость
Fig. 2. View entry form and view the information: page 1 – taxonomy, page 2 – stability

ческая устойчивость (рис. 2, с. 2), Декоративные качества, Репродуктивная способность, Применение, Дополнительные сведения, Карта, Рисунки и Текстовые сообщения. Практически из любого места программы сведения о растении можно отправить на печать, сервер, по электронной почте или экспортировать во внешние редакторы и программы в различных форматах (txt, doc, docx, xls, xlsx, rtf, pdf, tif и xml и др.). Ассортимент растений можно подбирать в программе в двух вариантах: по диагностическим признакам и по интродукционной ценности. Кроме того, в DInCeR реализована возможность программного вывода географического расположения растений на интерактивную Яндекс-карту в Интернете по заранее определенным координатам в формате GPS или десятичных градусов.

Всего в настоящее время в электронной базе данных программы имеются записи для 814 коллекционных интродуцентов из 5 таксономических отделов, 8 классов, 11 подклассов, 24 надпорядков, 49 порядков, 8 подпорядков, 49 семейств и 111 ботанических родов. По итогам проведенной с использованием программы диагностики интродукционной ценности 628 таксонов в список наиболее перспективных для условий Мангистау включено 304 наименования, в том числе 28 таксонов хвойных, 49 – инорайонно-лиственных, 26 – вьющихся и 61 – плодово-ягодных древесных растений, 20 – представителей местной дендрофлоры и 120 – сортовых роз. На программу DInCeR в Министерстве юстиции Республики Казахстан получено Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права за № 2339 от 14 декабря 2015 г.

Заклучение. Дальнейшее совершенствование и внедрение комплексной шкалы диагностики интродукционной ценности растений и программы для ЭВМ в практику ботанических исследований в аридных регионах значительно упростит создание информационных баз данных, что позволит оперативно осуществлять поиск таксонов и в целом расширит возможности работы с информацией об интродуцентах, а также снизит затраты на подбор дифференцированного по почвенно-мелиоративным условиям ассортимента для создания зеленых устройств различного функционального назначения.

Список использованных источников

1. Косаев, М. Н. Оценка перспективности интродукции древесных растений / М. Н. Косаев // Методики интродукционных исследований в Казахстане. – Алма-Ата, 1987. – С. 37–45.
2. Лапин, П. И. Оценка перспективности интродукции древесных растений по данным визуальных наблюдений / П. И. Лапин, С. В. Сиднева // Опыт интродукции древесных растений. – М., 1973. – С. 6–67.
3. Плотникова, Л. С. Научные основы интродукции и охраны культурных растений флоры СССР / Л. С. Плотникова. – М.: Наука, 1988. – 264 с.
4. Смирнов, И. А. Методика определения перспективности интродукции древесных растений / И. А. Смирнов. – Майкоп: [б. и.], 1989. – 34 с.
5. Тыщенко, Е. Л. Методические аспекты оценки декоративных признаков гибискуса сирийского (*Hibiscus syriacus* L.) [Электронный ресурс] / Е. Л. Тыщенко, Ю. В. Тимкина // Политемат. сетевой науч. журн. Кубан. гос. аграр. ун-та. – 2011. – № 66. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2011/02/pdf/28.pdf>. – Дата доступа: 2012.2016.
6. Brummitt, R. K. Vascular plant. Families and Genera / R. K. Brummitt. – Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. – 804 p.
7. Takhtajan, A. Diversity and Classification of Flowering Plants / A. Takhtajan. – New York: Columbia University Press, 1997. – 663 p.
8. Пятницкий, С. С. Оценка селекционного материала по засухоустойчивости / С. С. Пятницкий // Практикум по лесной селекции. – М., 1961. – С. 78–102.
9. Мигунова, Е. С. Лесонасаждения на засоленных почвах / Е. С. Мигунова. – М.: Лес. пром-сть, 1978. – 144 с.
10. Смирнов, И. А. Лесомелиорация засоленных почв / И. А. Смирнов // Лес. хоз-во. – 1986. – № 10. – С. 26–28.
11. Татаринцев, А. С. Методика изучения зимостойкости сортов плодовых растений / А. С. Татаринцев // Селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур. – М., 1981. – С. 50–58.
12. Калиниченко, А. Н. Методика изучения грибных болезней плодово-ягодных культур / А. Н. Калиниченко // Методические указания по изучению и разработке мер борьбы с вредителями, болезнями и сорняками в садах Сибири. – Новосибирск, 1977. – С. 3–14.
13. Добровольский, И. А. Озеленение Криворожского железорудного бассейна / И. А. Добровольский // Бюл. ГБС АН СССР. – М., 1967. – Вып. 56. – С. 15–27.
14. Илькун, Г. М. Газоустойчивость растений / Г. М. Илькун. – Киев: Наук. думка, 1955.

References

1. Kosaev M. N. Estimation of prospects of introduction of woody plants. *Metodiki introdukcionnyh issledovanij v Kazahstane* [Methods of introduction of research in Kazakhstan], Alma-Ata, 1987, pp. 37–45. (in Russian).
2. Lapin P. I., Sidneva S. V. Estimation of prospects of introduction of woody plants according to visual observations. *Opyt introdukcii dre-vesnyh rastenij* [Experience of introduction of woody plants], Moscow, GBS AN SSSR, 1973, pp. 6–67. (in Russian).
3. Plotnikova L. S. Scientific basis for the introduction and protection of cultivated plants of flora of the USSR. Moscow, Nauka, 1988. 264 p. (in Russian).
4. Smirnov I. A. Method for determining the prospects of introduction of woody plants. *Majkop*, 1989. 34 p. (in Russian).
5. Tyshhenko E. L., Timkina Ju. V. Methodical aspects of assessment of decorative signs Syrian hibiscus (*Hibiscus syriacus* L.). *Politematicheskij setevoj Nauchnyj zhurnal Kubanskogo Gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. [Multi-disciplinary network scientific journal of the kuban state agrarian university], 2011, no. 66. Available at: <http://ej.kubagro.ru/2011/02/pdf/28.pdf>. (Accessed 20.12.2016). (in Russian).
6. Brummitt R. K. Vascular plant. Families and Genera. Kew, Royal Botanic Gardens, 1992. 804 p.
7. Takhtajan A. Diversity and Classification of Flowering Plants. New York, Columbia University Press, 1997, 663 p.
8. Pjatnickij S. S. Evaluation of breeding material for drought. *Praktikum po lesnoj selekcii* [Workshop on forest selection]. Moscow, 1961, pp. 78–102. (in Russian).
9. Migunova E. S. Plantations on saline soils. Moscow, Lesnaja promyshlennost, 1978. 144 p. (in Russian).
10. Smirnov I. A. Forest melioration of saline soils. *Lesnoe hozjajstvo* [Forestry], 1986, no. 10, pp. 26–28. (in Russian).
11. Tatarincev A. S. Method of study hardiness varieties of fruit plants. *Selekcija i sortovedenie plodovyh i jagodnyh kul'tur* [Selection and sortovedenie fruit and berry crops]. Moscow, 1981, pp. 50–58. (in Russian).

12. Kalinichenko A. N. Methods of study of fungal diseases of fruit and berry crops. *Metodicheskie ukazaniya po izucheniju i razrabotke mer bor'by s vrediteljami, boleznyami i sornjakami v sadah Sibiri* [Guidelines on research and development of measures to combat pests, diseases and weeds in the gardens of Siberia]. Novosibirsk, 1977, pp. 3–14. (in Russian).

13. Dobrovolskij I. A. Greening kryvbas. *Bjulleten' GBS AN SSSR* [Bulletin of the SBS of the USSR Academy of Sciences], 1967, vol. 56, pp. 15–27. (in Russian).

14. Il'kun G. M. *Gas resistant plants*. Kiev, Naukova dumka, 1955. (in Russian).

Информация об авторах

Иманбаева Акжунис Алтаевна – канд. биол. наук, генеральный директор. Мангышлакский экспериментальный ботанический сад (10-й микрорайон, 130000, г. Актау, Республика Казахстан). E-mail: imangarden@mail.ru.

Белозеров Иван Филаретович – канд. с.-х. наук, заместитель генерального директора. Мангышлакский экспериментальный ботанический сад (10-й микрорайон, 130000, г. Актау, Республика Казахстан). E-mail: bif17@mail.ru.

Для цитирования

Иманбаева, А. А. Комплексная шкала диагностики интродукционной ценности растений в аридных условиях Мангистау / А. А. Иманбаева, И. Ф. Белозеров // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 78–86.

Information about the authors

Imanbayeva Akzhunis Altayevna – Ph. D. (Biol.), General Director. Mangyshlak experimental botanical garden (10 microdistrict, 130000, Aktau, Republic of Kazakhstan). E-mail: imangarden@mail.ru.

Belozеров Ivan Filaretovich – Ph. D. (Agricuilt.), Deputy General Director. Mangyshlak experimental botanical garden (10 microdistrict, 130000, Aktau, Republic of Kazakhstan). E-mail: bif17@mail.ru.

For citation

Imanbayeva A. A., Belozеров I. F. Complex scale of diagnostics of introduction value of plants in arid conditions of Mangistau. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 78–86.

Т. П. Пирог, Н. А. Ивахнюк, А. А. Вороненко

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ОТРАБОТАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

С целью повышения экономической эффективности технологий продуктов микробного синтеза в качестве субстратов используются промышленные отходы. Отработанные (пережаренные) растительные масла являются дешевыми и доступными в необходимых для применения в микробных технологиях количествах. Однако при жарке в маслах образуются токсические вещества (ингибиторы синтеза целевого продукта), количество которых зависит от состава масла, в частности от соотношения в нем моно- и полиненасыщенных жирных кислот.

Изучен синтез микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана на отработанных маслах с различным соотношением моно- и полиненасыщенных жирных кислот.

Культивирование *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 (продуцент этаполана) осуществляли в жидкой среде, содержащей в качестве источника углерода отработанные масла (5 %), характеризующиеся высоким содержанием как полиненасыщенных (подсолнечное, кукурузное), так и мононенасыщенных (оливковое, рапсовое) жирных кислот. Количество ЭПС определяли весовым методом после осаждения изопропанолом, ЭПС-синтезирующую способность – как отношение концентрации ЭПС к концентрации биомассы.

Максимальная концентрация ЭПС (11–14 г/л) наблюдалась при выращивании продуцента на отработанных после жарки мяса подсолнечном и кукурузном маслах с использованием инокулята, выращенного на соответствующем рафинированном масле. Количество этаполана, синтезированного в аналогичных условиях культивирования *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 на отработанных рапсовом и оливковом маслах, было ниже (9–10 г/л), однако его ЭПС-синтезирующая способность (10–15 г ЭПС/г биомассы) превышала в 1,6–2,4 раза таковую при применении подсолнечного и кукурузного масел.

Возможность синтеза этаполана на отработанном масле любого качества (подсолнечное, кукурузное, рапсовое, оливковое) позволяет не только утилизировать накапливающиеся в больших количествах токсичные отходы, но и разработать универсальную технологию получения этого полисахарида, не зависящую от типа, качества и поставщика отработанного масла.

Ключевые слова: *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005, экзополисахариды, отработанное подсолнечное, кукурузное, оливковое и рапсовое масла.

T. P. Pirog, N. A. Ivakhniuk, A. A. Voronenko

National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

MICROBIAL SYNTHESIS OF EXOPOLYSACCHARIDE ETHAPOLAN ON VARIOUS TYPES OF WASTE VEGETABLE OILS

The research on the use of industrial waste to obtain practically valuable microbial metabolites was intensified. Oil-containing waste are cheap and available in necessary for use in microbial technologies quantities. Nevertheless in the literature there are only a few reports about the possibility of their application as substrates for the biosynthesis of microbial polysaccharides.

To investigate the synthesis of exopolysaccharide eptapolan (producer – *Acinetobacter* sp. IMV B-7005) on waste (fried) oil of various qualities (with different ratios of mono- and polyunsaturated fatty acids).

It was established that the highest ethapolan concentration (11–14 g/l) was observed under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on waste after frying meat sunflower and corn oils at concentration 5 %, with using inoculum grown on refined oils. Replacing these oils in the cultivation medium on olive and rapeseed accompanied by some decrease in EPS concentrations (to 9–10 g/l), the EPS-synthesizing ability was higher in several times (6.3–7.6 g EPS/ g biomass).

The possibility of exopolysaccharide ethapolan biosynthesis on waste vegetable oils, characterized by a high content of polyunsaturated (sunflower, corn) and monounsaturated (olive, rapeseed) fatty acids was shown.

Keywords: *Acinetobacter* sp. IMV B-7005, exopolysaccharide, waste sunflower, corn, olive and rapeseed oils.

Введение. В мировом сельском хозяйстве значительное внимание уделяется выращиванию масличных культур, общее производство которых с каждым годом увеличивается [1, 2], что в свою очередь сопровождается повышением объема получаемых растительных масел, в частности пальмового, соевого, рапсового и подсолнечного. Среди стран-производителей подсолнечного масла лидерами являются Украина (2,78 млн т в год), страны ЕС (2,36 млн т в год) и Аргентина (1,41 млн т в год) [www.saleprice.com.ua/ ua/publications _sunflower_oil_market]. Эти же страны, а также Китай – основные производители рапсового масла [3].

На предприятиях, перерабатывающих растительное сырье, а также в учреждениях общественного питания образуется значительное количество отходов. Наиболее распространенным способом утилизации отработанного масла является использование его для производства биодизеля [4, 5]. Несмотря на экологические перспективы, данная технология имеет ряд недостатков: высокую стоимость, образование значительных объемов побочного продукта (глицерола), короткий срок хранения биодизеля [4]. Более перспективным методом утилизации отработанных масел является использование их в качестве субстрата для получения продуктов микробного синтеза, в том числе и экзополисахаридов (ЭПС) – высокомолекулярных экзогенных метаболитов углеводной природы, способных к гелеобразованию и изменению реологических характеристик водных систем [4].

В наших предыдущих исследованиях [6–9] установлена способность штамма *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 к синтезу ЭПС этаполана на широком наборе C₂–C₆-моно- и смешанных субстратов, а также на рафинированном и отработанном после жарки мяса и картофеля подсолнечном масле.

Из литературы известно, что в процессе жарки при температуре выше 180 °С в маслах образуются токсические вещества, количество которых зависит от состава масла, в частности от соотношения в нем моно- и полиненасыщенных жирных кислот [10–12]. Так, например, подсолнечное и кукурузное масла характеризуются высоким содержанием полиненасыщенных кислот. При нагревании таких масел изменяется их молекулярная структура, в результате чего происходит окисление кислородом воздуха с образованием токсичных альдегидов и перекисей липидов [10–12]. Оливковое и рапсовое масла холодного отжима в процессе жарки образуют гораздо меньше альдегидов, поскольку они содержат больше мононенасыщенных и насыщенных жирных кислот, которые в меньшей степени окисляются при нагревании. Кроме того, качество пережаренного масла зависит от продукта, поддающегося термической обработке [10–12]. Образованные альдегиды и перекиси могут быть потенциальными ингибиторами роста и синтеза целевого продукта.

В работе [9] нами отмечалось, что до настоящего времени для получения микробных ЭПС используются углеводные субстраты и имеются лишь отдельные сообщения о биосинтезе полисахаридов на маслосодержащих субстратах. Кроме того, в доступной литературе нам не удалось обнаружить сведений о влиянии состава и качества отработанного масла на синтез целевого продукта.

Цель данной работы – исследовать синтез микробного экзополисахарида этаполана на отработанном растительном масле, характеризующемся высоким содержанием полиненасыщенных (подсолнечное, кукурузное) и мононенасыщенных (оливковое, рапсовое) жирных кислот.

Объект и методы исследования. В качестве объекта исследований использовали ЭПС-синтезирующий штамм *Acinetobacter* sp. 12S, депонированный в Депозитарии Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины под номером ИМВ В-7005.

Acinetobacter sp. ИМВ В-7005 культивировали в жидкой среде, содержащей (г/л): KН₂РO₄ – 6,8; КОН – 0,9; MgSO₄×7H₂O – 0,4; СаСl₂×2H₂O – 0,1; NH₄NO₃ – 0,6; FeSO₄×7H₂O – 0,001; рН 6,8–7,0. В среду дополнительно вносили 0,5 % (по объему) дрожжевого автолизата и в качестве источника пантотената (витамин В₅) – мультивитаминный комплекс «Комплевит» в концентрации 0,00095 % (в пересчете на пантотенат), поскольку *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 является ауксотрофом по пантотенату.

В качестве источника углерода и энергии использовали рафинированные и отработанные после жарки картофеля и мяса масла: подсолнечное (ТМ «Олейна», Днепропетровский масло-

экстракционный завод, Украина), кукурузное (ООО «КАМА», Полтава, Украина), рапсовое (ТМ “Bio Planete”, Франция) и оливковое масло холодного отжима (ТМ “Salvadori”, Италия), а также подсолнечное масло холостой жарки. Концентрация масла в среде составляла 5 % (по объему), поскольку ранее [8, 9] показано, что при таком содержании субстрата показатели синтеза этаполана максимальны. Пережаренное подсолнечное масло получали из сети ресторанов быстрого питания McDonald’s (г. Киев), другие масла – в домашних условиях после трехкратной жарки в течение 20 мин.

Содержание поли- и мононенасыщенных жирных кислот в маслах представлено в табл. 1 [<http://www.argo-shop.com.ua/article-9182.html>].

Т а б л и ц а 1. Характеристика растительных масел, используемых в качестве субстратов

Table 1. Characteristic of vegetable oils, used as substrates

Масло	Содержание жирных кислот (в % от общего количества)	
	полиненасыщенных	мононенасыщенных
Подсолнечное	60	33
Кукурузное	54	27
Оливковое	12	87
Рапсовое	28	63

В качестве инокулята использовали культуру в экспоненциальной фазе роста, выращенную в среде указанного выше состава, содержащей 0,5 % (по объему) масла, а также 0,5 % (по углеводам) мелассы. Количество посевного материала составляло 10 % от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30 °С в течение 5 сут.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии, которую пересчитывали на сухую биомассу по калибровочному графику.

Количество синтезированных ЭПС устанавливали весовым методом. Для этого к 10–15 мл культуральной жидкости добавляли 1,5–2,0 объема изопропанола, осадок ЭПС промывали в чистом изопропанолe и высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Синтезирующую способность определяли как отношение количества синтезированного ЭПС к биомассе и выражали в граммах ЭПС на 1 г биомассы.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений составляло от 3 до 5. Статистическую обработку данных проводили по Лакину [13]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследовали синтез этаполана на отработанных подсолнечном и кукурузном маслах (табл. 1), в составе которых преобладали полиненасыщенные жирные кислоты. В ходе экспериментов посевной материал выращивали на соответствующем рафинированном или отработанном масле (табл. 2).

Согласно представленным в табл. 2 данным, при использовании инокулята, выращенного на рафинированном масле, наиболее высокие показатели синтеза этаполана наблюдались при культивировании *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 на рафинированном и отработанном после жарки мяса подсолнечном масле. Замена подсолнечного масла в среде культивирования продуцента на кукурузное сопровождалось некоторым снижением концентрации ЭПС (до 10–11 г/л), при этом ЭПС-синтезирующая способность оставалась без изменений и составляла 6,3–7,6 г ЭПС/г биомассы. Таким образом, закономерности синтеза полисахарида при выращивании продуцента в среде, содержащей отработанные масла с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, оказались достаточно похожими.

Отметим, что при использовании отработанных подсолнечного и кукурузного масел для получения инокулята и биосинтеза ЭПС наблюдали снижение концентрации образуемого этаполана по сравнению с его концентрацией при применении посевного материала, выращенного на соответствующем рафинированном масле (табл. 2).

Таблица 2. Синтез этаполана на растительном масле с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот

Table 2. Ethapolan synthesis on vegetable oils with a high content of polyunsaturated fatty acids

Масло	Масло в среде для получения инокулята	Масло в среде для биосинтеза ЭПС	ЭПС, г/л	г ЭПС/г биомассы
Подсолнечное	рафинированное	рафинированное	13,1 ± 0,66	7,5 ± 0,38
		после жарки мяса	14,4 ± 0,72	6,3 ± 0,32
		после жарки картофеля	4,2 ± 0,21	3,3 ± 0,10
	после жарки мяса	после жарки мяса	9,7 ± 0,49	5,9 ± 0,29
	после жарки картофеля	после жарки картофеля	8,1 ± 0,41	4,3 ± 0,2
Кукурузное	рафинированное	рафинированное	10,0 ± 0,50	7,6 ± 0,38
		после жарки мяса	11,2 ± 0,56	6,3 ± 0,32
		после жарки картофеля	Н. о.	Н. о.
	после жарки мяса	после жарки мяса	8,5 ± 0,43	7,4 ± 0,37
	после жарки картофеля	после жарки картофеля	8,1 ± 0,41	7,8 ± 0,39
Подсолнечное	холостой жарки	холостой жарки	3,0 ± 0,15	6,5 ± 0,33

Примечание. Н. о. – не определяли.

Представляют интерес данные о синтезе этаполана на подсолнечном масле холостой жарки (табл. 2). При культивировании штамма ИМВ В-7005 на таком субстрате концентрация ЭПС составляла всего 3,0 г/л. Полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что целесообразность использования отработанного масла в качестве субстрата обусловливается наличием в нем питательных веществ, переходящих из пищи в процессе жарки [11, 14]. Кроме того, при холостом нагреве масла образуется в 2 раза больше токсичных альдегидов, поскольку при жарке продуктов эти соединения частично удаляются вместе с паром [11, 14].

На следующем этапе изучали возможность применения отработанных масел с высоким содержанием мононенасыщенных жирных кислот (оливкового, рапсового) для синтеза этаполана (табл. 3).

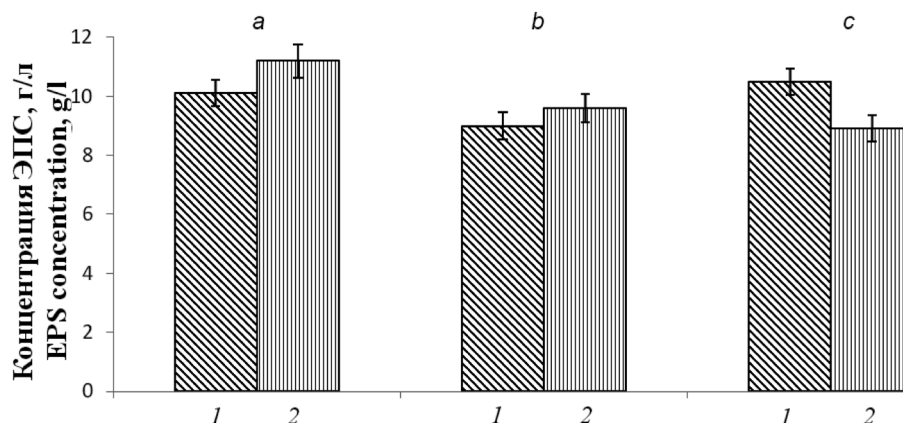
Таблица 3. Синтез этаполана на масле с высоким содержанием мононенасыщенных жирных кислот

Table 3. Ethapolan synthesis on oils with a high content of monounsaturated fatty acids

Масло	Масло в среде для получения инокулята	Масло в среде для биосинтеза ЭПС	ЭПС, г/л	г ЭПС / г биомассы
Оливковое	рафинированное	рафинированное	7,7 ± 0,39	14,0 ± 0,70
		после жарки мяса	9,6 ± 0,48	14,8 ± 0,74
		после жарки картофеля	9,0 ± 0,45	13,8 ± 0,69
	после жарки мяса	после жарки мяса	8,3 ± 0,42	10,2 ± 0,51
	после жарки картофеля	после жарки картофеля	8,0 ± 0,40	8,4 ± 0,42
Рапсовое	рафинированное	рафинированное	8,1 ± 0,41	9,3 ± 0,47
		после жарки мяса	8,9 ± 0,45	10,2 ± 0,51
		после жарки картофеля	8,6 ± 0,43	10,3 ± 0,52
	после жарки мяса	после жарки мяса	7,8 ± 0,39	9,6 ± 0,48
	после жарки картофеля	после жарки картофеля	6,1 ± 0,31	6,8 ± 0,34

Эксперименты показали, что независимо от качества масла в среде для получения инокулята (рафинированного или отработанного) концентрация этаполана, синтезированного на отработанном оливковом или рапсовом масле (9–10 г/л), несколько ниже, чем на подсолнечном или кукурузном (11–14 г/л) (см. табл. 2), однако его ЭПС-синтезирующая способность (10–15 г ЭПС/г биомассы) превышала в 1,6–2,4 раза таковую при применении подсолнечного и кукурузного масел (см. табл. 2, 3).

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что показатели синтеза этаполана на оливковом и рапсовом маслах, характеризующихся высоким содержанием мононенасыщенных жирных кислот, являются практически одинаковыми.



Синтез этаполана на отработанном после жарки мяса масле в зависимости от способа получения инокулята. Масло для биосинтеза ЭПС: *a* – кукурузное, *b* – оливковое, *c* – рапсовое. Источник углерода в среде для получения инокулята: *1* – меласса, *2* – соответствующее рафинированное масло

Ethapolan synthesis on waste after frying meat oil, depending on the inoculum preparation method Oil for the EPS biosynthesis: *a* – corn, *b* – olive, *c* – rapeseed. The carbon source in the medium for inoculum preparation: *1* – molasses, *2* – corresponding refined oil

Полученные результаты (см. табл. 2, 3) оказались неожиданными, поскольку из литературы известно, что в отработанном масле с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (подсолнечное или кукурузное) количество токсичных соединений (потенциальных ингибиторов роста микроорганизмов и синтеза целевого продукта) выше, чем в масле, содержащем в основном мононенасыщенные кислоты (оливковое или рапсовое) [11]. В то же время оливковое и рапсовое масла характеризуются наличием фенольных соединений [15], которые, очевидно, также влияют на накопление биомассы и ЭПС.

В последующих экспериментах исследовали синтез этаполана на отработанном кукурузном, оливковом и рапсовом маслах с использованием инокулята, выращенного на мелассе (см. рисунок). Это было обусловлено тем, что углеводы мелассы, внесенные вместе с инокулятом в среду культивирования, могут являться предшественниками синтеза ЭПС и непосредственно включаться в его состав. Однако концентрация этаполана, синтезированного на всех субстратах, практически не зависела от способа получения посевного материала (см. рисунок). В то же время в работе [9] нами показано, что замена подсолнечного масла в среде для получения посевного материала на мелассу сопровождалась некоторым снижением синтеза ЭПС на этом отработанном масле.

Ранее [9, 16] нами отмечалось, что данные о синтезе микробных полисахаридов на отходах различных производств (не только маслосодержащих) весьма немногочисленны. В последнее время в литературе появились новые сведения. Так, штамм *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 при культивировании в среде, содержащей 17 г/л технического глицерина (отход производства биодизеля), синтезировал 13,3 г/л целлюлозы [17]. При выращивании *Rhizobium leguminosarum* ATCC 10004 в среде со сточными водами после переработки рыбы концентрация ЭПС достигала 11 г/л [18]. Отметим, что отработанные растительные масла являются подходящими субстратами для синтеза микробных поверхностно-активных веществ [19, 20], однако в литературе нам не удалось обнаружить сведений о влиянии качества и состава таких субстратов на образование целевого продукта.

Заключение. Таким образом, в результате проведенной работы впервые показана возможность применения для синтеза микробного полисахарида этаполана не только отработанного подсолнечного, но также кукурузного, рапсового и оливкового масел.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что масло любого состава и качества может быть использовано для получения этого ЭПС, что позволяет разработать универсальную технологию его производства независимо от региона, типа отработанного масла и его поставщика.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Fry, J. The importance of the global oils and fats supply and the role that palm oil plays in meeting the demand for oils and fats worldwide / J. Fry, C. Fitton // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2010. – Vol. 29, N 3. – P. 245–252.
2. Patrick, C. Rapeseed market, worldwide and in Europe / C. Patrick, A. Pouzet // *OCL.* – 2014. – Vol. 21, N 1. doi: 10.1051/oc/2013054.
3. Концеба, С. М. Тенденции развития мирового производства и переработки рапса / С. М. Концеба, П. Т. Саблук // *Экономика АПК.* – 2010. – № 7. – С. 57–63.
4. Panadare, D. C. Applications of waste cooking oil other than biodiesel: a review / D. C. Panadare, V. K. Rathod // *IJChE.* – 2015. – Vol. 12, N 3. – P. 55–76.
5. Hossain, A. B. M. S. Biodiesel fuel production from palm, sunflower waste cooking oil and fish byproduct waste as renewable energy and environmental recycling process / A. B. M. S. Hossain, M. S. AlEissa // *Br. Biotechnol. J.* – 2016. – Vol. 10, N 4. doi: 10.9734/BBJ/2016/22338.
6. Подгорский, В. С. Интенсификация технологий микробного синтеза / В. С. Подгорский, Г. О. Иутинская, Т. П. Пирог. – Киев: Наук. думка, 2010. – 327 с.
7. Ivahniuk, M. O. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on sunflower oil / M. O. Ivahniuk, T. P. Pirog // *Ukr. Food J.* – 2014. – Vol. 3, N 2. – P. 257–262.
8. Ивахнюк, Н. А. Влияние способа подготовки посевного материала на синтез полисахарида этаполана на маслосодержащих субстратах / Н. А. Ивахнюк, Т. П. Пирог // *Науч. тр. Нац. ун-та пищевых технологий.* – 2015. – Т. 21, № 5. – С. 17–21.
9. Биотрансформация бактериями рода *Acinetobacter* отработанного подсолнечного масла в поверхностно-активные вещества и экзополисахариды / Т. П. Пирог [и др.] // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2015. – № 4. – С. 124–129.
10. Choe, E. Chemistry of deep-fat frying oils / E. Choe, D. B. Min // *J. Food Sci.* – 2007. – Vol. 72, N 5. – P. 77–86. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00352.x.
11. Changes in food caused by deep fat frying: a review / K. Bordin [et al.] // *Arch. Latinoam. Nutr.* – 2013. – Vol. 63, N 1. – P. 5–13.
12. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review / Q. Zhang [et al.] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – Vol. 165, N 6. – P. 662–681. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.07.002.
13. Лакин, Г. Ф. Биометрия: [учеб. пособие для биол. спец. вузов] / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
14. Houhoula, D. P. A kinetic study of oil deterioration during frying and a comparison with heating / D. P. Houhoula, V. Oreopoulou, C. Tzia // *JAOCS.* – 2002. – Vol. 79, N 2. – P. 133–137.
15. Fatty acid and phenolic compound concentrations in eight different monovarietal virgin olive oils from extremadura and the relationship with oxidative stability / A. Montaña [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17. doi:10.3390/ijms17111960.
16. Pirog, T. P. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste / T. P. Pirog, M. O. Ivakhniuk, A. A. Voronenko // *Biotechnol. Acta.* – 2016. – Vol. 9, N 2. – P. 7–18. doi: 10.15407/biotech9.02.007.
17. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams / E. Tsouko [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16, N 7. – P. 14832–14849. doi: 10.3390/ijms160714832.
18. Industrial wastewater as raw material for exopolysaccharide production by *Rhizobium leguminosarum* / M. Sellami [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 46, N 2. – P. 407–413.
19. Биосинтез поверхностно-активных веществ на промышленных отходах / Т. П. Пирог [и др.] // *Biotechnol. Acta.* – 2014. – Т. 7, № 5. – С. 9–26.
20. Elazzazy, A. M. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia / A. M. Elazzazy, T. S. Abdelmoneim, O. A. Almaghrabi // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2015. – Vol. 22, N 4. – P. 466–475. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.11.018.

References

1. Fry J., Fitton C. The importance of the global oils and fats supply and the role that palm oil plays in meeting the demand for oils and fats worldwide. *The Journal of the American College of Nutrition*, 2010, vol. 29, no. 3, pp. 245–252.
2. Patrick C., Pouzet A. Rapeseed market, worldwide and in Europe. *Oil seeds and fats, Crops and Lipids*, 2014, vol. 21, no. 1. doi: 10.1051/oc/2013054.
3. Kontseba S. M., Savluk P. T. Development tendencies of the world's rapeseed production and processing. *Ekonomika APK [AIC economy]*, 2010, no. 7, pp. 57–63. (in Russian).
4. Panadare D. C., Rathod V. K. Applications of waste cooking oil other than biodiesel: a review. *IJChE*, 2015, vol. 12, no. 3, pp. 55–76.
5. Hossain A. B. M. S., AlEissa M. S. Biodiesel fuel production from palm, sunflower waste cooking oil and fish byproduct waste as renewable energy and environmental recycling process. *British Biotechnology Journal*, 2016, vol. 10, no. 4. doi: 10.9734/BBJ/2016/22338.
6. Podgorskiy V. S., Iutinskaya G. O., Pirog T. P. Intensification of microbial synthesis technologies. Kyiv, Scientific Thought, 2010. 327 p. (in Russian).
7. Ivahniuk M. O., Pirog T. P. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on sunflower oil. *Ukrainian Food Journal*, 2014, vol. 3, no. 2, pp. 257–262.

8. Ivahniuk M. O., Pirog T. P. Influence of the way of inoculum preparation on synthesis of polysaccharides ethapolan on oil-containing substrates. *Nauchnye trudy Natsionalnogo universiteta pishchevukh tekhnologiy* [Scientific works of National University of Food Technologies], 2015, vol. 21, no. 5, pp. 17–21. (in Russian).
9. Pirog T. P., Pavlyukovets I. V., Ivakhniuk N. A., Savenko I. V. Biotransformation of waste sunflower oil into surfactants and exopolysaccharides by bacteria genus of *Acinetobacter*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2015, no. 4, pp. 124–129. (in Russian).
10. Choe E., Min D. B. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, 2007, vol. 72, no. 5, pp. 77–86. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00352.x.
11. Bordin K., Kunitake M. T., Aracava K. K., Trindade C. S. Changes in food caused by deep fat frying: a review. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2013, vol. 63, no. 1, pp. 5–13.
12. Zhang Q., Saleh A. S., Chen J., Shen Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2012, vol. 165, no. 6, pp. 662–681. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.07.002.
13. Lakin G. F. Biometrics: Textbook for special biological institutions. Moscow, High school, 1990. 352 p. (in Russian).
14. Houhoula D. P., Oreopoulou V., Tzia C. A kinetic study of oil deterioration during frying and a comparison with heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002, vol. 79, no. 2, pp. 133–137.
15. Montaña A., Hernández M., Garrido I., Llerena J. L., Espinosa F. Fatty acid and phenolic compound concentrations in eight different monovarietal virgin olive oils from extremadura and the relationship with oxidative stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 11. doi:10.3390/ijms17111960.
16. Pirog T. P., Ivakhniuk M. O., Voronenko A. A. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste. *Biotechnologia acta*, 2016, vol. 9, no. 2, pp. 7–18. doi: 10.15407/biotech9.02.007.
17. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16, no. 7, pp. 14832–14849. doi: 10.3390/ijms160714832.
18. Sellami M., Oszako T., Miled N., Ben Rebah F. Industrial wastewater as raw material for exopolysaccharide production by *Rhizobium leguminosarum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, vol. 46, no. 2, pp. 407–413. doi: 10.1590/S1517-838246220140153.
19. Pirog T. P., Sofilkanich A. P., Konon A. D., Grytsenko N. A. Biosynthesis of surfactants on industrial waste. *Biotechnologia acta*, 2014, vol. 7, no. 5, pp. 9–26. (in Russian).
20. Elazzazy A. M., Abdelmoneim T. S., Almaghrabi O. A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015, vol. 22, no. 4, pp. 466–475. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.11.018.

Информация об авторах

Пирог Татьяна Павловна – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, профессор, заведующий кафедрой. Национальный университет пищевых технологий. (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: tapirog@nuft.edu.ua.

Ивахнюк Николай Александрович – аспирант. Национальный университет пищевых технологий (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: Ivahniuk@mail.ru.

Вороненко Андрей Анатольевич – студент. Национальный университет пищевых технологий (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: Voronenko67@mail.ru.

Для цитирования

Пирог, Т. П. Микробный синтез экзополисахарида этаполана на различных видах отработанных растительных масел / Т. П. Пирог, Н. А. Ивахнюк, А. А. Вороненко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 87–93.

Information out the authors

Pirog Tatiana Pavlovna – D. Sc. (Biol.), Leading researcher, Professor, Head of the Department. National University of Food Technologies (68, Vladimirska Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: tapirog@nuft.edu.ua.

Ivakhniuk Nikolay Aleksandrovich – Ph. D. student. National University of Food Technologies (68, Vladimirska Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: Ivahniuk@mail.ru.

Voronenko Andrey Anatolievich – student. National University of Food Technologies (68, Vladimirska Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: Voronenko67@mail.ru.

For citation

Pirog T. P., Ivakhniuk N. A., Voronenko A. A. Microbial synthesis of exopolysaccharide ethapolan on various types of waste vegetable oils. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 87–93.

С. В. Цеханович

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ
СОРТОВ ХРИЗАНТЕМЫ КОРЕЙСКОЙ (*CHRYSANTHEMUM COREANUM* NAKAI),
ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ**

В статье приведены данные о биологических особенностях (сезонном росте и развитии) сортов хризантемы корейской, находящихся в коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Представлены результаты интродукции сортов зарубежной селекции. Приведены фенологические наблюдения развития хризантемы корейской (начало активного роста, бутонизации, цветения). Выделены группы по срокам цветения, высоте куста, окраске и типам соцветий. Показана зависимость периода цветения и обилия цветения хризантемы корейской от климатических условий.

Приведены результаты комплексной оценки декоративных и хозяйственно-биологических качеств, основанные на методике сортооценки цветочных культур по В. Н. Былову. Рекомендован 31 сорт хризантемы корейской для зеленого строительства Беларуси.

Ключевые слова: бутонизация, интродукция, коллекция, комплексная оценка, озеленение, сезонный рост, сорт, соцветие, сроки цветения, окраска и типы соцветий, хризантема, фенологические наблюдения.

S. V. Tsekhanovich

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

**FEATURES GROWTH AND DEVELOPMENT OF KOREAN CHRYSANTHEMUM VARIETY
(*CHRYSANTHEMUM COREANUM* NAKAI) INTRODUCED IN BELARUS**

The data on the seasonal growth and development of the Korean Chrysanthemum in the collection of the Central Botanical Garden of NAS of Belarus are presents. The results of introductions of varieties of foreign selection are given. Phenological observations of the development of Korean chrysanthemum (the beginning of active growth, budding, flowering). The groups under consideration were formed according to the phenological time of flowering, height of the bush, the color and types of inflorescences. The dependence of the flowering period and the abundance of flowering of Korean chrysanthemum on climatic conditions is described.

The results of a comprehensive assessment of decorative and economic-biological qualities based on the method of variety evaluation of floral cultures are presented. It was the old, and the Korean chrysanthemum 31 varieties recommended for the green construction of Belarus.

Keywords: butonization, introduction, collection, comprehensive assessment, planting, seasonal growth, grade, inflorescence, blossoming terms, color and types of inflorescences chrysanthemum, phenological observations.

Введение. Хризантема корейская (*Chrysanthemum coreanum*) – многолетнее корневищное растение семейства Астровые (*Asteraceae*), которое относится к зимостойким цветочно-декоративным растениям летне-осеннего срока цветения в условиях Беларуси.

Родиной хризантем является Юго-Восточная Азия. В результате их многовековой селекции в Китае и Японии, а в последнее столетие и в странах Европы и Америки, получено более 10 тыс. сортов. За рубежом корейская хризантема является одной из ведущих культур декоративного садоводства. Но, в отличие от Востока, в Европе в ландшафтном дизайне наряду с дорогими крупноцветными хризантемами прижились также и кустовые хризантемы, и теперь «западная» (изначально – американская) мода на кустовые хризантемы пришла и в Японию. Беларусь не является исключением. Все чаще можно увидеть хризантему корейскую не только на приусадебных участках, но и в цветниках городов и поселков. Это стало возможным благодаря тому, что наступление осенних заморозков в последние годы фиксируется в первой–второй декаде октября, и хризантема корейская успевает раскрыть свой декоративный потенциал в полном объеме. Наличие большого количества сортов с соцветиями разнообразной формы и окраски, продолжительное

цветение (с конца лета до поздней осени), неприхотливость и зимостойкость, хорошее сочетание с кустарниками и хвойными породами – все это позволяет использовать эти растения в разных типах зеленых насаждений.

Одной из проблем озеленения, ввиду очень малого числа осенних растений, является цветочное оформление городов Беларуси. Как показали исследования, осенние растения представлены в основном лишь видами *Sedum spectabile*, *Callistenus chinensis*.

В связи с этим зеленое строительство Беларуси ставит перед специалистами задачи по расширению ассортимента именно осеннецветущих сортов данных растений.

Цель работы – оценить биологические особенности интродуцированных сортов хризантемы корейской в климатических условиях Беларуси и выделить сорта для озеленения.

Объекты и методы исследования. Объектом изучения послужили около 180 сортов хризантемы корейской коллекции ЦБС НАН Беларуси, которые отличались декоративными признаками, устойчивостью к низким температурам в зимний период при культивировании в открытом грунте. Растения выращивали в грядках, подготовленных в соответствии с требованиями культуры, на открытом солнечном участке согласно общепринятым методикам [1]. Уход за хризантемами осуществляли по традиционной технологии [2, 3]. Фенологические наблюдения проводили по показателям, соответствующим данному виду растений [4, 5]. Типы соцветий хризантем классифицировали по К. Ф. Дворяниновой [2]. За основу комплексной сортооценки декоративных и хозяйственно-биологических качеств взяты методики сортооценки цветочных культур по В. Н. Былову [6, 7].

Результаты и их обсуждение. Все сорта хризантемы корейской коллекции ЦБС имеют иностранное происхождение, из них 69 сортов (55 % коллекционного фонда) созданы на Украине, 42 сорта (23 %) выведены в России. В коллекции представлены также сорта селекции Латвии, Литвы и Молдовы. Таксономический состав коллекции хризантем постоянно менялся в силу выпадения малоустойчивых сортов и привлечения новинок. Так, в последние годы коллекция пополнилась мелкоцветковыми хризантемами с безупречной шаровидной формой куста, не требующей формирования (*Gigi White*, *Білоснежка*, *Жар Пустелі*, *Кміс*), а также сортами из популярной сейчас группы «мультифлора»: *Brandindio Brandindio*, *Beacon*, *Rinco Bella*, *Белый Шар*, *Розовая Фея*. Высота этих растений не превышает 20–40 см, куст правильной шаровидной формы, диаметром до полуметра, с соцветиями широкой цветовой гаммы. Однако вышеназванные сорта группы «мультифлора» незимостойки и их использование в озеленительных посадках в условиях Беларуси возможно только как однолетней культуры.

Фенологические наблюдения за сезонным ростом и развитием хризантемы корейской показали, что их отрастание в климатических условиях Беларуси начинается с конца марта – начала апреля. Активный вегетативный рост растений отмечается с середины мая, при среднесуточной дневной температуре около 15–18 °С [1, 8].

Сроки цветения и обилие цветения некоторых сортов хризантемы корейской непостоянны и изменяются в зависимости от температурных и световых условий сезона.

Бутонизация. Хризантема корейская относится к растениям короткого дня, сокращение светового периода ускоряет ее развитие, вызывая формирование соцветий (бутонизацию) и тем самым влияя на начало цветения [2, 4]. Длина дня, обуславливающая закладку бутонов и цветение у разных сортов, неодинакова. В климатических условиях Беларуси бутонизация ранних сортов начинается при длине светового дня 16–17 ч, у средних – при длине светового дня 14–15 ч. Для закладки бутонов среднепоздним и позднецветущим сортам необходим световой день не более 9–13 ч.

Цветение. С момента бутонизации до массового цветения у ранних сортов проходит в среднем около 30 дней, световой день к этому времени уменьшается до 15–16 ч. Хризантемы средних сроков цветения зацветают приблизительно через 32 дня после начала бутонизации, при световом дне 12–14 ч. У среднепоздних сортов до начала цветения проходит 35 дней, при этом продолжительность светового дня составляет 8–11 ч. Цветение ранних сортов длится около 40 дней, средних – от 40 до 60, среднепоздних – около 20 дней (до устойчивых заморозков). Позднецветущие сорта обычно не успевают войти в стадию цветения, которое возможно только в годы с теплой продолжительной осенью.

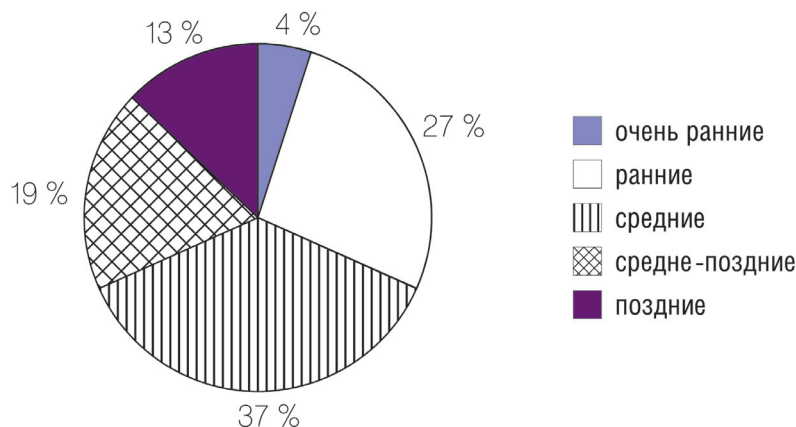


Рис. 1. Распределение сортов хризантемы корейской по срокам цветения
 Fig. 1. Distribution of varieties of chrysanthemums blooming lifecycle of Korea Rice

Анализ сортов хризантемы корейской, находящихся в коллекции ЦБС НАН Беларуси, по срокам цветения позволил выделить 5 фенологических групп (рис. 1). Среди них 37 % со средним сроком цветения, зацветающих со второй декады августа (Белоснежка, Гранат, Жар Пустелі, Золотистый Апельсин, Перлинка Белая, Фанфары и др.); 27 % с ранним сроком цветения, начало цветения которых приходится на третью декаду июля (Вродлива, Журавлинка, Крижинка, Промениста, Сонечко и др.); 19 % со средне-поздним сроком цветения, чьи соцветия начинают открываться во второй декаде сентября (Гранатовый Браслет, Звездопад, Крохитка, Кружевница, Перстень Королевы и др.); 13 % с поздним сроком цветения, зацветающих в начале или во второй половине октября (Jolder, Вересневий Бісер, Олеся, Юрий Богатиков и др.); и 4 % с очень ранним сроком цветения, зацветающих со второй декады июня (Swemba Cage, Дочь Розетты, Золотоволоска и др.).

В коллекции представлены сорта хризантемы корейской с соцветиями различной окраски. Больше всего хризантем (22 %) с оранжевыми соцветиями, 15 % сортов имеют розовые, 14 % – сиреневые, 13 % – желтые, 10 % – красные соцветия, в меньшем количестве представлены сорта с малиновыми (9 %), сиренево-розовыми (8 %), белыми (6 %), смешанными (2 %) и лососевыми (1 %) соцветиями (рис. 2).

По типу соцветий сорта коллекции корейских хризантем ЦБС представлены семью классами: простыми немахровыми, полумахровыми, анемоновидными, махровыми: плоскими, полушаро-

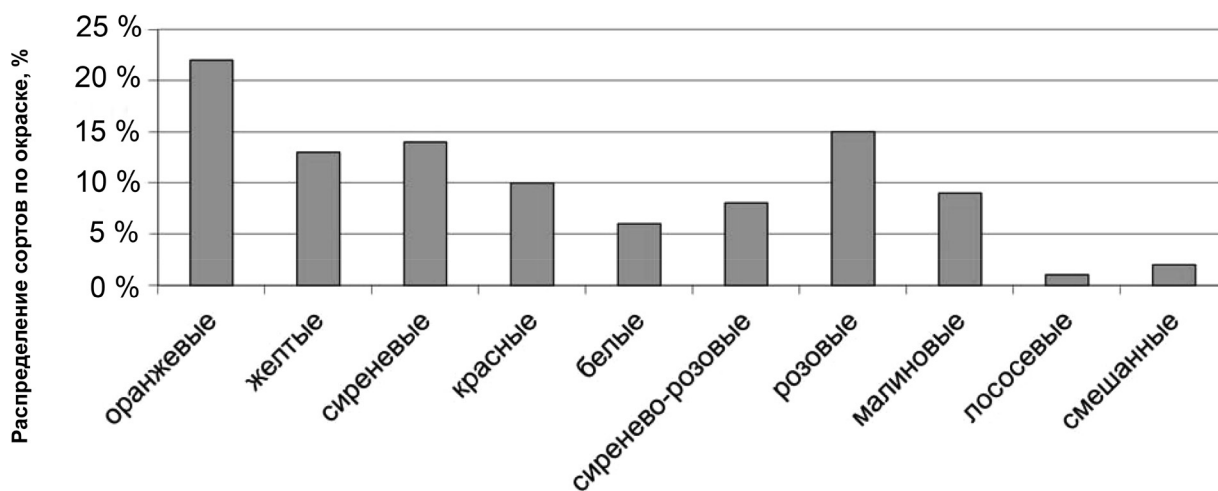


Рис. 2. Распределение сортов хризантемы корейской по окраске соцветий
 Fig. 2. Distribution of Chrysanthemum varieties of Korean Rice inflorescence color

видными, лучевидными, помпонными (рис. 3). Как видим, наибольшее количество сортов имеют махрово-плоские (26 %) и полумахровые (23 %) соцветия, около 15 % – помпонные и 12 % – простые немахровые соцветия. Наименьшим количеством представлены сорта с оригинальными типами соцветий: 9 % – полушаровидные, 8 % – лучевидные и 7 % – анемовидные.

По высоте куста сорта хризантемы корейской разделены на низкорослые, среднерослые и высокорослые (рис. 4). Среднерослые хризантемы высотой до 40–65 см составляют 65 % коллекционного фонда. Они представлены в основном сортами среднего и среднепозднего сроков цветения – Sunny Blaze, Жар Пустели, Золотоволоска, Метеорит, Перлинка Белая и др., которые пригодны для миксбордеров и бордюров. Среди среднерослых хризантем бордюрных сортов около 30 %. Высота компактных кустов, устойчивых к полеганию и патогенным факторам, не превышает 50 см – Vuissonet, Gigi White, Айса, Звездапад, Лемуня, Пак Желтый, Роменга и др. Высокорослых сортов с высотой куста более 70 см в коллекционном фонде 15 %. Это в основном сорта с поздним сроком цветения – Вересневый Бисер, Маркіза, Меланхоличный Вальс, Романтична, Славяночка и др.

Установлено, что продуктивность цветения сортов хризантемы корейской зависит от погодных условий, среди которых важнейшими факторами, влияющими на развитие растений, являются свет и температура [2]. Считается, что высокая температура при интенсивном освещении не только тормозит рост хризантем, но и отрицательно сказывается на бутонизации и цветении растений. Так, засушливая погода в вегетационный период 2015 г. (с высокими дневными температурами в июле – первой половине августа) отрицательно сказалась на декоративности многих

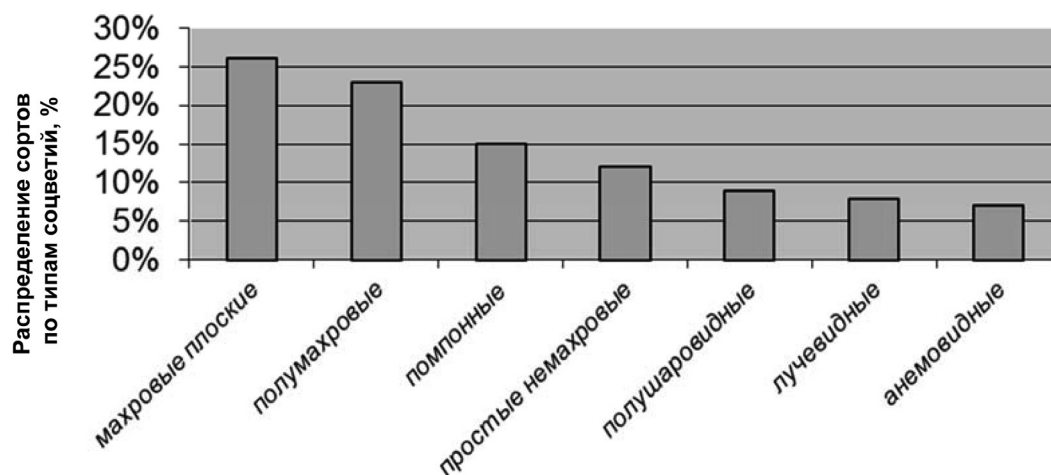


Рис. 3. Распределение сортов хризантемы корейской по типам соцветий
 Fig. 3. Distribution of varieties of chrysanthemums Korean by types of inflorescence

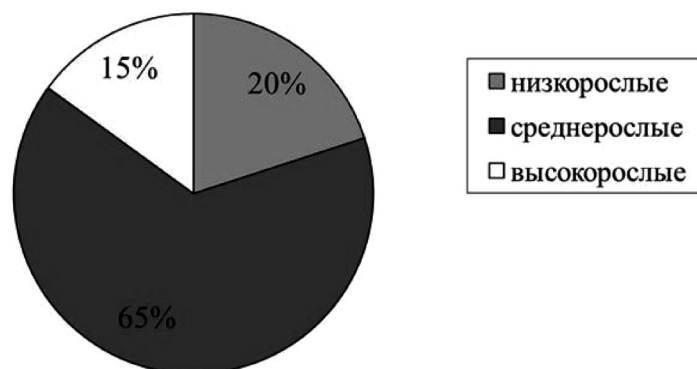


Рис. 4. Распределение сортов хризантемы корейской по высоте куста
 Fig. 4. Distribution of varieties of chrysanthemums Korean height bush

сортов хризантемы (на яркости окраски, количестве соцветий и их размере). Период цветения у очень ранних и ранних хризантем сократился на 8–11 дней (Айса, Вродлива, Журавлинка, Лето, Марта, Янтарь). У некоторых сортов среднего срока цветения (Дикий Мед, Золушка, Казачка, Кружевница, Лето, Натали, Пак Белый, Розовая Драгоценность) наблюдались уменьшение бутонов и задержка цветения на 10–14 дней. Высокая температура воздуха также вызвала торможение роста у большинства хризантем со средним и среднепоздним сроками цветения. По сравнению с предыдущим годом высота куста была ниже на 10–13 см, а у сортов позднего срока цветения – на 12–17 см.

Снижение температуры воздуха в конце августа–сентябре благоприятно отразилось на бутонизации и цветении хризантем со средним и среднепоздним сроками цветения. Теплая продолжительная осень с незначительными заморозками на 12 дней увеличила продолжительность цветения среднепоздних сортов (Gigi White, Snow Elfe, Гранат, Гранатовый Браслет, Гебе, Перстень Королевы, Розовая Фея, Роменты и др.) и стимулировала зацветание поздних сортов. Общая продолжительность цветения сортов составила 3,5 мес.

Декоративность и приспособленность сортов хризантемы корейской для Беларуси были оценены по 5-балльной шкале. В результате этой оценки выделены перспективные сорта с оценочным баллом не ниже 4. С целью отбора хризантем для зеленого строительства проведена также комплексная оценка декоративных и хозяйственно-биологических признаков перспективных сортов по 150-балльной шкале. При этом декоративность оценивали в пределах 100-балльной шкалы по 9 показателям: форме и величине соцветия, обилию цветения, яркости окраски, устойчивости к выгоранию, форме куста, его устойчивости к полеганию, числу бутонов, количеству одновременно открытых цветков. Хозяйственно-биологические признаки оценивали суммарно по 4 наиболее значимым показателям (коэффициенту размножения, зимостойкости, продолжительности цветения и устойчивости к болезням), используя 50-балльную шкалу. Согласно методике, сорта, получившие не менее 130 баллов в сумме (из 150 возможных), можно рекомендовать для широкого использования в климатических условиях Беларуси. По результатам сравнительного сортоизучения для озеленения рекомендован 31 сорт хризантемы корейской разных сроков цветения, высоты кустов, формы и окраски соцветия, отличающихся обильным и продолжительным цветением, относительно устойчивых к болезням и вредителям. Среди них 3 сорта очень раннего срока цветения – Swemba Care, Дочь Розетты, Золотоволоска; 7 ранних сортов – Айса, Вродлива, Журавлинка, Крижинка, Пектораль, Сонечко, Янтарь; 16 сортов средних сроков цветения – Білоснежка, Жар Пустелі, Золота Амфора, Золушка, Кміс, Лелія, Линда, Марта, Метерит, Опал, Пак Белый, Перлинка Белая, Промениста, Светлячок, Танго, Фанфары и 5 сортов с средне-поздним сроком цветения – Gigi White, Дюймовочка, Плюшевый Мишка, Кружевница, Розовая Фея.

Заключение. Фенологические наблюдения за ростом и развитием сортов хризантемы корейской, находящихся в коллекции ЦБС НАН Беларуси, показали, что климатические условия нашей страны вполне благоприятны для выращивания большинства из них.

Оценка декоративных и хозяйственно-биологических признаков сортов хризантемы корейской показала, что большинство из них декоративны, достаточно зимостойки, устойчивы к болезням и неблагоприятным факторам окружающей среды. Использование отобранных сортов заметно улучшит эстетику цветников и обогатит состав растений, используемых в летне-осенний период в озеленении городов Республики Беларусь.

Список использованных источников

1. Дьяченко, Н. Г. Хризантемы корейские / Н. Г. Дьяченко. – М.: МСП, 2003. – 32 с.
2. Дворянинова, К. Ф. Хризантемы (интродукция, биология и агротехника) / К. Ф. Дворянинова. – Кишинев: Штиинца, 1982. – 167 с.
3. Шмыгун, В. Н. Хризантема / В. Н. Шмыгун. – М.: Наука, 1972. – 116 с.
4. Адрианов, В. Н. Хризантемы / В. Н. Адрианов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 110 с.
5. Кабанцева, И. Н. Хризантемы / И. Н. Кабанцева. – М.: Астрель, 2005. – 192 с.
6. Былов, В. Н. Основы сортоизучения и сортооценки декоративных растений при интродукции / В. Н. Былов // Бюл. Гл. бот. сада: сб. науч. ст. / Акад. наук СССР. – М., 1971. – Вып. 81. – С. 69–77.

7. Былов, В. Н. Основы сравнительной сортооценки декоративных растений / В. Н. Былов // Интродукция и селекция цветочно-декоративных растений / Цицин Н. В.; Акад. наук ССР, Науч. совет по проблеме «Интродукция и акклиматизация растений», Гл. ботан. сад. – М., 1978. – С. 9–32.

8. Луніна, Н. М. Першасная інтрадукцыя хрызантэмы карэйскай у ЦБС АН БССР / Н. М. Луніна // Вес. Акад. навук БССР. Сер. біял. навук. – 1983. – № 4. – С. 6–9.

References

1. Dyachenko N. G. Chrysanthemum Korean. Moscow, Publishing House of Moscow union of writers, 2003, 32 p. (in Russian).
2. Dvoryaninova K. F. Chrysanthemums (introduction, biology and agricultural machinery). Kishinev, Shtiintsa, 1982, 167 p. (in Russian).
3. Shmygun V. N. Chrysanthemum. Moscow, Nauka, 1972, 116 p. (in Russian).
4. Andrianov V. N. Chrysanthemums. Moscow, Agropromizdat, 1990, 110 p. (in Russian).
5. Kabantseva I. N. Chrysanthemums. Moscow, Astrel, 2005, 192 p. (in Russian).
6. Bylov V. N. The basis of the comparative evaluation of ornamental plants and cultivar investigation when introductions. *Biulleten' Glavnogo botanicheskogo sada* [The Bulletin of the Main Botanical Garden], 1971, no. 81, pp. 69–77. (in Russian).
7. Bylov V. N. The basis of the comparative evaluation of ornamental plants. *Introduktsiya i selektsiya tsvetochno-dekorativnykh rastenii* [Introduction and breeding of ornamental plants]. Moscow, 1978, pp. 9–32. (in Russian).
8. Lunina N. M. Primary introduction Korean chrysanthemum in CBG of the Academy of Sciences of Belarus. *Vesti Akademii navuk BSSR. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the Belarusian Academy of Sciences, biological series], 1983, no. 4, pp. 6–9. (in Russian).

Информация об авторе

Цеханович Светлана Витальевна – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2а, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: S.Tsekhanovich@cbg.org.by.

Information about the author

Tsekhanovich Sviatlana – Junior researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2a, Surganova Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: S.Tsekhanovich@cbg.org.by.

Для цитирования

Цеханович, С. В. Особенности роста и развития сортов хризантемы корейской (*Chrysanthemum coreanum* Nakai), интродуцированных в Беларуси / С. В. Цеханович // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 94–99.

For citation

Tsekhanovich S. V. Features growth and development of korean chrysanthemum variety (*Chrysanthemum coreanum* Nakai) introduced in Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 94–99.

АГЛЯДЫ
REVIEWS

И. С. Соболевская, О. Д. Мяделец, Е. С. Пашинская

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Республика Беларусь

**ЦИРКАДНЫЕ РИТМЫ И МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ В ЖИВОТНЫХ КЛЕТКАХ.
ЧАСТЬ I. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧАСОВ**

В статье обзорного характера рассматриваются вопросы природы, свойств, организации и функционирования циркадных ритмов и их значение в регуляции физиологических процессов. Анализируются также молекулярно-генетические аспекты биологических часов и вопросы их взаимосвязи с метаболизмом липидов. Одними из наиболее важных процессов в организме являются метаболические циркадные ритмы. Установлено, что существует прямая зависимость между синхронизмом и процессами регуляции синтеза, всасывания и секреции липидов. При этом связь отмечается на нескольких уровнях: биохимическом, молекулярном и генетическом.

Особое внимание уделено влиянию циркадных ритмов на функционирование и строение кожи и жировой ткани, которые, в свою очередь, обладают автономными циркадными осцилляторами. При этом часовые гены регулируют активность многочисленных тканеспецифичных генов, тем самым переводя суточную информацию в физиологически значимые сигналы.

Значительная часть работы посвящена вопросам десинхронизации, его причинам и последствиям. Суточные нарушения, вызванные внешними или внутренними факторами, могут привести к срыву регуляторных систем организма, который заключается в развитии метаболических нарушений и тканевых повреждений, что в свою очередь может привести к дезадаптации организма.

Ключевые слова: циркадные ритмы, десинхронизация, гены, метаболизм липидов, кожа, белая жировая ткань.

I. S. Sobolevskaya, O. D. Myadelets, E. S. Pashinskaya

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

**CIRCADIAN RHYTHM AND LIPID METABOLISM IN ANIMAL CELLS.
PART I. MOLECULAR AND GENETIC ASPECTS OF THE BIOLOGICAL CLOCK**

This review (consisting of 2 parts) deals with the subjects of nature, properties, organization and functioning of the circadian rhythm and its importance in the regulation of physiological processes. Molecular and genetic aspects of the biological clock and its interrelation with lipid metabolism are also considered. Metabolic circadian rhythms are among the most important processes in an organism. It is established that there is a direct relationship between synchronicity and the processes of regulation of synthesis, absorption and secretion of lipids. The connection is observed at several levels: biochemical, molecular and genetic.

Particular attention is paid to the influence of the circadian rhythm on the functioning and structure of skin and fat tissues which, in its turn, have autonomous circadian oscillators. In this case, the watch genes regulate the activity of numerous tissue-specific genes, thereby translating the daily information into physiologically significant signals.

Considerable part of the work is devoted to the issues of desynchronization, its causes and consequences. Diurnal disorders caused by external or internal factors can lead to disruption of the organism's regulatory systems, which represents the development of metabolic disorders and tissue damage, which, in turn, can lead to maladaptation of the organism.

Keywords: circadian rhythm, desynchronization, genes, lipid metabolism, skin, white adipose tissue.

Суточная синхронизация – фундаментальная биологическая система, которая позволяет практически всем живым организмам «предвидеть» ежедневные изменения в окружающей среде и подготовиться к ним. Циркадные ритмы (циркадные часы) принадлежат к свободнотекущим эндогенным процессам, которые напрямую связаны с циклической сменой освещенности [1, 2].

Установлено, что околосуточные изменения запрограммированы генетически и обеспечивают особенности протекания всех биохимических, молекулярных и физиологических процессов

в организме гомойотермных животных, к числу которых относится и человек. К настоящему времени выявлено более 300 функций, которые имеют суточную синхронность. Среди огромного числа показателей, которые подвержены цикличности в течение 24 ч, можно выделить следующие: массу тела, количество эритроцитов и лейкоцитов в крови, уровень гормонов в плазме, артериальное давление, физическую выносливость, температуру тела, болевой порог чувствительности и др.

Анализ результатов недавних исследований позволил сделать вывод, что существует тесная взаимосвязь между системой синхронизации и процессами регулирования обмена веществ и энергии [3]. Это связано в первую очередь с тем, что работа циркадных ритмов помогает млекопитающим регулировать такие физиологические этапы, как прием пищи во время бодрствования, а также голодание и восстановление сил в момент сна.

Одними из наиболее важных процессов в организме являются метаболические циркадные ритмы. Установлено, что существует прямая зависимость между синхронизацией и процессами регуляции синтеза, всасывания и секреции липидов [4, 5]. При этом связь отмечается на нескольких уровнях: биохимическом, молекулярном и генетическом.

Циркадные ритмы у млекопитающих. У млекопитающих центр циркадных ритмов находится в супрахиазматическом ядре (SCN) переднего отдела гипоталамуса, которое входит в состав фотопериодической системы головного мозга [6]. SCN состоит из нескольких популяций нейронов, часто называемых циркадными (осцилляторы, контролирующие ритмы), которые при наличии синхронизации генерируют скоординированные ответы в виде транскрипционно-трансляционного механизма обратной связи [7, 8]. Для синхронизации этих колебаний с окружающей средой необходимы постоянные, регулярно повторяющиеся сигналы об изменениях, происходящих в ней. Подобные процессы обнаружены и в некоторых периферических тканях и органах (жировой ткани, печени, кишечнике, сердце и сетчатке) [3, 8, 9].

Свет является первичным и самым мощным стимулом для SCN, хотя и другие факторы, такие как потребление пищи и двигательная активность, оказывают влияние на время сигнализации. При этом происходит активация и синхронизация нейронов SCN, которые, в свою очередь, координируют поведенческие ритмы.

Таким образом, центральный отдел циркадных часов (Master-часы) находится в пределах SCN, в то время как периферические участки, которые часто называют «ведомые часы», находятся в других областях нервной системы (эпифизе и др.) [3, 8, 9]. При этом «ведомые часы» согласованы с центральным отделом через неспецифические нервные и гуморальные ответы [10].

В настоящее время установлено, что фотопериодическая информация, переклюкаясь в SCN, поступает через ряд промежуточных этапов к эпифизу, который обеспечивает процессы временной адаптации организма. При этом гормон шишковидной железы, мелатонин, по принципу обратной связи ограничивает ритмичность и метаболические процессы в этих ядрах. Некоторые авторы высказывали предположение, что эта железа выполняет функцию центральных биологических часов организма [11]. Однако некоторые исследователи, например Э. Б. Арушанян [12], полагают, что эндогенная ритмичность формируется именно в SCN, в то время как сетчатка глаза и эпифиз участвуют только в предотвращении десинхронизации внутренних ритмов.

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) принимает участие в создании и корректировке циркадного ритма, осуществляя его синхронизацию с циклом «свет–темнота». Это достигается за счет его воздействия на SCN, а также путем изменения секреции других гормонов и биологически активных веществ. Мелатонин считается контролером работы многих желез внутренней секреции. Под его регуляцией находятся такие процессы организма, как «сон–бодрствование», локомоторная активность, температура тела и некоторые другие [2, 13]. Установлено, что синтез гормона эпифиза имеет суточные особенности и начинается за несколько часов до сна. При этом самый высокий уровень его в крови отмечается к середине ночи, а к моменту пробуждения его количество постепенно уменьшается.

Суточные изменения уровня мелатонина облегчает поведенческую и физиологическую адаптацию, что необходимо для поддержания энергетического баланса и увеличения выживаемости организма.

Гормон мелатонин оказывает влияние на ритмическую экспрессию clock-генов (часовых генов) в периферических органах через свои MT1, MT2 и NRs (ядерные) рецепторы, которые находятся практически в любых органах и тканях [14].

L. Brydon и соавт. [16] доказали наличие рецепторов MT1 и MT2 в клетках белой и бурой жировой ткани. При этом мелатонин оказывает воздействие на белую жировую ткань не только с помощью рецепторов на адипоцитах, но и через действие симпатической нервной системы. Установлено, что нервные пути идут к белой жировой ткани от нейронов SCN [14]. R. Reiter и соавт. [14] продемонстрировали, что увеличение выработки мелатонина днем приводит к более интенсивной стимуляции MT1-рецепторов в нескольких областях переднего мозга, в том числе в SCN. В результате симпатическое влияние на жировую ткань увеличивается, что в конечном счете приводит к липолизу и уменьшению размеров адипоцитов. Эти исследования показывают обратную связь между мелатонином и SCN.

Поскольку адипоциты имеют clock-гены, экспрессию которых определяет мелатонин, то и активность этих клеток способна меняться в течение суток. Так, при воздействии мелатонина на адипоциты жировой ткани происходит экспрессия некоторых clock-генов (*CLOCK* и *BMAL*), которые, в свою очередь, стимулируют активацию генов, регулирующих уровень глюкозы, деятельность сердца и печени [15]. В 2008 г. M. Alonso-Vale доказал периодическое воздействие мелатонина на адипоциты.

Во время индуцированной ночи (моделированной пребыванием экспериментальных животных в течение 24 ч без света) происходит увеличение экспрессии мРНК генов *CLOCK* и *Per1*, а также повышение липогенных реакций наряду с уменьшением липолитической активности. Однако при ожирении эта регуляция снижается, что позволяет установить зависимость между чувствительностью внутриклеточного циркадного механизма жировых клеток и количеством внутриклеточного жира [17]. В экспериментах D. Rasmussen и соавт. [18] четко продемонстрирована тесная связь между уровнем мелатонина и абдоминальным ожирением.

У животных (крыс) с высоким содержанием жира установлено существенное уменьшение уровня мелатонина ночью и изменения в экспрессии часовых генов [19].

Кроме мелатонина существуют и другие гормоны, которые демонстрируют циркадные колебания и оказывают влияние на метаболизм липидов (например, адипонектин, кортикостерон, лептин и грелин).

Адипонектин получен в результате поиска продуктов транскрипции генов жировой ткани в проекте «Геном человека». Экспрессия мРНК адипонектина встречается исключительно в жировой ткани.

Адипонектин обладает антиатерогенными и противовоспалительными свойствами. В отличие от некоторых других адипоцитокинов (лептина, резистина, ФНО- α , ИЛ-6), он регулирует метаболизм липопротеинов, богатых триацилглицеролами. У людей, страдающих ожирением, концентрация этого гормона в плазме снижена, особенно у лиц с висцеральным ожирением. Концентрация адипонектина в плазме у пациентов с сахарным диабетом II типа ниже, чем у пациентов с соответствующим индексом массы тела контрольной группы.

Адипонектин активно участвует в метаболизме глюкозы и липидов, проявляя при этом циркадный характер активности (его максимальное содержание отмечается с 12.00 до 14.00, минимальное – с 03.00 до 04.00) [17]. Экспрессия гормона опосредуется фактором транскрипции SREBP-1C («спираль–петля–спираль»). В исследованиях H. Ando и соавт. [17] установлено, что синтез адипонектина регулируется белком CLOCK в клетках белой жировой ткани через циркадное выражение фактора транскрипции PPAR γ и его ко-активатора PGC1 α . Кроме того, белки-активаторы CLOCK активируют промотор (последовательность нуклеотидов ДНК) адипонектина, который опосредует его экспрессию [17, 20].

F. Scheer и соавт. [20] путем экспрессии клонирования обнаружили два рецептора адипонектина – AdipoR1 и AdipoR2. Экспрессия AdipoRs регулируется различными факторами, в том числе многочисленными ядерными рецепторами, гормоном роста и старением [21]. Следует отметить, что для обоих рецепторов (AdipoR1 и AdipoR2) характерен параллельный циркадный ритм экспрессии генов с ее понижением с 20.00 до 06.00 [21].

Установлено, что адипонектин действует непосредственно на ЦНС, регулируя, таким образом, аппетит и расход энергии [22]. При этом он является сильным индикатором метаболических нарушений. Уровень этого гормона отрицательно коррелирует с метаболическим синдромом, дислипидемией, атеросклерозом и сахарным диабетом II типа [23, 24]. S. Chung и соавт. [25] показали, что недостаток сна подавляет синтез адипонектина. Тем не менее, в ряде других исследований установлено, что суточный ритм секреции этого гормона не находится под влиянием каких-либо циклов [20].

Лептин – гормон адипоцитарного происхождения, который действует на специфические рецепторы в гипоталамусе, подавляя при этом аппетит, и увеличивает метаболизм. Этот гормон проявляет циркадные особенности экспрессии генов и белков, причем пики активности у человека отмечаются в течение фазы сна. Установлено, что количество лептина в крови зависит от размера адипоцитов [26]. При этом гормон служит показателем количества запасенной энергии. Экспрессия лептина зависит от концентрации кортизола. У людей минимальный уровень лептина наблюдается утром, когда количество глюкокортикоидов увеличивается. При этом пик содержания лептина отмечается в темное время суток, когда уровень кортизола снижен. Лептин увеличивает липолиз в жировой ткани, что, в свою очередь, приводит к снижению уровня триацилглицеролов. Гормон стимулирует также апоптоз адипоцитов. Вероятно, некоторые причины метаболических нарушений могут быть результатом лептинрезистентности, при которой развивается перегрузка клеток липидами – липотоксичность и апоптоз адипоцитов.

Грелин вырабатывается преимущественно париетальными клетками слизистой оболочки желудка. Этот гормон выступает в роли нейромедиатора в аркуатном ядре гипоталамуса. Уровень грелина в плазме крови контролируется потреблением пищи и другими метаболическими факторами. Его уровень увеличивается при голодании, а уменьшается после приема пищи. По данным A. Rodríguez и соавт. [27], грелин оказывает влияние на липогенез, а также способствует аккумуляции энергии в жировой ткани. Так, длительное введение этого гормона подопытным животным приводит к увеличению массы жировой ткани. Это, вероятно, происходит по двум причинам: во-первых, за счет усиления процесса поглощения триацилглицеролов, а во-вторых, за счет антиапоптотического эффекта на адипоциты. Грелин повышает также экспрессию генов *PPAR γ* и *SREBP1* в дифференцирующихся адипоцитах. Таким образом, грелин способствует отложению жира, в то время как лептин стимулирует расход энергии.

Влияния гормональной системы, синхронизирующие ритм активности генераторов временных процессов разных структур клеток, органа или организма, могут проявляться по-разному. В *master*-часы гормоны-комедиаторы головного мозга в ответ на свет запускают и поддерживают распространение нервного импульса от нейронов SCN к зоне выхода аксонов, способствуя последовательному экзоцитозу разных комплексов нейропептидов и медиаторов, а также Ca-зависимой транскрипции часовых генов [27].

Молекулярно-генетические аспекты циркадных ритмов. Каждая клетка на молекулярном уровне имеет специальные белки и транскрипционные цепи, которые в определенное время необходимо «включать» или «выключать» для обеспечения их надлежащего функционирования. Молекулярные циркадные часы могут контролировать метаболические процессы, ритмично активируя или подавляя гены, вовлеченные в обмен веществ [29]. Тысячи часовых генов обладают циркадным характером экспрессии продолжительностью приблизительно 24 ч, но на самом деле только около трети из них проявляют цикличность в конкретных тканях [30]. Множество белков-осцилляторов, находящихся под контролем циркадных ритмов, заметно различаются в тканях. Однако это указывает на то, что программа транскрипции является тканеспецифической и определяется экспрессией определенных генов [29].

Наибольшие циклические колебания экспрессии отмечаются в таких белках часовых генов (*clock-genes proteins*), как *period* (часовые белки *Per1*, *Per2*, *Per3*), *cryptochrome* (фоторецепторные белки *Cry1*, *Cry2*), *CLOCK* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* и его функциональный дублер белок *NPAS2*), *BMAL1* (*Brain and Muscle Arnt-like protein 1*, или *Arnt1*), *TIMELESS*, *PGC-1 α* (ко-активатор *PPAR γ*), которые взаимосвязаны петлями положительных и отрицательных обратных связей [31].

Clock-белки способны выполнять следующие функции: регуляцию обмена веществ и энергии и формирование метаболических циркадных ритмов; формирование суточных ритмов двигательной активности, сна и бодрствования; взаимодействие с другими осцилляторами циркадианного ритма и некоторые другие. Все clock-белки относятся к семейству транскрипционных факторов, содержащих домены basic-helix-loop-helix (bHLH) и PAS. Они способны связывать белок с ДНК-промоторами часовых генов, запуская их транскрипцию, что приводит к повышению уровня мРНК и соответствующих часовых белков, которые являются отрицательными элементами петли.

Центральным звеном часового механизма являются лишь несколько пар белков clock-генов, которые способны взаимодействовать между собой с образованием транскрипционных гетеродимерных комплексов: Per (из гена *period*) + Cry (из гена *cryptochrome*), CLOCK (из гена *clock*) + BMAL1 (из гена *Bmal1*).

Так, комплекс белков CLOCK/BMAL1 транслоцируется в ядро, где активирует транскрипцию генов с одним или несколькими сайтами E-бокс (Enhancer-box). При этом родственность E-бокса к гетеродимеру определяет степень влияния CLOCK/BMAL1 на контролируемые ими гены (*per*, *cry*, семейство *Ror*, *Rev-erba*, *PPAR α* , *PPAR γ*), которые в свою очередь регулируют транскрипцию или активность белков CLOCK/BMAL1 [31].

E-боксы, являясь одним из пяти крупнейших семейств транскрипционных факторов, связанных с циркадной фазой, присутствует в большинстве тканей (SCN, печени, аорте, надпочечниках, белой жировой ткани и др.) [30].

Система белков CLOCK/BMAL участвует в дневной регуляции уровня глюкозы и триацилглицеролов [29], тогда как белок BMAL1 регулирует синтез липидов и адипогенез [4]. При этом колебание экспрессии BMAL1 обусловлено ритмическими изменениями со стороны генов семейств *Ror* и *Rev-erba*.

При подавлении транскрипционной активности *Bmal1*, молекула которого содержит репрессоры PAS A и PAS B, связывается с разными доменами: Per2 – с PAS A и частично с соседним доменом, осуществляющим связь с ДНК, – bHLH, тогда как белки Cry1 и Cry2 – с PAS B [31]. Это определяет попеременное доминирование функций Per/Cry и Clock/Bmal1 в течение суток.

Однако результаты исследований дают более сложную картину. Показано, что в клетках печени частота связывания с ДНК была наибольшей для белков BMAL1, Clock и Npas2 в утренние часы (6.00–10.00), для Per1, Per2, Cry2 максимум активности приходился на 16.00, тогда как для Cry1 – на 24.00–01.00. Изучение динамики и локализации эффектов Cry1 показало, что этот белок участвует в контроле собственной транскрипции в зависимости от ультрадианных фаз околосуточного ритма. Он может воздействовать на связывание соответствующих транскрипционных факторов с разными последовательностями ДНК: «утренними» (Clock/Bmal1 – с E/E box в промоторе гена *cry1*), «дневными» (DBP – с D-box в составе проксимального промотора гена *cry1*) и «ночными» (*Rev-erba* или ROR с RRE – *Rev-erba*, в составе интрона энхансерной области гена *cry1*) [32].

Установлена также роль белкового комплекса CLOCK/BMAL1 в регуляции долголетия клеток. Так, через промотор E-боксы циркадных генов они контролируют транскрипцию гена NAMPT, который при снижении уровня энергетического обмена кодирует белок-фермент, который и катализирует окислительно-восстановительные реакции. Увеличение содержания и активности NAMPT на определенной фазе циркадианного ритма приводит к росту уровня NAD⁺ и активации NAD⁺-зависимой гистоновой деацетилазы SIRT-1 (silent information regulator 1, sirtuin 1) в цитоплазме и SIRT-3 и SIRT-4 – в митохондриях, а также NAD⁺-ADP-рибозил трансферазы 1 (или PARP-1, Poly [ADP ribose] polymerase 1). Часовые осцилляторы через изменение в циркадианном ритме NAD⁺, а также SIRT-3 и SIRT-4, деацетилирующих и активирующих ферменты митохондрий, обуславливают когерентные вариации уровня окислительных процессов. SIRT1 в цитоплазме деацетилюет часовые белки CLOCK, BMAL1, Per2 и PGC-1 α . Это приводит к ослаблению свойств гистоновой ацетилтрансферазы у белка CLOCK и, следовательно, к снижению взаимодействия белков в димере CLOCK/BMAL1 с последующим уменьшением сродства BMAL1 к E-боксам [31].

Деацетилованный PGC-1 α является ко-активатором транскрипционного фактора белка ROR α , который, в свою очередь, отвечает за экспрессию генов *Bmall* и *Clock* [33]. При этом Per2, деацетилованный SIRT-1, подвергается убиквитированию и протеасомному протеолизу, что уменьшает его репрессорное воздействие на транскрипционную активность гетеродимера CLOCK/BMAL1. Однако сам Per2, вне его функций в осцилляторе, регулирует уровень гликогена в печени при голодании и возвратном питании. Кроме того, при снижении температуры тела Per2 в митохондриях активирует транскрипционные процессы, важные для энергетического гомеостаза [31].

Установлено, что PGC-1 α является ключевым регулятором биогенеза митохондрий, печеночного глюконеогенеза, окисления жирных кислот и биосинтеза гема. Выраженность PGC-1 α в метаболических тканях показывает устойчивость по отношению к циркадным ритмам [34, 35]. Это частично происходит из-за прямой транскрипционной репрессии гена *Rev-erba*. С другой стороны, PGC-1 α стимулирует экспрессию генов *Bmall* и *Rev-erba* через ко-активацию рецепторов ROR α и ROR γ (описание далее по тексту) [35]. Недавние исследования показали, что регулирование обратной связи между REV-ERB α и PGC-1 α отмечается за счет гормона FGF21, который регулирует углеводный и липидный обмен.

Ядерные рецепторы (NRs) совместно с другими белками способны регулировать экспрессию генов, которые имеют важное значение для развития организма, гомеостаза и метаболизма [10]. NRs способны связываться с конкретными областями ДНК и регулировать скорость ее транскрипции. Большинство ядерных рецепторов связываются с ДНК в виде димеров (гомо- или гетеродимеров). Небольшое количество NRs обладает способностью связываться с ДНК в качестве мономеров. Связывание лиганда вызывает конформационные изменения в пределах карбокситерминального лиганд-связывающего домена (LBD, или E-область), обнажая поверхность для конкретных взаимодействий. Это приводит к набору дополнительных белков, которые впоследствии модифицируют хроматин и изменяют транскрипцию генов. NR-лиганды представляют собой небольшие гидрофобные молекулы, такие как стероидные гормоны, жирные кислоты, липофильные производные витаминов, биологически активные метаболиты, а также антибиотики и синтетические наркотики. Примерно у половины NRs, найденных у человека, обнаружены эндогенные лиганды. По результатам многочисленных исследований установлена тесная связь между количеством NRs, функцией рецепторов и их участием в контроле различных метаболических процессов [10].

Существует несколько ядерных рецепторов (REV-ERBs: REV-ERB- α и REV-ERB- β), рецепторов-активаторов пролиферации (PPAR α , PPAR γ и PPAR δ), а также рецепторов, ассоциированных с рецепторами ретиноевой кислоты (ретиновые orphan-рецепторы, RORs: ROR α и ROR γ), которые являются ключевыми компонентами в регуляции уровня часовых белков BMAL1 и CLOCK, обеспечивающими механизм циклической регуляции липидного обмена в белой и бурой жировых тканях, печени и мышцах посредством транскрипционной репрессии метаболических генов [30].

Ученые обнаружили, что ядерные рецепторы REV-ERB α и REV-ERB β в клетках мышей имеют значение для поддержания нормального сна и циклов приема пищи, а также метаболизма питательных веществ. Считается, что уровень REV-ERB α резко увеличивается во время дифференцировки адипоцитов, является негативным регулятором выраженности BMAL1. REV-ERB α демонстрирует также уникальные суточные вариации экспрессии в жировой ткани и печени крыс [10]. В ходе дифференцировки адипоцитов REV-ERB α действует противоположно фактору дифференцировки PPAR γ . Эктопическая экспрессия REV-ERB α в преадипоцитах способствует их дифференцировке в зрелые клетки [4].

Исследования L. Solt и соавт. [10] подтвердили, что связывание рецепторов REV-ERBs с лигандами приводит к изменению экспрессии генов, регулирующих обмен липидов и глюкозы, а его блокирование стимулирует гипергликемию. Кроме того, обнаружены эффекты снижения уровня экспрессии липогенных генов в печени, повышения уровня ферментов, ответственных за окисление глюкозы и жирных кислот, транспорта жирных кислот в мышечную ткань. Отмечена связь между синхронизмом и липогенезом, который включается через рецептор REV-ERB α . Так, REV-ERB α контролирует сигналы SREBP и гомеостаз желчных кислот. Оба этих процесса имеют

важное значение для липидного обмена. Часовые гены также косвенно регулируют липогенез через PPARs [10].

Следует отметить, что под суточным контролем находятся также все члены семейства рецепторов PPAR [30], в том числе и PPAR α , который способствует транспортировке, а также митохондриальному β -окислению жирных кислот. PPAR α является членом семьи ядерных рецепторов, который регулирует транскрипцию генов, вовлеченных в обмен жиров и глюкозы. Ритмичность производства PPAR α представляет собой пример взаимной связи между циркадными и метаболическими процессами. У млекопитающих выраженность PPAR α достигает своего пика в начале ночи.

PPAR γ (рецептор, активизирующий пролиферацию пероксисом γ) регулирует процессы хранения жирных кислот и метаболизма глюкозы. Активированные с помощью PPAR γ гены стимулируют поглощение липидов жировыми клетками, а также кодируют митохондриальные, пероксисомальные и некоторые микросомальные ферменты метаболизма жирных кислот в печени.

Установлено, что PPAR γ является главным регулятором дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в адипоциты [32]. Транскрипция белков PPAR γ индуцируется CLOCK и BMAL1 через интронный E-box [32]. В противоположность этому экспрессия белков PPAR γ регулируется двумя генами управления: DBP и E4bp4 (промотор E4 A-связывающий белок 4). При этом DBP является активатором, в то время как E4BP4 – репрессором. Отмечается, что ко-активатором для фактора транскрипции PPAR γ является PGC-1 α (см. выше). При этом PGC-1 α активирует экспрессию генов *Bmall* и *Rev-erba* путем совместного воздействия на orphan-рецепторы ROR α и ROR γ [22]. PGC-1 α индуцирует также экспрессию *lipin1*, который способствует активации PPAR. Следовательно, система PGC-1 α /*lipin1* является регулирующим модулем, который осциллирует как единое целое и способствует окислению жирных кислот во время увеличения двигательной активности [22].

ROR α является регулятором липогенеза и накопления жиров в скелетной мышечной ткани и положительным регулятором гена *Bmall* [30]. ROR α конкурирует с REV-ERB α за связывание с их общими ДНК элементами. Колебание выраженности ROR α и REV-ERB α в SCN приводит к изменению экспрессии белка BMAL1 [10]. Таким образом, PPAR γ , REV-ERB α , ROR α являются ключевыми компонентами циркадного осциллятора, который объединяет суточные ритмы и липидный обмен.

Функциональным «дублером» часового белка CLOCK является NPAS2, который образует гетеродимеры с BMAL1 и эффективно участвует в регуляции циркадных ритмов у млекопитающих. Недавно установлено, что ген *NPAS2*, как и *BMAL1*, являются мишенью для ROR α и REV-ERB α . При этом последние регулируют экспрессию NPAS2 [10].

Циркадные часы также участвуют в регуляции экспрессии транскрипционного регулятора *Spot14*, который контролирует гены, отвечающие за синтез жирных кислот. Этот регулятор активируется в ответ на липогенные раздражители. Опытным путем показано, что уровни печеночных *Spot14* мРНК достигали своего пика в начале темного периода (обычное время для приема пищи у грызунов). В период голодания концентрация *Spot14* мРНК обычно уменьшается, но по-прежнему сохраняет зависимость от времени суток [10].

Метаболизм липидов и суточные ритмы. Одними из наиболее важных процессов в организме являются метаболические циркадные ритмы. Установлена прямая зависимость между синхронизмом и процессами регуляции синтеза, всасывания и секреции липидов [2, 5].

М. Sotak и соавт. [41]. в исследованиях на грызунах установили, что часовые гены жировой ткани (*Bmall* и *Per2*) регулируют гидролиз триацилглицеролов в жировой ткани и обеспечивают ритмичное высвобождение свободных жирных кислот и глицерола из адипоцитов. При этом нарушение их работы снижает общую липолитическую активность и притупляет ответ на голодание. Таким образом, мобилизация триацилглицеролов в жировой ткани и высвобождение свободных жирных кислот в кровь имеет решающее значение для выживания в период длительной физической активности.

У человека установлены два отдельных скачка уровня триацилглицеролов в плазме крови: первый – через 8 ч после пробуждения, второй – через 20 ч. При этом показано, что эксперимен-

тальный десинхронизм не оказывает влияния на первый скачок, но приводит к потере второго. На основании этого L. Morgan и соавт. [36] выдвинули предположение, что первый пик в основном зависит от эндогенного циркадного регулирования, а второй, вероятно, от более тонко настроенных циклов сна. Из этого следует, что внутренние циркадные часы являются главным регулятором колебаний липидного профиля плазмы. Следовательно, изменения в графике сна или приема пищи не могут влиять на эту систему.

Ряд исследователей установили, что молекулярные часы участвуют в контроле липогенеза. Так, F. W. Turek и соавт. [4] доказали, что у мышей с мутацией в часовом гене возможно развитие гипертриацилглицеролемии. Как позже установлено J. E. Vaggs и соавт. [37], это связано в первую очередь с влиянием ритмов на печень и кишечник. Известно, что для ряда функций кишечника, таких как синтез ДНК, обновление эпителиальных клеток, всасывательная моторика и др., характерна циркадность. Опыты на животных показали, что у грызунов всасывание липидов энтероцитами было выше ночью и ниже днем [38, 41]. При этом ключевую роль в контроле этих процессов играет ген *Clock*. *Clock*-гены способны не только контролировать процесс всасывания липидов, но и участвовать в регуляции их биосинтеза [42, 43]. Так, процесс синтеза холестерина в печени и кишечнике имеет циркадные особенности (выше ночью и ниже днем), которые достигаются за счет экспрессии β -гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы) и *CYP7A1*. У млекопитающих суточные изменения наблюдались также в колебании концентрации нескольких ключевых белков, участвующих в регуляции метаболизма триацилглицеролов (липофильные ферменты, AroAIV и PPAR) [44]. При этом в жировой ткани и печени отмечались колебания в синтезе жирных кислот (FaS), ацетил-СоА- карбоксилазы (AcC), SREBP1c и FABP4 [45].

По данным J. Vaggs и соавт. [37], суточные колебания таких веществ, как лептин, глюкоза, триглицериды, свободные жирные кислоты и холестерол ЛПНП в плазме крови находятся под контролем часовых ритмов адипоцитов. Циркадные ритмы в жировой ткани поддерживают ее состояние и энергетический гомеостаз [37].

S. Shimba и соавт. [40] установили, что ген *Bmal1* является важным регулятором адипогенеза и липидного обмена в созревающих адипоцитах. Параллельно с прямым регулированием деятельности адипоцитов с помощью часовых генов координацию сигнальных путей в жировой ткани может осуществлять экспрессия ядерных рецепторов [34]. Как отмечалось выше, PPAR γ является регулятором адипогенеза и энергетического обмена в адипоцитах [46]. Колебания в накоплении PPAR γ в жировой ткани способствуют временной флуктуации метаболизма [34, 39, 40].

Еще одним рецептором, способным модулировать липогенез, является REV-ERB α [47]. Недавние исследования A. Kohsaka и соавт. [47] показали, что систематическое введение агониста REV-ERB α мышам с диет-индуцированным ожирением способствует их похудению за счет уменьшения жировой массы. Кроме того, у животных уменьшается степень дислипидемии и гипергликемии [2]. Выраженность генов метаболизма в жировой ткани зависит от обработки их агонистами REV-ERB α [48].

Таким образом, изучение циркадных ритмов открывает возможности для поиска новых путей ограничения и предупреждения негативных последствий влияния абиотических факторов на экспрессию генов, биохимические параметры, функциональное и структурное состояние органов и тканей, выполняющих специфические функции. Это позволит осуществить целенаправленную профилактику и лечение при возникновении патологических процессов.

Список использованных источников

1. Halberg, F. Chronobiology: methodological problems / F. Halberg // Acta. Med. Rom. – 1980. – N 18. – P. 399–440.
2. Семак, И. В. Физиологические и биохимические механизмы регуляции циркадных ритмов / И. В. Семак, В. А. Кульчицкий // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер.: Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем. – Минск, 2007. – Т. 2, ч. 1. – С. 17–37.
3. Froy, O. Long-lived α MUPA transgenic mice exhibit pronounced circadian rhythms / O. Froy, N. Chapnik, R. Miskin // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2006. – Vol. 291. – P. E1017–E1024.
4. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice / F. W. Turek [et al.] // Science. – 2005. – Vol. 308. – P. 1043–1045.

5. Brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis / S. Shimba [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102 (34). – P. 12071–12076.
6. Заморский, И. И. Латеральное ядро перегородки мозга: морфологическая и функциональная организация, роль в формировании хроноритмов / И. И. Заморский, В. Ф. Мыслицкий, В. П. Пишак // *Успехи физиол. наук.* – 1998. – Т. 29, № 2. – С. 68–87.
7. Herzog, E. D. Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons / E. D. Herzog, J. S. Takahashi, G. D. Block // *Nat. Neurosci.* – 1998. – Vol. 1. – P. 708–713.
8. Reppert, S. M. Coordination of circadian timing in mammals / S. M. Reppert, D. R. Weaver // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 935–941.
9. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock / C. Lee [et al.] // *Cell.* – 2001. – Vol. 107. – P. 855–867.
10. Solt, L. A. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists / L. A. Solt, Y. Wang, S. Banerjee // *Nature.* – 2002. – Vol. 485 (7396). – P. 62–68.
11. Хавинсон, В. Х. Старение эпифиза / В. Х. Хавинсон, А. Г. Голубев // *Успехи геронтологии.* – 2002. – Т. 9. – С. 67–72.
12. Арушанян, Э. Б. Гормон эпифиза мелатонин – новое ноотропное средство? / Э. Б. Арушанян // *Эксперим. и клин. фармакология.* – 2005. – Т. 68, № 3. – С. 74–79.
13. Jouvet, M. Sleep and serotonin: an unfinished story / M. Jouvet // *Neuropsychopharmacology.* – 1999. – Vol. 21. – Suppl. 2. – P. 24S–27S.
14. Reiter, R. J. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions / R. J. Reiter // *Adv. Med. Sci.* – 2007. – P. 211–228.
16. Bartness, T. J. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue / T. J. Bartness, C. K. Song // *J. Lipid. Res.* – 2007. – Vol. 48. – P. 1655–1672.
15. Maenura, K. Circadian Rhythms in CNS and Peripheral Clock Disorders: Role of the Biological Clock in cardiovascular diseases / K. Maenura, N. Taceda, R. Nagai // *J. Farmocol. Sci.* – 2007. – Vol. 103. – P. 134–138.
16. Alonso-Vale, M. I. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes / M. I. Alonso-Vale, S. Andreotti, P. Y. Mukai // *J. Pineal. Res.* – 2008. – Vol. 45. – P. 422–429.
17. Ando, H. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue / H. Ando, H. Yanagihara, Y. Hayashi // *Endocrinology.* – 2005. – Vol. 146. – P. 5631–5636.
18. Wolden-Hanson, T. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat / T. Wolden-Hanson // *Endocrinology.* – 2000. – Vol. 141. – P. 487–497.
19. Cardinali, D. P. Melatonin and the metabolic syndrome: physiopathologic and therapeutical implications / D. P. Cardinali, P. Cano, V. Jiménez-Ortega // *Neuroendocrinology.* – 2011. – Vol. 93. – P. 133–142.
20. Scheer, F. A. Day/night variations of high-molecular-weight adiponectin and lipocalin-2 in healthy men studied under fed and fasted conditions / F. A. Scheer, J. L. Chan, J. Fargnoli // *Diabetologia.* – 2010. – Vol. 53. – P. 2401–2405.
21. Adiponectin receptor signaling in the brain / J. Thundyil [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 165. – P. 313–327.
23. Yang, W. S., Lee W. J. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin / W. S. Yang, W. J. Lee // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – Vol. 86. – P. 3815–3819.
24. Factors related with adiponectinemia in obese and normal-weight women and with its variation in weight loss programs / J. Silva-Nunes [et al.] // *Obes. Facts.* – 2013. – Vol. 6. – P. 124–133.
25. Melatonin attenuates dextran sodium sulfate induced colitis with sleep deprivation: possible mechanism by microarray analysis / S. H. Chung [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2014. – Vol. 59. – P. 1134–1141.
26. Diamond, F. B. Jr. Leptin and the adipocyte endocrine system / F. B. Jr. Diamond, D. C. Eichler // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2002. Sep. 39 (4–5). – P. 499–525.
27. Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes / A. Rodríguez [et al.] // *Inter. J. of Obesity.* – 2009. – Vol. 33 (5). – P. 541–552.
28. Ghrelin induces adiposity in rodents / M. Tschoop [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – P. 908–913.
29. Panda, S. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock / S. Panda // *Cell.* – 2002. – Vol. 109. – P. 307–320.
30. Yan, J. Analysis of Gene Regulatory Networks in the Mammalian Circadian Rhythm / J. Yan // *PLOS Computational Biology.* – 2005. – Vol. 4 (10). – P. e1000193.
31. Чернышева, М. П. Временная структура биосистем и биологическое время / М. П. Чернышева. – СПб.: Написано пером, 2014. — 172 с.
32. Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function / M. Ukai-Tadenuma [et al.] // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – P. 268–281.
33. Albrecht, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks / U. Albrecht // *Neuron.* – 2012. – Vol. 74. – P. 246–260.
34. Yang, X. Nuclear receptors, metabolism, and the circadian clock / X. Yang, K. A. Lamia, R. M. Evans // *Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 2007. – Vol. 72. – P. 387–394.
35. Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism / C. Liu [et al.] // *Nature.* – 2007. – Vol. 447. – P. 477–481.
36. Effects of the endogenous clock and sleep time on melatonin, insulin, glucose and lipid metabolism / L. Morgan [et al.] // *J. Endocrinol.* – 1998. – Vol. 157. – P. 443–451.

37. Network features of the mammalian circadian clock / J. E. Baggs [et al.] // PLOS. Biol. – 2009. – Vol. 7. – P. e52.
38. Pan, X. Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice / X. Pan, M. M. Husain // J. Lipid. Res. – 2009. – Vol. 50. – P. 1800–1813.
39. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology / S. Sukumaran [et al.] // Physiol. Genomics. – 2010. – Vol. 42A (2). – P. 141–152.
40. Brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis / S. Shimba [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 102 (34). – P. 12071–12076.
41. Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon / M. Soták [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2011. – Vol. 301. – P. G1066–G1074.
42. Back, P. Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: Diurnal changes of activity and influence of bile acids / P. Back, B. Hamprecht, F. Lynen // Arch. Biochem. Biophys. – 1969. – Vol. 133. – P. 11–21.
43. Hamprecht, B. Rhythmic changes of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase activity in livers of fed and fasted rats / B. Hamprecht, C. Nüssler, F. Lynen // FEBS Lett. – 1969. – Vol. 4. – P. 117–121.
44. Ho, K. Circadian rhythm of cholesterol biosynthesis: Dietary regulation in the liver and small intestine of hamsters / K. Ho // Int. J. Chronobiol. – 1979. – Vol. 6. – P. 39–50.
45. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice / A. Kohsaka [et al.] // Cell Metab. – 2007. – Vol. 6. – P. 414–421.
46. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle / W. He [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100 (26). – P. 15712–15717.
47. Cristancho, A. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation / A. Cristancho, M. Lazar // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2011. – Vol. 12 (11). – P. 722–734.
48. Li, M.-D. The role of circadian clocks in metabolic disease / M.-D. Li, C.-M. Li, Z. Wang // Yale J. Biol. Med. – 2012. – Vol. 85 (3). – P. 387–401.

References

1. Halberg F. Chronobiology: methodological problems. *Acta medica Romana*, 1980, no. 18, pp. 399–440.
2. Semak I. V., Kul'chickij V. A. Physiological and biochemical mechanisms of circadian rhythm regulation. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Fiziologicheskie, biohimicheskie i molekularnyye osnovy funkcionirovaniya sistem* [Proceedings of the Belarusian State University. Series: Physiological, biochemical and molecular basis], Minsk, 2007, vol. 2, part 1, pp. 17–37. (in Russian).
3. Froy O., Chapnik N., Miskin R. Long-lived α MUPA transgenic mice exhibit pronounced circadian rhythms. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2006, vol. 291, pp. E1017–E1024. doi: 10.1152/ajpendo.00140.2006.
4. Turek F. W., Joshi C., Kohsaka A., Lin E., Ivanova G., McDearmon E., Laposky A., Losee-Olson S., Easton A., Jensen D. R., Ecker R. H., Takahashi J. S., Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 2005, vol. 308, pp. 1043–1045. doi: 10.1126/science.1108750.
5. Shimba Sh., Ishii N., Ohta Y., Ohno T., Watabe Y., Hayashi M., Wada T., Aoyagi T., Tezuka M. Brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, vol. 102 (34), pp. 12071–12076.
6. Zamorskij I. I., Myslickij V. F., Pishak V. P. Lateral core of brain septum: morphological and functional organization, role in the formation of chronorhythms. *Uspehi fiziologicheskikh nauk* [Progress in Physiology], 1998, vol. 29, no. 2, pp. 68–87. (in Russian).
7. Herzog E. D., Takahashi J. S., Block G. D. Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nature Neuroscience*, 1998, vol. 1, pp. 708–713.
8. Reppert S. M., Weaver D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 2002, vol. 418, pp. 935–941. doi: 10.1038/nature00965.
9. Lee, Choogon, Etchegaray, Jean-Pierre, Cagampang, Felino R. A., Loudon, Andrew S.I., Reppert, Steven M. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 2001, vol. 107, pp. 855–867. doi:10.1016/S0092-8674(01)00610-9.
10. Solt L. A., Wang Y., Banerjee S. Hughes T., Kojetin D. J., Lundasen T., Shin Y., Liu J., Cameron M. D., Noel R., Yoo S. H., Takahashi J. S., Butler A. A., Kamenecka T. M., Burris T. P. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature*, 2002, vol. 485 (7396), pp. 62–68. doi: 10.1038/nature11030.
11. Havinson V. H., Golubev A. G. Aging of the Pineal Gland. *Uspehi gerontologii* [Advances in Gerontology], 2002, vol. 9, pp. 67–72. (in Russian).
12. Arushanjan J. B. The hormone of the epiphysis melatonin is a new nootropic remedy? *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2005, vol. 68, no. 3, pp. 74–79. (in Russian).
13. Jouvet M. Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology*, 1999, vol. 21, suppl. 2, pp. 24S–27S.
14. Reiter R. J., Tan D. X., Manchester L. C., Pilar Terron M., Flores L. J., Koppisepi S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Advances in Medical Sciences*, 2007, pp. 211–228.
15. Bartness T. J., Song C. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *The Journal of Lipid Research*, 2007, vol. 48, pp. 1655–1672.
16. Maenura K., Taceda N. Circadian rhythms in CNS and peripheral clock disorders: role of the biological clock in cardiovascular diseases. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, vol. 103, pp. 134–138.

16. Alonso-Vale M. I., Andreotti S., Mukai P. Y. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *Journal of Pineal Research*, 2008, vol. 45, pp. 422–429.
17. Ando H., Yanagihara H., Hayashi Y. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*, 2005, vol. 146, pp. 5631–5636.
18. Wolden-Hanson T., Mitton D. R., McCants R. L., Yellon S. M., Wilkinson C. W., Matsumoto A. M., Rasmussen D. D. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology*, 2000, vol. 141, pp. 487–497. doi: 10.1210/endo.141.2.7311
19. Cardinali D. P., Cano P., Jiménez-Ortega V. Melatonin and the metabolic syndrome: physiopathologic and therapeutical implications. *Neuroendocrinology*, 2011, vol. 93, pp. 133–142.
20. Scheer F. A., Chan J. L., Fagnoli J. Day/night variations of high-molecular-weight adiponectin and lipocalin-2 in healthy men studied under fed and fasted conditions. *Diabetologia*, 2010, vol. 53, pp. 2401–2405.
21. Thundiyil J., Pavlovski D., Sobey Chr. G., Arumugam Th. V. Adiponectin receptor signaling in the brain. *British Journal of Pharmacology*, 2012, vol. 165, pp. 313–327. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01560.x.
22. Yang W. S., Lee W. J., Funahashi T., Tanaka S., Matsuzawa Y., Chao C. L., Chen C. L., Tai T. Y., Chuang L. M. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *Journal of Endocrinological Metabolism*, 2001, vol. 86, pp. 3815–3819.
23. Silva Nunes J., Oliveira A., Duarte L., Barradas M., Melao A., Brito M., Veiga L. Factors related with adiponectinemia in obese and normal-weight women and with its variation in weight loss programs. *Obesity Facts*, 2013, vol. 6, pp. 124–133. doi:10.1159/000350664.
24. Chung S., Park Y., Kim O., Kim J., Baik H., Hong Y., Kim S., Shin J., Jun J., Jo Y., Ahn S., Jo Y., Son B., Kim S. Melatonin attenuates dextran sodium sulfate induced colitis with sleep deprivation: possible mechanism by microarray analysis. *American Journal of Digestive Diseases*, 2014, vol. 59, pp. 1134–1141. doi: 10.1007/s10620-013-3013-2.
25. Diamond, F. B. Jr., Eichler D. Leptin and the adipocyte endocrine system. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2002, vol. 39, pp. 499–525. doi: 10.1080/10408360290795565.
26. Rodríguez A., Gómez-Ambrosi J., Catalán V., Gil M., Becerril S., Sáinz N., Silva C., Salvador J., Colina I., Frühbeck G. Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *International Journal of Obesity*, 2009, vol. 33, pp. 541–552. doi: 10.1038 / ijo.2009.40.
27. Tschöp M., Smiley D., Heiman M. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 2000, vol. 407, pp. 908–913. doi: 10.1038/35038090.
28. Panda, S., Antoch M., Miller B., Su A., Schook A., Straume M., Schultz P., Kay S., Takahashi J., Hogenesch J. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 2002, vol. 109, pp. 307–320.
29. Yan, J., Haifang W., Yuting L., Chunxuan S. Analysis of Gene Regulatory Networks in the Mammalian Circadian Rhythm. *PLoS Computational Biology*, 2005, vol. 4, no. 10, pp. e1000193. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000193.
30. Chernyshova, M. P. Time structure of biosystems and biological time. St. Petersburg, Napisano perom, 2014, 172 p. (in Russian).
31. Ukai-Tadenuma M., Yamada R., Xu H., Ripperger J., Liu A., Ueda H. Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function. *Cell*, 2011, vol. 144, pp. 268–281. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.019.
32. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*, 2012, vol. 74, pp. 246–260. doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.006.
33. Yang X., Lamia K., Evans R. Nuclear receptors, metabolism, and the circadian clock. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 2007, vol. 72, pp. 387–394. doi: 10.1101 / sqb.2007.72.058.
34. Liu C., Li S., Liu T., Borjigin J., Lin J. Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*, 2007, vol. 447, pp. 477–481. doi: 10.1038/nature05767.
35. Morgan L., Arendt J., Owens D., Folkard S., Hampton S., Deacon S., English J., Ribeiro D., Taylor K. Effects of the endogenous clock and sleep time on melatonin, insulin, glucose and lipid metabolism. *The Journal of Endocrinology*, 1998, vol. 157, pp. 443–451.
36. Baggs J., Price T., DiTacchio L., Panda S., Fitzgerald G., Hogenesch J. Network features of the mammalian circadian clock. *PLoS Biology*, 2009, vol. 7, pp. e52. doi: 10.1371/journal.pbio.1000052.
37. Pan X., Hussain M. Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *Journal of Lipid Research*, 2009, vol. 50, pp. 1800–1813. doi: 10.1194/jlr.M900085-JLR200.
38. Sukumaran S., Xue B., Jusko W., Dubois D., Almon R. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. *Physiological Genomics*, 2010, vol. 42A, no. 2, pp. 141–152. doi: 10.1152/physiolgenomics.00106.2010.
39. Shimba S., Ishii N., Ohta Y., Ohno T., Watabe Y., Hayashi M., Wada T., Aoyagi T., Tezuka M. Brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, vol. 102, no. 34, pp. 12071–12076. doi: 10.1073/pnas.0502383102.
40. Soták M., Polidarová L., Musilková J., Hock M., Sumová A., Pácha J. Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011, vol. 301, pp. G1066–G1074. doi: 10.1152/ajpgi.00256.2011.
41. Back P., Hamprecht B., Lynen F. Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: Diurnal changes of activity and influence of bile acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969, vol. 133, pp. 11–21.
42. Hamprecht B., Nüssler C., Lynen F. Rhythmic changes of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase activity in livers of fed and fasted rats. *FEBS Letters*, 1969, vol. 4, pp. 117–121.

44. Ho K. Circadian rhythm of cholesterol biosynthesis: Dietary regulation in the liver and small intestine of hamsters. *International Journal of Chronobiology*, 1979, vol. 6, pp. 39–50.
45. Kohsaka A., Laposky A., Ramsey K., Estrada C., Joshu C., Kobayashi Y., Turek F., Bass J. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell metabolism*, 2007, vol. 6, pp. 414–421. doi: 10.1016/j.cmet.2007.09.006.
46. He W., Barak Y., Hevener A., Olson P., Liao D., Le J., Nelson M., Ong E., Olefsky J., Evans R. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, vol. 100, no. 26, pp. 15712–15717. doi: 10.1073/pnas.2536828100.
47. Cristancho A., Lazar M. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2011, vol. 12, pp. 722–734. doi: 10.1038/nrm3198.
48. Li M.-D., Li C.-M., Wang Z. The role of circadian clocks in metabolic disease. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2012, vol. 85, no. 3, pp. 387–401.

Информация об авторах

Соболевская Ирина Сергеевна – канд. биол. наук, доцент. Витебский государственный медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: irinabelikovavgmu@yandex.ru.

Мяделец Олег Данилович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Витебский государственный медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь).

Пашинская Екатерина Сергеевна – канд. биол. наук, доцент. Витебский государственный медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь).

Для цитирования

Соболевская, И. С. Циркадные ритмы и метаболизм липидов в животных клетках. Часть I. Молекулярно-генетические аспекты биологических часов / И. С. Соболевская, О. Д. Мяделец, Е. С. Пашинская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 100–111.

Information about the authors

Sobolevskaya Irina Sergeevna – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Av., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: irinabelikovavgmu@yandex.ru.

Myadelets Oleg Danilovich – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department, Vitebsk State Medical University (27, Frunze Av., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus).

Pashinskaya Ekaterina Sergeevna – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Av., 210023 Vitebsk, Republic of Belarus).

For citation

Sobolevskaya I. S., Myadelets O. D., Pashinskaya E. S. Circadian rhythm and lipid metabolism in animal cells. Part I. Molecular and genetic aspects of the biological clock. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya byalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 100–111.

Н. И. Шутилова*Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Российская Федерация***МЕХАНИЗМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА**

Разработан механизм образования молекулярного кислорода в процессе фотосинтеза растений в результате окисления молекул воды в кислородвыделяющем комплексе (КВК) мембран хлоропластов. Проведенное нами всестороннее изучение КВК (от разработки инновационных методов его выделения и анализа свойств до установления его молекулярной структуры и механизма функционирования) показало, что он состоит из двух мономерных пигмент-белково-липидных комплексов фотосистемы 2 (ПБЛК ФС-2), ассоциированных по правилу зеркальной симметрии в димерную структуру в результате их гидрофобного взаимодействия. Установлено образование гидрофобного котла, стабилизирующего водоокисляющий центр (ВЦ) КВК в зоне ассоциации. Исследование закономерностей функционирования КВК позволило выдвинуть и обосновать концепцию двуханодной организации его ВЦ, формирующегося в результате встречного расположения двух функциональных катионов Mn, каждый из которых встроен в систему фотохимического переноса электронов и подвергается фотоокислению в структуре ПБЛК ФС-2 димерного КВК. Благодаря двуханодному действию ВЦ реализуется возможность синхронного окисления сразу двух молекул воды с образованием O₂. Предложен механизм, согласно которому стадии четырехквантового окисления функциональных катионов Mn сопровождаются их фотогидролизом, Ca²⁺-активируемым образованием дигидроксидного ассоциата [Mn⁴⁺(HO)⋯(OH)Mn⁴⁺] и реакцией диспропорционирования электронной плотности в данном ассоциате с выделением O₂ и восстановлением катионов марганца до Mn²⁺. Термодинамическая эффективность реакции обусловлена оптимальными условиями формирования цилиндрической симметрии σ-π-связи между атомами кислорода в образующихся молекулах O₂. Разработанный механизм подтвержден с помощью квантовохимического анализа и может найти применение в создании генераторов молекулярного кислорода на искусственных носителях.

Ключевые слова: кислородвыделяющий комплекс фотосистемы 2 мембран хлоропластов, механизм образования молекулярного кислорода.

N. I. Shutilova*Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation***MECHANISM OF PHOTOSYNTHETIC MOLECULAR OXYGEN FORMATION**

This paper considers the mechanism of how molecular oxygen is formed in the process of plant photosynthesis as a result of water molecule oxidation in the structure of the oxygen-evolving complex (OEC) in chloroplast membranes. We have implemented the entire complex of investigations of the OEC starting with the development of the innovation methods for its isolation and analysis of its properties and ending with the establishment of its molecular structure and mechanism of its functioning. We have shown for the first time that the OEC consists of two monomeric pigment-lipoprotein complexes of photosystem 2 (PLPC PS-2) that are associated by the mirror symmetry rule into a dimeric structure as a result of their hydrophobic interaction. It has been ascertained that this association zone is the place of the formation of the hydrophobic boiler that stabilizes the water-oxidizing center (WOC), which is located inside this boiler. The research into the regularities of the functioning of the OEC has enabled us to advance and substantiate the concept of the two-anode organization of its WOC that is formed as a result of the opposite facing of two functional Mn cations, each of which is built into the system of photochemical electron transfer and undergoes photo-oxidation in the structure of the PLPC PS-2 of the dimeric OEC. The two-anode action of the WOC implements the possibility of the synchronous oxidation of two water molecules at once with the formation of O₂. The mechanism has been proposed, according to which the stages of the four-quanta oxidation of the functional Mn cations are accompanied by their photo-hydrolysis, Ca²⁺-activated formation of a dihydroxide associate [Mn⁴⁺(OH)⋯(HO)Mn⁴⁺], and the reaction of electron density disproportionation in this associate with O₂ evolution and with reduction of manganese cations to Mn²⁺. The thermodynamic efficiency of the reaction is determined by the optimal conditions for the formation of a cylindrically symmetric σ-π-bond between the oxygen atoms in the formed O₂ molecules. The developed mechanism has been confirmed by the quantum-chemical analysis and can find use in the design of molecular oxygen generators based on artificial structures.

Keywords: oxygen-evolving complex of photosystem 2 of chloroplast membranes, mechanism of molecular oxygen formation.

Введение. Проблема расшифровки механизма образования молекулярного кислорода атмосферы Земли, которое протекает при фотосинтезе растений, находится в центре внимания ученых последние 50 лет [1–20]. основополагающий вклад в установление водного происхождения O_2 принадлежит российским исследователям, которые не только первыми это показали, но и широко изучили данную проблему [7]. Так, с использованием методов прецизионного анализа изотопного состава определены параметры изотопного состава атмосферного кислорода, константы изотопного обмена кислорода в растениях и факторы его сдвига, что окончательно исключило возможность происхождения O_2 из какого-либо иного кислородсодержащего соединения [7]. Далее было установлено, что молекулярный кислород образуется в структуре природного пигмент-белково-липидного комплекса фотосистемы 2 (ПБЛК ФС-2) тилакоидных мембран хлоропластов, в котором осуществляется поглощение энергии света, используемой затем для процесса окисления воды и выделения кислорода [1–5, 7–10]. В соответствии с правилами биохимической терминологии данный комплекс обозначен нами как кислородвыделяющий комплекс (КВК) по конечному продукту его функционирования [1–4]. При этом необходимо отметить, что в традиционной литературе термином КВК обозначался каталитический центр окисления воды и выделения кислорода [5]. С точки зрения биохимической терминологии это неправильно, так как такой каталитический центр как отдельная структура никогда не был выделен и не может функционировать отдельно, независимо от других пигмент-белковых субъединиц, входящих в состав комплекса ФС-2. Возникновение сложной надмолекулярной структуры природного комплекса КВК стало определяющим событием биологической эволюции на нашей планете.

Показано, что функциональная активность изолированного КВК сохраняется и в системе *in vitro* [1–4, 8–10]. Это обусловлено особой устойчивостью структуры его фотохимического реакционного центра (РЦ), где реализуется эффективная трансформация энергии поглощенных квантов света в электрохимическую энергию разделенных зарядов и происходит трансмембранный перенос электронов из системы окисления воды на первичные акцепторы. Постоянное протекание данных реакционных процессов в структуре КВК осуществляется благодаря обратимым изменениям состояния Mn-белкового водоокисляющего центра (ВЦ), в котором в результате фотоокисления функциональных катионов марганца формируется окислительный потенциал ВЦ и происходит окисление молекул воды с образованием O_2 . При этом имеет место регенерация исходных катионов Mn, что является условием возобновления новых циклов фотохимических реакций в структуре КВК. Благодаря данным процессам осуществляется непрерывный трансмембранный перенос электронов – от молекул воды и функциональных катионов марганца ВЦ, способных накапливать положительные заряды, до молекул пластохинона Q_B , являющегося терминальным акцептором электронов. Далее от восстановленного пластохинона Q_B электроны направляются в латеральную систему транспорта электронов в мембране хлоропласта к ПБЛК ФС-1. В результате этих процессов образуются такие важнейшие первичные продукты фотосинтеза, как O_2 , АТФ и восстановленный НАДФ, которые в свою очередь обуславливают протекание важнейших биохимических реакций в клетках растений. Таким образом, задача расшифровки механизма фотосинтетического образования O_2 имеет всеобъемлющее значение.

Теоретические аспекты механизма фотосинтетического образования O_2 . В работах ведущих российских и зарубежных ученых заложены базовые теоретические концепции реакционного процесса окисления воды при фотосинтезе растений. Сложность протекания данной реакции определялась биологической спецификой организации мембран хлоропластов и особым устройством ВЦ и его системы образования O_2 [1–20]. Так, изучение окисленных форм хлорофилла показало [7], что проблема не в том, чтобы перенести электрон от воды к молекуле окисленного хлорофилла (с точки зрения термодинамики это выгодно), а в том, что сложно реализовать процесс образования связи между атомами кислорода окисляемых молекул воды [11]. Так, отрыв электронов от молекулы воды в ходе фотохимических реакций приводит к образованию промежуточных высокоактивных гидроксильных радикалов, вызывающих неконтролируемые цепные реакции. Показано, что в биологической системе такой путь реакции неприемлем и необходима особая конструкция ВЦ, закрепляющего расположение окисляемых молекул воды в непосредственной близости друг от друга, что позволяет исключить образование промежуточных продуктов

радикальнай прыроды [11]. Рассмотрена также возможность учета синхронных многоэлектронных процессов, имеющих место в характерных окислительно-восстановительных реакциях в химии и биологии [12]. Все изложенные выше теоретические позиции предполагали необходимость особого устройства ВЦ, не допускающего образования радикальных соединений. При этом это устройство должно отвечать задаче стабилизации окислительных эквивалентов и их накоплению для формирования достаточного окислительного потенциала в системе окисления воды и протекания последующих реакций.

При фотосинтетическом окислении воды и образовании молекулярного кислорода происходит отрыв четырех электронов от двух молекул воды. Вследствие этого, согласно второму закону фотохимии, осуществление реакции окисления воды с образованием O_2 в процессе фотосинтеза растений требует затраты энергии четырех квантов солнечного света: $2H_2O + 4h\nu \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$. Это соответствует протеканию четырех фотохимических реакций, в ходе которых в структуре КВК осуществляется трансмембранный перенос электронов и возникают промежуточные состояния ФС-2 ($S_{0 \rightarrow 4}$), связанные с формированием электрохимического потенциала в мембранах хлоропластов [13]. При этом происходит накопление окислительных эквивалентов в системе окисления воды внутри тилакоидной мембраны и образование восстановленного пластохинона Q_B с наружной стороны мембраны. Образование молекулярного кислорода реализуется при достижении состояния S_4 . Исследование парамагнитных свойств катионов марганца в S_i -состояниях показало участие в этих процессах катионов Mn^{2+} , Mn^{3+} и Mn^{4+} , способных отдавать электроны и аккумулировать положительные заряды в ходе фотохимических реакций, вследствие чего формируется потенциал, достаточный для окисления молекул воды [7, 11–15].

Еще одним направлением исследований стало изучение Mn-зависимых спектров поглощения и дифракции рентгеновских лучей (XAS- и EXAFS-анализы [16, 17]). В результате выявлено устойчивое расположение четырех катионов марганца в ФС-2 хлоропластов [16–18]. Расстояние между двумя катионами Mn составляло 2,7 Å, в то время как два других катиона отстояли друг от друга на расстоянии 3,3 Å. Это позволяло заключить, что эти четыре катиона Mn связаны посредством кислородных мостиков и образуют μ -окси-бридж-структуру в форме либо призмы, либо бабочки, либо куба и т. д. [16–18]. Также установлено присутствие в данной структуре катиона Ca^{2+} [15, 17]. С учетом полученных данных возникло предположение об участии Mn_4CaO_5 -кластера в реакции окисления воды. В качестве промежуточного продукта предполагалось образование связанного радикала кислорода [18]. Однако, как отмечалось выше, образование радикалов неприемлемо для биологической системы [11]. Согласно другой версии, в ходе реакции окисления воды имеет место встраивание молекул воды в кластер при их нуклеофильной атаке с образованием промежуточного соединения, содержащего перекисную группу, которая далее окисляется катионом Mn^{5+} [19]. Данная точка зрения также не могла быть принята, так как допускала возможность образования бирадикального соединения, содержащего перекисную группу, способную разрушать окружающие биомолекулы. Образования Mn^{5+} также не установлено.

Несостоятельность концепции о возможном участии Mn_5CaO_5 -кластера в реакции окисления воды подтверждалась данными прецизионного изотопного анализа, которые свидетельствовали о тождестве изотопного состава кислорода воды и кислорода фотосинтеза [7]. Последнее указывало на непосредственный отрыв электронов от молекул воды в процессе фотосинтетического образования O_2 , минуя стадию образования промежуточных полимолекулярных комплексов, что неизбежно приводило бы к изотопному сдвигу состава кислорода. К такому же выводу пришли исследователи, опиравшиеся на результаты измерения выхода кислорода (^{18}O) на вспышку света в микросекундном диапазоне времени, исключая диффузионные процессы [20]. Полученные ими данные также указывали на непосредственное окисление молекул воды, а не промежуточных Mn-содержащих кластеров. Дополнительные аргументы не в пользу участия Mn_4CaO_5 -кластера приведены по результатам исследования, проведенного на искусственных комплексах металлоорганических соединений, содержащих μ -окси-группы [20]. В ходе этих экспериментов выявлено, что наблюдаемая скорость изотопного обмена атомов кислорода в данных структурах на пять порядков ниже, чем в природной водоокисляющей системе хлоропластов растений.

Можно предположить, что возникновение Mn_4CaO_5 -кластера в ФС-2 хлоропластов обусловлено другими причинами. Так, показано, что образование данной структуры может происходить в результате сопряженных фотопроцессов (например, при фотодинамическом поглощении кислорода, обеспечивающем утилизацию активных форм кислорода при трансмембранном переносе электронов в ФС-2) [2]. Возможно также, что образование кристаллического кластера катионов марганца является результатом глубокого замораживания образцов ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) при проведении рентгеноструктурного анализа. Предположение, что кластерная структура образуется как артефакт в результате утилизации активных форм кислорода, позволяет заключить, что со структурой Mn_4CaO_5 -кластера вообще не следует связывать механизм образования O_2 . Это обусловлено тем, что в составе данной структуры катионы марганца образуют прочные ковалентные связи с атомами кислорода, а значит, в функциональном отношении μ -окси-бридж-структура Mn_4CaO_5 -кластера представляет собой мертвую материю, в которой катионы марганца не могут участвовать в окислительно-восстановительных реакциях КВК. Очевидно, что только исследование «живой структуры» изолированного комплекса ФС-2, т. е. сохраняющего свою функциональную активность *in vitro*, может способствовать установлению истинного механизма реакции фотосинтетического окисления воды и выделения кислорода.

Молекулярная организация КВК. Для понимания ключевых принципов организации КВК, обуславливающих протекание реакции окисления воды и образования O_2 , осуществлено выделение данного комплекса в функционально активном состоянии из мембран хлоропластов и проведено его всестороннее изучение [8–10, 21–30]. По результатам длительных и трудоемких исследований впервые была осуществлена инновационная разработка методов выделения и идентификации трех типов различающихся по составу и функциональной активности субмембранных комплексов ПБЛК – ПБЛК ФС-1, ПБЛК ФС-2 и вспомогательного светособирающего комплекса ВС-ПБЛК [8, 9]. Изучен их биохимический состав, спектральные и фотохимические характеристики, исследованы их свойства в окислительно-восстановительных реакциях и оценена функциональная роль входящих в их состав соединений [21–30]. Использование данных комплексов позволило широко развернуть изучение молекулярных процессов, обуславливающих функционирование фотосинтетического аппарата растений [1–4, 8–10, 21–38]. Важным достижением стало получение препаратов ПБЛК ФС-2, сохраняющего высокую активность фотохимического РЦ, что свидетельствовало об устойчивости структуры его РЦ даже в условиях солибилизирующего действия детергентов [25, 29, 30]. Показано, что это обуславливалось устойчивой взаимосвязью первичных переносчиков электрона со структурообразующими D1- и D2-белками РЦ ФС-2 [1–4]. Получение препаратов изолированного ПБЛК ФС-2 позволило впервые провести широкое изучение первичных фотореакций, протекающих в структуре РЦ ФС-2, и установить природу первичных переносчиков электрона в ходе фотохимического разделения зарядов [28–30] (по результатам работы по изучению фотохимических свойств изолированных ПБЛК и процессов функционирования РЦ ФС-2 ряд ученых был удостоен Государственной премии).

Следующим этапом исследования стало выявление факторов, обуславливающих сохранность функции выделения молекулярного кислорода в структуре изолированного комплекса ФС-2. В результате тщательного анализа условий, контролирующего процесс солибилизации, выявлено солибилизирующее воздействие детергентов преимущественно на гидрофобные связи, стабилизирующие надмолекулярную структуру природного КВК. Их разрушение приводило к необратимому подавлению кислородвыделяющей активности изолированного комплекса ФС-2 [8, 9, 21–23, 25, 26]. Подбор факторов, обуславливающих стабилизацию КВК, позволил получить препараты изолированного комплекса ФС-2, сохраняющего высокую активность в процессе фотосинтетического окисления воды и выделения молекулярного кислорода [10, 40–42]. При этом скорость выделения O_2 в препаратах изолированного КВК достигала высоких значений: 270–300 $\mu\text{mol } O_2/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$ (рис. 1).

Установлено, что изолированный КВК ФС-2, так же как и ПБЛК ФС-2, содержит основные структурообразующие белки РЦ (гомологичные белки D1 и D2, цитохром b-559), белки светособирающей антенны (CP43 и CP47) и водорастворимые белки молекулярной массы 33, 23 и 16 кДа, активирующие процесс образования O_2 [1–4, 10, 39]. Одновременно было отмечено, что молеку-

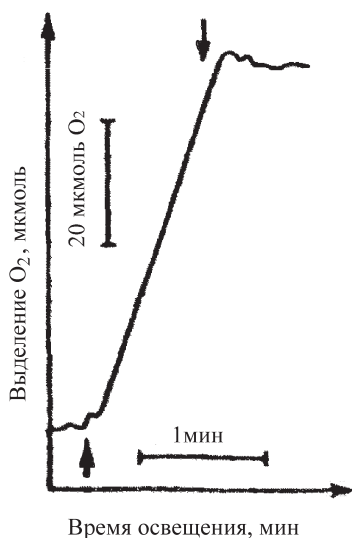


Рис. 1. Скорость выделения O_2 в изолированном КВК. Стрелками указано включение и выключение света ([40])

Fig. 1. Rate of O_2 evolution in the isolated OEC. The arrows indicate the switching-on and switching-off of light ([40])

лярная масса изолированного КВК вдвое превосходит молекулярную массу выделяемого в более жестких условиях ПБЛК ФС-2. С учетом полученных данных сделано два вывода: первый – структура КВК представляет собой димер, состоящий из двух ассоциированных мономерных ПБЛК ФС-2, второй – структура данного димерного ассоциата стабилизируется на основе гидрофобного взаимодействия между мономерными ПБЛК ФС-2. Разрушение этого гидрофобного взаимодействия при действии детергентов приводит к подавлению активности ВЦ КВК.

Сопоставление результатов проведенных исследований показало, что в структуре кислородвыделяющего природного комплекса ФС-2 имеются две важные области его молекулярной организации, определяющие его роль в мембране хлоропласта в процессе фотосинтеза. Первая область – это уже отмеченная выше стабильная структура РЦ ФС-2, благодаря которой изолированный комплекс сохраняет высокую активность в первичных реакциях фотохимического разделения зарядов и переноса электронов. Вторая область – это лабильная структура системы окисления воды, которая разрушается при воздействии детергентов на гидрофобные связи, обуславливающие ассоциацию мономерных ПБЛК ФС-2 и образование димерного комплекса. Следовательно, логично предположить, что область гидрофобного взаимодействия мономерных комплексов является местом локализации их общего ВЦ. Его инактивация, наблюдающаяся вследствие диссоциации природного

димерного КВК на мономерные комплексы ПБЛК ФС-2 и разрушения зоны их гидрофобного взаимодействия, также позволяла предположить возможность и необходимость кооперации двух ПБЛК ФС-2 в структуре димерного КВК.

Для подтверждения данного предположения нами выполнены специальные исследования изолированного КВК в условиях, подавляющих функцию выделения им кислорода [1–4, 10, 41, 42]. С использованием метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии показано, что в результате теплового воздействия (33–35 °С) наблюдается структурный переход вследствие диссоциации КВК на два мономерных комплекса ПБЛК ФС-2. При этом диссоциация сопровождалась необратимой потерей функции выделения O_2 и скачкообразным выходом катионов марганца из структуры КВК в реакционную среду (рис. 2). Полученные данные, свидетельствовавшие о диссоциации КВК на мономерные ПБЛК ФС-2, подтверждены методом электронно-микроскопического анализа [42]. Аналогичные результаты получены также при действии детергентов и длительном режиме инкубации [43]. Это позволило подтвердить вывод, что сохранность функциональной активности ВЦ димерного КВК обусловлена окружением его гидрофобными молекулами в зоне взаимодействия ПБЛК ФС-2, образующими гидрофобный котел [1–4, 10, 41, 42]. Наблюдающийся в результате теплового воздействия выход катионов марганца, по-видимому, обусловлен плавлением данного котла, вследствие чего нарушается стабилизирующее воздействие гидрофобного котла на Mn-белковую структуру ВЦ и подавляется процесс окисления воды с образованием O_2 . Важно подчеркнуть, что данный гидрофобный котел как фактор стабилизации фиксирует позицию функциональных катионов Mn и их взаимосвязь с первичными переносчиками электронов в процессе фотохимических реакций димерного КВК. Таким образом, структура гидрофобного котла способствует накоплению и стабилизации окислительных эквивалентов ВЦ.

На основании полученных экспериментальных данных разработана новая концепция молекулярной организации КВК мембран хлоропластов. Так, было обосновано, что высокая скорость фотохимических реакций, протекающих в структуре КВК, обусловлена близкой позицией переносчиков электрона, локализованных в структурных белках РЦ димерного КВК. Ранее показано, что гидрофобные α -спиральный участки данных белков пронизывают мембрану поперек

и способствуют разделению зарядов по обе стороны мембраны [4, 5]. При этом высокая эффективность разделения зарядов в цепи переносчиков также обуславливается локализацией электронов на молекуле пластохинона Q_B с наружной стороны мембраны, а с другой стороны – возможностью аккумуляции электронных вакансий на функциональных катионах марганца ВЦ внутри мембраны. В составе димерного КВК таких цепей две, и обе они локализуются в белке D1 в структурах ПБЛК ФС-2 димерного КВК. При этом обе цепи электронных переносчиков достигают ВЦ, расположенного, согласно полученным нами данным, в зоне гидрофобного взаимодействия мономерных ПБЛК ФС-2. Об этом свидетельствуют и результаты экспериментов по термоиндуцированному выходу катионов марганца в ходе диссоциации димерного КВК в области умеренного теплового воздействия, не затрагивающего мономерные ПБЛК [41, 42]. Соответствующее выстраивание цепей переносчиков электрона реализуется при условии близкого и зеркально-симметричного расположения белков D1 по отношению друг к другу в составе димерного КВК. Вследствие этого задается зеркально-симметричное расположение и всех остальных белковых субъединиц комплекса: гомологичного белка D2 РЦ, образующего с белком D1 гидрофобный каркас на основе α -спиральных участков, и связанных с ними светособирающих хлорофилл-белков CP47 и CP43, а также цитохромов b-559. При этом расположение электростатически связанных белков молекулярной массы 33, 23 и 16 кДа, экспонируемых во внутрь тилакоидной мембраны, должно соответствовать стабилизации ВЦ и условиям активации функции выделения O_2 .

На основании проведенного анализа нами впервые разработана модель молекулярной организации КВК [1–4, 10, 41, 42], согласно которой обоснована димерная структура КВК, состоящего из двух ассоциированных и зеркально расположенных мономерных ПБЛК ФС-2 (рис. 3). Данная модель базировалась на результатах биохимического и функционального анализа и отражала топографическое расположение основных белков димерного КВК. На рис. 3 показано зеркально-симметричное расположение белков D1 в структуре КВК и связанных с ними остальных белков КВК, инкорпорированных в мембрану хлоропласта. При этом показано, что в области гидрофобной ассоциации ПБЛК ФС-2 формируется гидрофобный котел ВЦ, включающий лигандированные катионы марганца системы окисления воды. Предложенная нами концепция молекулярной структуры КВК была опубликована в 1992 г. [41] и получила дальнейшее развитие в исследованиях 1995–2000 гг. [1–4, 10]. В последующие годы предложенная нами топография белков димерного КВК получила подтверждение в зарубежных исследованиях, выполненных на основе метода рентгенографического анализа [50, 51]. В настоящее время димерная структура КВК получила широкое признание, а топография белков является общепринятой.

Следует отметить, что важным концептуальным отличием нашей модели и модели, приведенной в работе [51], является точка зрения на организацию ВЦ. Авторы работы [51] считают, что в структуре каждого мономерного ПБЛК ФС-2 имеется свой ВЦ и они расположены независимо друг от друга. При этом в работе [51] позиция полипептидных цепей структурных белков димерного КВК приведена на основе компьютерного метода их программируемого

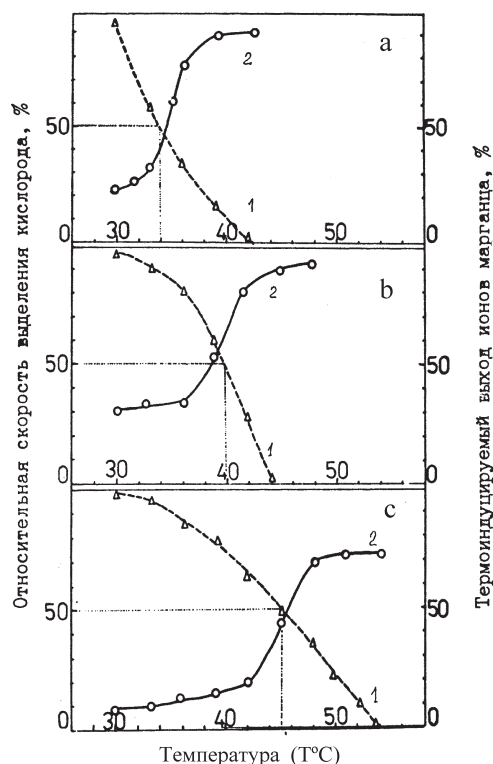


Рис. 2. Ингибирующее действие 5-минутной тепловой обработки на функцию выделения кислорода (1) и термоиндуцируемый выход эндогенного Mn в реакционную среду (2) у субхлоропластных препаратов: а – изолированный кислородвыделяющий комплекс; б – тилакоиды гран хлоропластов; в – субхлоропластные фрагменты ФС-2 (см. работы [41, 42])

Fig. 2. Inhibitory effect of 5-min thermal treatment on the oxygen-evolving function (1) and thermally induced release of endogenous Mn in the reaction medium (2) in subchloroplast preparations: а – the isolated oxygen-evolving complex; б – thylakoids of chloroplast grana; в – subchloroplast fragments of PS-2

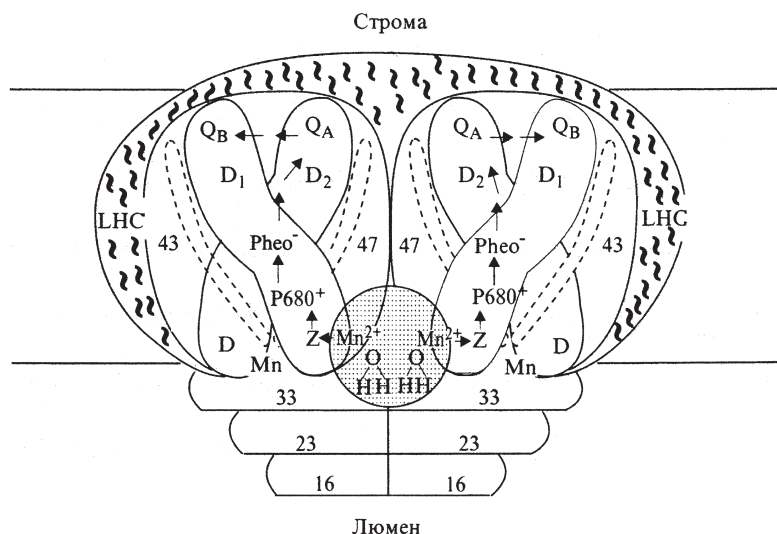


Рис. 3. Надмолекулярная структура КВК хлоропластов, представляющая собой димерный ассоциат мономерных ПБЛК ФС-2, расположенных по правилу зеркальной симметрии. Топография белков D1, D2, CP47, CP43 и цитохрома b-559 (обозначен пунктиром) даны в соответствии с работами [1–4, 10]. В центре показано формирование гидрофобного котла водоокисляющего центра, в котором расположены Z-лигандированные функциональные катионы Mn, обуславливающие образование двуханодного реактора системы окисления воды КВК. Водорастворимые белки молекулярной массы 33, 23 и 16 кДа экранируют ВЦ со стороны люмена (пояснения в тексте)

Fig. 3. Supramolecular structure of the chloroplast OEC that is a dimeric associate of the monomeric PLPCs PS-2, which are located by the mirror symmetry rule. The topography of proteins D1, D2, CP47, CP43, and cytochrome b-559 (the cytochrome is marked with the dotted line) are given according to the works [1–4, 10]. The center of the figure shows the formation of the hydrophobic boiler of the water-oxidizing center that is the place of the location of Z-liganded functional Mn cations that determine the formation of the two-anode reactor of the water-oxidation system of the OEC. Water-soluble proteins with molecular weights of 33, 23, and 16 kDa screen the water-oxidizing center from the side of the lumen (see the explanations in the text)

встраивания в карту электронной плотности и их окрашивания (methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models) [52]. Однако необходимо учитывать, что метод встраивания белков в карту электронной плотности является приближенным и содержит ошибки. Это подтверждается и различиями в расположении полипептидных цепей белков D1 [53, 54]. Кроме того, этот метод основывается на данных рентгенографического снимка поверхности димерного КВК при проведении анализа на кристаллах, замороженных до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ [51]. В этих условиях образующиеся кристаллы льда существенно влияют на размеры КВК, а кроме того, искажаются конформационные состояния молекул белков и изменяется расположение функциональных групп, от которых зависит активность каталитических центров и межатомные взаимодействия в структуре комплекса. При этом необходимо учитывать сложную надмолекулярную структуру КВК, в состав которого входит два мономерных ПБЛК ФС-2 и содержится 18 основных белков, 20 минорных белков и более сотни макромолекул пигментов и липидов. Рентгенографический анализ структуры отдельных белков в такой сложной системе не представляется возможным. Безусловно, обособленная позиция структурных белков РЦ и, соответственно, позиция ВЦ в представленной модели [51] не согласуются с характеристиками функциональной активности КВК, которые получены нами на основе исследования «живой» структуры КВК и свидетельствуют о локализации ВЦ в зоне гидрофобного контакта мономерных ПБЛК ФС-2.

Двуханодная организация водоокисляющего центра. Таким образом, большое преимущество исследований, проведенных нами, состояло в том, что были изучены и проанализированы закономерности функционирования изолированного КВК, сохраняющего свою природную способность к выделению кислорода. Так как основной задачей являлась расшифровка механизма ключевого реакционного процесса образования O_2 в структуре КВК, первостепенная роль отводилась изучению его ВЦ. Как было показано, быстрые фотохимические реакции и процессы

первичного транспорта электронов в структуре КВК, обуславливающие генерацию окислительного потенциала ВЦ, протекают благодаря сближенному расположению всех переносчиков электрона и формированию непрерывной цепи переноса электронов от молекул воды до молекул пластохинона Q_B . При этом в ходе фотохимического процесса разделения зарядов конечными донорами электронов являются катионы марганца системы окисления воды. В результате поглощения кванта света в структуре ПБЛК ФС-2 происходит фотохимический перенос электронов, в котором первичным донором электрона становится хлорофилл реакционного центра $P680^*$, высвобождающий электрон после поглощения кванта света (рис. 3). Электрон далее переносится на феофитин (Фео), затем на пластохинон Q_A и на пластохинон Q_B , локализованный в структуре гомологичного белка D2 [4]. При этом установлено, что электронная вакансия на $P680^+$ заполняется от аминокислотного остатка Туг-161, выполняющего функцию первичного Z-донора электронов и расположенного вблизи $P680$ [55, 56]. Так, установлено, что функция первичного Z-донора осуществляется молекулой Туг-161 благодаря ее лабильной π -электронной системе, способной к обратимым реакциям окисления–восстановления [3, 4, 10, 55, 56]. Логично предположить, что для осуществления быстрых циклических процессов окисления $P680$ и его восстановления от Z-донора необходимо синхронное донирование электрона на Z-донор от терминального источника электронов. Таким терминальным донором мог быть только функциональный катион марганца системы окисления воды, способный аккумулировать положительные заряды [1–4, 10]. Это предопределяет необходимость его близкой позиции по отношению к Z-донору (рис. 3). Такая позиция может фиксироваться координационной связью между функциональным катионом марганца и Туг-161, гидроксильная группа которого является оптимально подходящим лигандом, способным вступать в координационное взаимодействие только с одним катионом марганца. Координационное взаимодействие между функциональным катионом марганца и Туг-161 подтверждено в последующей работе, где рассматривался механизм сопряженного переноса электрона от Mn^{2+} на молекулу окисленного Туг-161 и отвода протонов от его гидроксильной группы на аминокислотный остаток His-190 [19]. В этой связи His-190, по-видимому, играет роль кислотно-основного катализатора, который активирует перенос электронов в первичной электронодонорной цепи КВК.

Для дальнейшего анализа важно еще раз подчеркнуть, что тирозин образует координационную связь только с одним катионом марганца. Следовательно, из четырех катионов марганца, входящих в структуру природного мономерного ПБЛК ФС-2, только Z-лигандированный катион является функциональным и может участвовать в процессе окисления молекул воды. Что касается остальных трех катионов марганца в структуре ПБЛК ФС-2, то, согласно данным [4, 5], они связаны с аминокислотными остатками подвижной гидрофильной петли белка D1 ПБЛК ФС-2, легко экстрагируются и, по-видимому, не участвуют в процессе переноса электронов в ходе быстрых фотохимических реакций комплекса. Тем не менее, они способны связывать активные формы кислорода с образованием кластера [2, 10].

Анализ первичных фотореакций в структуре КВК показал (рис. 4), что в ходе четырехквантового цикла фотохимического процесса разделения зарядов в каждом ПБЛК ФС-2 возможен перенос только двух электронов, что соответствует образованию одной молекулы восстановленного пластохинона Q_B и одного Z-лигандированного катиона Mn^{4+} . В результате имеет место поочередное функционирование ПБЛК ФС-2, так как во время этих процессов в одном из ПБЛК ФС-2 происходит медленный диффузионный обмен восстановленного пластохинона на окисленный, при котором данный ПБЛК ФС-2 находится в закрытом состоянии. За этот период времени фотохимические реакции протекают во втором ПБЛК ФС-2 димерного КВК, что обуславливает возможность поглощения четырех квантов света, которые необходимы для окисления воды. Таким образом, в ходе четырех фотохимических реакций переноса электронов в димерном КВК имеет место образование двух Z-лигандированных катионов Mn^{4+} . Показано, что в этом случае реализуется молекулярная организация ВЦ по типу двуханодного реактора, в котором данные функциональные катионы марганца противостоят друг другу и стабилизированы в структуре гидрофобного котла ВЦ (рис. 4). Вследствие этого процесса в структуре ВЦ формируется окислительный потенциал, достаточный для протекания реакции окисления воды. Это создает условия

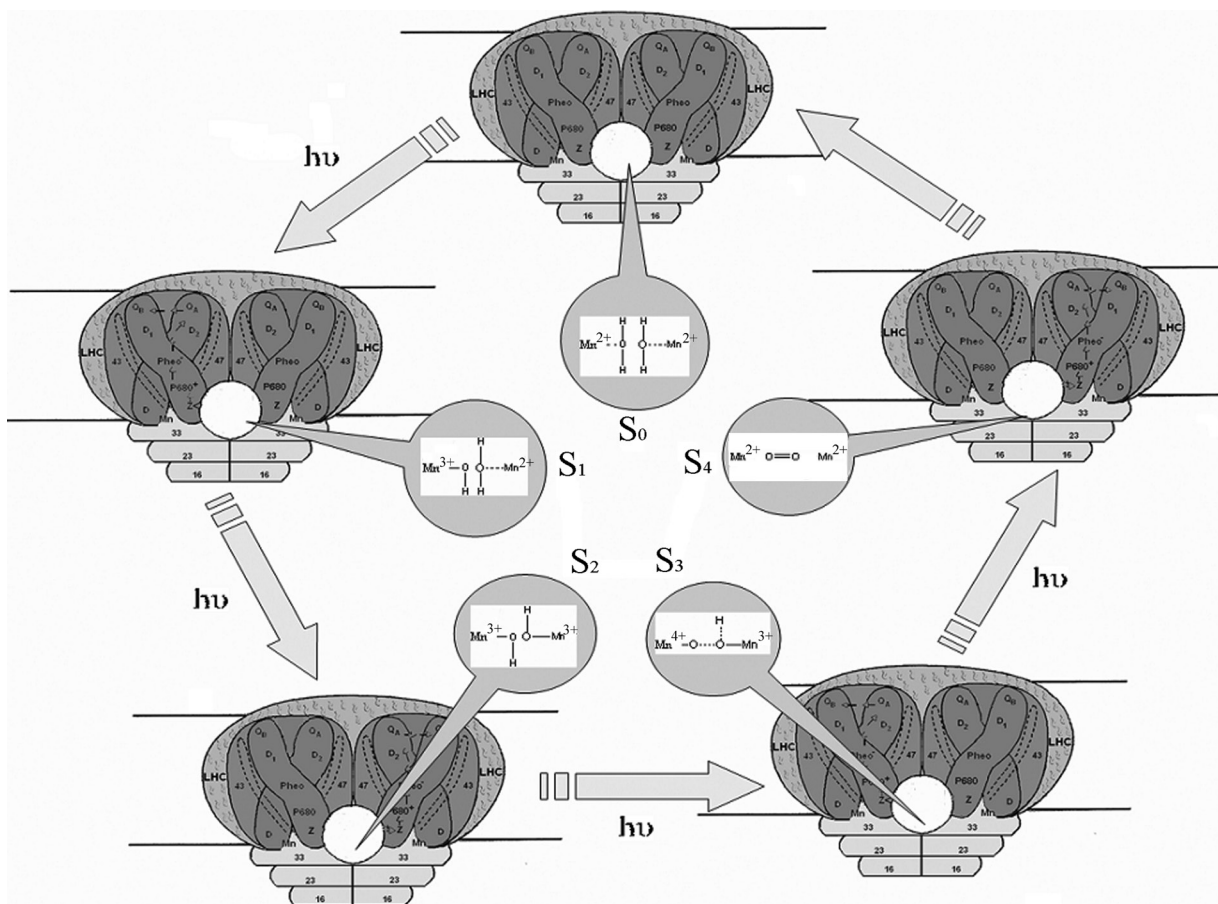


Рис. 4. Схема механизма синхронного четырехэлектронного окисления молекул воды и образования O_2 в структуре димерного КВК мембран хлоропластов в ходе четырехквантового цикла окисления функциональных катионов Mn водоокисляющего центра. Фотоиндуцируемый перенос электронов в мономерных ПБЛК ФС-2 обозначен стрелками (пояснения в тексте)

Fig. 4. Scheme of the mechanism of synchronous four-electron water molecule oxidation and O_2 formation in the structure of the dimeric OEC of chloroplast membranes in the course of the four-quanta cycle of oxidation of the functional Mn cations of the water-oxidizing center. The photo-induced transfer of electrons in the monomeric PLPCs PS-2 is designated with arrows (see the explanations in the text)

для процесса синхронного попарного окисления сразу двух молекул воды с образованием молекулы O_2 [1–4, 10]. Возможность формирования такого двуханодного реактора является большим преимуществом структуры димерного КВК по сравнению со структурой мономерного ПБЛК ФС-2.

Механизм фотосинтетического окисления воды и образования O_2 . Концепция формирования двуханодного реактора в структуре КВК обусловила разработку механизма реакционного процесса фотосинтетического окисления воды и образования молекулярного кислорода. Показано, что в соответствии с теорией молекулярных орбиталей образование σ - π -связи между двумя атомами кислорода окисляемых молекул воды детерминировано их взаимодействием «лоб в лоб», так как σ -связь обладает осью цилиндрической симметрии и может возникнуть только при условии синхронного и равнодействующего оттока электронов от окисляемых гидроксильных анионов воды на равноценные окислители в противоположные стороны по линии координаты реакции [1–4]. Это может реализоваться при условии одновременного окисления сразу двух молекул воды, если их гидроксильные анионы пространственно зафиксированы, близко расположены и ориентированы относительно друг друга. В данной реакции для образования молекулярного кислорода необходимы достаточный и тождественный окислительный потенциал молекул окислителей, на которые происходит отток электронов от молекул воды. Другим условием образования O_2 в составе ВЦ является формирование в нем такого двуханодного реактора, который

наряду с перечисленными свойствами характеризуется также противоположно направленным действием равных по силе окислителей. Всем этим требованиям отвечает двуханодная структура ВЦ в димерном КВК, формирование которой в молекулярной системе гидрофобного котла обуславливает эффективное протекание процесса фотосинтетического окисления воды и образования O_2 [1–4, 10].

Разработанный механизм синхронного четырехэлектронного окисления воды и образования молекулярного кислорода детально представлен на рис. 4. Показано, что молекулярные фотохимические процессы, обуславливающие генерацию окислительного потенциала в структуре ВЦ, протекают последовательно в левом и правом ПБЛК ФС-2. В результате двух первых стадий реакционного процесса образуются окисленные катионы Mn^{3+} , которые вступают в гидролитическое взаимодействие с водой, сопровождающееся фотоиндуцированным выходом протонов и включением гидроксильных анионов воды в координационную сферу функциональных катионов марганца (рис. 4). При этом происходит образование двух противостоящих гидроксидов $[Mn^{3+}(OH^-)\cdots(OH^-)Mn^{3+}]$, которое возникает после поглощения первых двух квантов света в состоянии S_2 . Таким образом, в данном процессе фотогидролиза катионы марганца становятся носителями гидроксильных анионов молекул воды. Это способствует стабилизации окисленных катионов марганца и обуславливает пространственное закрепление и необходимую ориентацию гидроксильных анионов молекул воды относительно друг друга. Кроме того, для осуществления реакции образования O_2 необходимо достаточно близкое расположение двух гидроксильных анионов на расстоянии ван-дер-ваальсового взаимодействия [1–4, 10]. Показано, что в этом процессе активную роль играют катионы Ca^{2+} , в отсутствие которых образования кислорода в изолированном комплексе не происходит [1–4, 10, 39, 40]. При этом экспериментально установлено, что катионы Ca^{2+} действуют при оптимальной концентрации (40–50 мМ), а в области низких каталитических концентраций их действия отмечено не было [40]. Полученные результаты позволили сделать вывод об усилении гидрофобного взаимодействия молекул в зоне ассоциации мономерных ПБЛК ФС-2 при действия высоких концентраций катионов Ca^{2+} [40]. Их структурирующее воздействие, способствующее сближению функциональных катионов Mn в структуре гидрофобного котла, обуславливает активацию ВЦ и может использоваться для регулирования фотосинтетической активности КВК.

После поглощения третьего и четвертого квантов света в левом и правом ПБЛК ФС-2 происходит дальнейшее фотохимическое окисление двух катионов Mn^{3+} (рис. 4). В результате возникает дигидроксидный ассоциат $[Mn^{4+}(OH)\cdots(OH)Mn^{4+}]$, который является короткоживущим, так как в нем формируется сильное электрическое поле двуханодного реактора системы окисления воды. Высокий окислительный потенциал катионов Mn^{4+} в структуре данного ассоциата и противоположно направленный вектор смещения электронной плотности между атомами кислорода и марганца в левом и правом ПБЛК ФС-2 детерминируют эффективное протекание реакции диспропорционирования электронной плотности в данной системе (состояние S_4) (рис. 4). При этом отток пары электронов имеет противоположную направленность: от гидроксильного аниона воды на катион Mn^{4+} левого ПБЛК ФС-2 и аналогичный отток двух электронов на катион Mn^{4+} правого ПБЛК ФС-2. Процесс сопровождается синхронным схлопыванием электронных орбиталей атомов кислорода гидроксильных анионов молекул воды и образованием связи между ними. При этом происходит восстановление катионов Mn^{4+} в структуре данного ассоциата до Mn^{2+} и выход протонов в реакционную среду. Данные протоны могут отводиться посредством канала, формирующегося в области ассоциации белков молекулярной массы 33 кДа [4, 10].

Таким образом, в результате рассмотренного механизма реакционного процесса образования O_2 реализуется синхронное четырехэлектронное окисление двух гидроксильных анионов молекул воды, выделяются кислород и протоны, регенерируются исходные катионы Mn^{2+} . При этом молекулярная система ВЦ возвращается в исходное состояние для нового фотохимического цикла реакций.

Квантовохимический анализ. Разработанный механизм фотосинтетического окисления воды и образования молекулярного кислорода был подвергнут квантовохимическому анализу, чтобы выявить эффективность его протекания [48, 49]. Квантовохимический анализ проводили

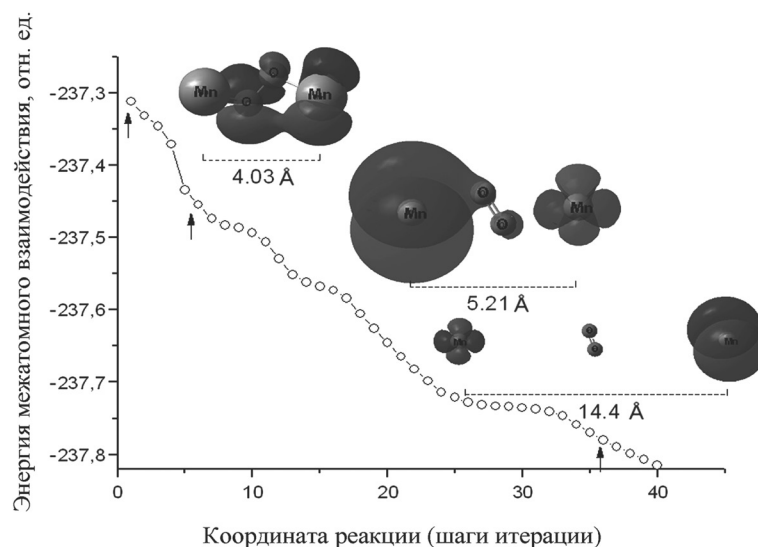


Рис. 5. Квантовохимический анализ реакции образования молекулярного кислорода в двухъядерном Mn-дигидроксидном ассоциате $[\text{Mn}^{4+}(\text{OH})\cdots(\text{HO})\text{Mn}^{4+}]$ водоокисляющего центра КВК согласно разработанному механизму (пояснения в тексте)

Fig. 5. The quantum-chemical analysis of the reaction of molecular oxygen formation in the binuclear Mn-dihydroxide associate $[\text{Mn}^{4+}(\text{OH})\cdots(\text{HO})\text{Mn}^{4+}]$ of the water-oxidizing center of the OEC according to the developed mechanism (see the explanations in the text)

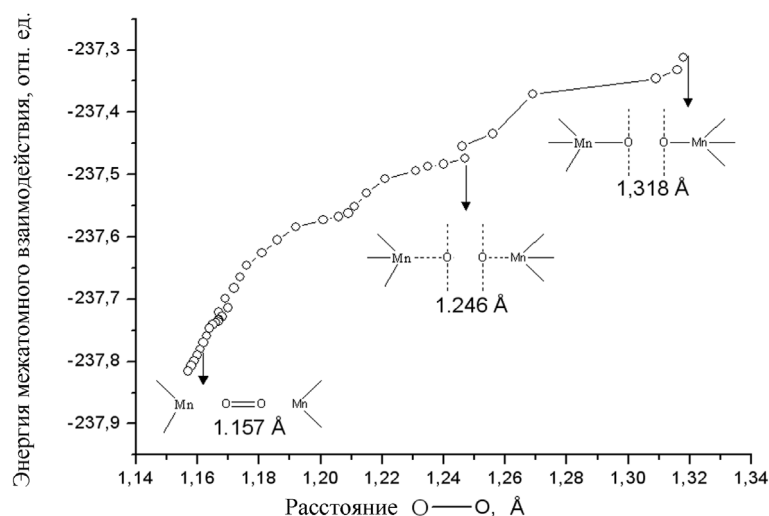


Рис. 6. Изменение расстояния между атомами кислорода в ходе реакции диспропорционирования электронной плотности: от 1,318 Å в исходном дигидроксидном ассоциате $[\text{Mn}^{4+}(\text{OH})\cdots(\text{HO})\text{Mn}^{4+}]$ до 1,157 Å в молекуле кислорода

Fig. 6. Change in the distance between oxygen atoms in the course of the reaction of electron density disproportionation: from 1.318 Å in the initial dihydroxide associate $[\text{Mn}^{4+}(\text{OH})\cdots(\text{HO})\text{Mn}^{4+}]$ to 1.157 Å in the molecule of oxygen

с помощью программного комплекса Priroda-6, используя теоретический метод DFT, функционал плотности PBE и базисный набор SBK по методу Лайкова [57]. Исходными параметрами являлись расстояние между катионами Mn^{4+} (4,03 Å) и пространственная ориентация гидроксильных анионов в двухъядерном дигидроксидном ассоциате $[\text{Mn}^{4+}(\text{OH})\cdots(\text{HO})\text{Mn}^{4+}]$. Метод позволяет на основе оценки суммарной энергии взаимодействия молекул системы произвести расчет распределения плотности валентных электронов, сделать анализ поверхности потенциальной энергии системы и оптимизировать ее геометрию [57]. На основе этих данных выявляется ход реакционного процесса образования наиболее энергетически выгодного межатомного взаимодействия, которое в данном случае приводит к образованию O_2 . На рис. 5 отражено распределение электронной плотности для НОМО- и LUMO-молекулярных орбиталей в ходе реакции диспро-

порционирования электронной плотности в Mn-дигидроксидном ассоциате, изменение энергии межатомного взаимодействия в ходе разрыва связей Mn-O в ассоциате, динамика образования связи O=O молекулы кислорода в результате переноса электронов на катионы Mn^{4+} , а также изменение расстояния между катионами марганца в процессе восстановления катионов Mn^{4+} до Mn^{2+} . Согласно представленным на рис. 5 данным, максимальная активность комплекса в реакции окисления воды наблюдается при расстоянии между функциональными группами в дигидроксидном ассоциате ВЦ, которое соответствует 4,03 Å. В то же время минимальная энергия межатомного взаимодействия соответствует расстоянию 14,4 Å между функциональными катионами марганца в восстановленном состоянии. Это свидетельствует о возможности конформационных переходов в молекулах белков D1, являющихся носителями катионов марганца в структуре димерного КВК. Данные переходы задают расстояние между функциональными катионами марганца, а следовательно, обуславливают возможность регулирования функциональной активности КВК. На рис. 6 представлен процесс изменения расстояния между атомами кислорода в ходе реакции диспропорционирования электронной плотности, которое составляет 1,318 Å в исходном ассоциате и 1,157 Å в молекуле выделяющегося кислорода. Образующийся молекулярный кислород как устойчивый газообразный продукт реакции выделяется в реакционную среду, что делает процесс фотосинтетического окисления воды высокоэффективным и необратимым.

Заключение. Исследование структурно-функциональных свойств изолированного КВК мембран хлоропластов позволило разработать механизм фотосинтетического окисления воды с образованием молекулярного кислорода. С учетом полученных экспериментальных данных впервые показано, что протекание этого процесса обусловлено двуханодной структурой ВЦ, который формируется в результате гидрофобной ассоциации мономерных ПБЛК ФС-2 в димерный комплекс КВК по правилу зеркальной симметрии. Обоснованы структурные параметры КВК и двуханодная молекулярная организация его ВЦ, задающие идентичность молекулярного окружения функциональных катионов марганца и возможность синхронного окисления сразу двух молекул воды и образования O_2 и определяющие термодинамическую эффективность процесса фотосинтетического окисления воды. Разработанный механизм подтвержден с помощью квантовохимического анализа. Это позволяет сделать заключение о соответствии данного механизма природному процессу и о целесообразности применения предложенного механизма в разработке искусственных систем генерации молекулярного кислорода. В настоящее время уже налажен поиск искусственных носителей [58] и предлагаются модели устройств в соответствии с опубликованным ранее [1, 2, 48, 49] и приведенным в данном обзоре принципом действия двуханодного реактора.

Список использованных источников

1. Шутилова, Н. И. Кислородвыделяющий комплекс мембран хлоропластов / Н. И. Шутилова // Биол. мембраны. – 2010. – Т. 27, № 2. – С. 147–155.
2. Shutilova, N. I. The concept of the mechanism of oxygen formation during photosynthesis of plants and its substantiation / N. I. Shutilova // Proceedings of the National Academy of Sciences of Azerbaijan. – 2011. – Vol. 66. – P. 77–90.
3. Шутилова, Н. И. О механизме фотосинтетического окисления воды в димерном кислородвыделяющем комплексе фотосистемы II хлоропластов / Н. И. Шутилова // Биофизика. – 2000. – Т. 45, вып. 1. – С. 51–57.
4. Шутилова, Н. И. О принципах молекулярной организации и функционирования кислородвыделяющего комплекса фотосистемы 2 хлоропластов / Н. И. Шутилова // Успехи соврем. биологии. – 1999. – Т. 119, № 1. – С. 42–55.
5. Barber, J. Photosystem II: an enzyme of global significance / G. Barber // Biochemical Society Transactions. – 2006. – Vol. 34. – P. 619–631.
6. Комиссаров, Г. Г. Фотосинтез: физико-химический подход / Г. Г. Комиссаров; Рос. акад. наук, Ин-т хим. физики им. Н. Н. Семенова. – М.: Едиториал УРСС, 2003. – 223 с.
7. Кутюрин, В. М. О механизме разложения воды в процессе фотосинтеза / В. М. Кутюрин // Изв. Акад. наук СССР. Сер. биол. – 1970. – № 4. – С. 569–580.
8. Шутилова, Н. И. Выделение и исследование трех типов пигмент-белковолипидных комплексов мембран хлоропластов: комплекса фотосистемы 1, комплекса фотосистемы 2 и светособирающего комплекса: дис. ... канд. биол. наук / Н. И. Шутилова; Ин-т биохимии им. А. Н. Баха Рос. акад. наук. – М.: Ин-т биохимии им. А. Н. Баха Рос. акад. наук, 1976. – 32 с.
9. Шутилова, Н. И. Выделение и исследование трех видов пигмент-белковолипидных комплексов хлоропластов: комплекса, содержащего реакционный центр FS-1, комплекса, содержащего реакционный центр FS-2 и светособирающего комплекса / Н. И. Шутилова, В. М. Кутюрин // Физиология растений. – 1976. – Т. 23, вып. 1. – С. 42–49.

10. Шутилова, Н. И. Кислородвыделяющий пигмент-белковолипидный комплекс фотосистемы 2 хлоропластов: дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.02 / Н. И. Шутилова; Рос. акад. наук, Ин-т биохим. физики им. Н. М. Эмануэля. – М.: ИБХФ им. Н. М. Эмануэля, 1997. – 141 с.
11. Блюменфельд, Л. А. Проблемы биологической физики / Л. А. Блюменфельд. – М.: Наука, 1974. – 335 с.
12. Семенов Н. Н. Многоэлектронные процессы в химии и биологии / Н. Н. Семенов, А. Е. Шилов, Г. И. Лихтенштейн // Докл. Акад. наук СССР. – 1975. – Т. 221. – С. 1374–1377.
13. Kok, B. V. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. – 1. A linear four-step mechanism / B. V. Kok, B. Forbush, M. McGloin // J. of Photochem. and Photobiol. – 1970. – Vol. 11. – P. 457–475.
14. Rutherford, A. W. Photosystem II, the water-splitting enzyme / A. W. Rutherford // Trends in Biochem. Sci. – 1989. – Vol. 14. – P. 227–232.
15. Debus, R. J. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution / R. J. Debus // Biochimica et Biophys. Acta. – 1992. – Vol. 1102. – P. 269–352.
16. Yachandra, V. K. Manganese cluster in photosynthesis: where plants oxidize water in dioxygen / V. K. Yachandra, K. Sauer, M. P. Klein // Chem. Rev. – 1996. – Vol. 96. – P. 2927–2950.
17. Dau, H. The tetra-manganese complex of photosystem II during its redox cycle – X-ray absorption results and mechanistic implications / H. Dau, L. Luzzolino, J. Dittmer // Biochim. et Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 1503. – P. 24–39.
18. Siegbahn, P. E. M. Manganese oxyl radical intermediates and O-O bond formation in photosynthetic oxygen evolution and a proposed role for the calcium cofactor in photosystem II / P. E. M. Siegbahn, R. H. Crabtree // J. of the Am. Chem. Soc. – 1999. – Vol. 121. – P. 117–127.
19. Vrettos, J. S. Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry / J. S. Vrettos, J. Limburg, G. W. Brudvig // Biochim. et Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 1503. – P. 229–245.
20. Hillier, W. Oxygen ligand exchange at metal sites – implications for the O₂ evolving mechanism of photosystem II / W. Hillier, T. Wydrzynski // Biochim. et Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 1503. – P. 197–209.
21. Кутюрин, В. М. Электронодонорные свойства пигмент-белковолипидного комплекса хлоропластов / В. М. Кутюрин, Н. И. Шутилова // Биохимия. – 1974. – Т. 39, вып. 1. – С. 102–110.
22. Кутюрин, В. М. К вопросу о методе выделения фотохимически активных пигмент-белковолипидных комплексов хлоропластов / В. М. Кутюрин, Н. И. Шутилова // Биофизика. – 1975. – Т. 20, вып. 2. – С. 246–249.
23. Шутилова, Н. И. Исследование фотоиндуцируемых изменений каротиноидного состава у изолированных пигмент-белковолипидных комплексов ФС-1 и ФС-2 хлоропластов гороха / Н. И. Шутилова, З. В. Жигальцова, В. М. Кутюрин // Физиология растений. – 1976. – Т. 23, вып. 3. – С. 452–459.
24. Исследование фотохимических и спектральных свойств субхлоропластных фрагментов ФС-2, высокоочищенных от примеси ФС-1 / Н. И. Шутилова [и др.] // Биофизика. – 1975. – Т. 20, вып. 5. – С. 844–847.
25. Оптимизация условий выделения трех типов пигмент-белковолипидных комплексов хлоропластов гороха при солюбилизации тритоном X-100 / Н. И. Шутилова [и др.] // Биохимия. – 1979. – Т. 44, вып. 7. – С. 1160–1171.
26. Вершинин, А. В. Исследование пигмент-белковолипидных комплексов в модели моногибридного гетерозиса, полученного на основе хлорофильного мутанта гороха. Сообщение 1. Хлорофилл-белковый состав и спектральные свойства / А. В. Вершинин, Н. И. Шутилова // Генетика. – 1980. – Т. 16, № 4. – С. 667–676.
27. Исследование фотохимического взаимодействия пигмент-белковолипидного комплекса фотосистемы 1 с *n*-бензохиноном потенциометрическим методом / А. Я. Шкурпатов [и др.] // Докл. Акад. наук СССР. – 1974. – Т. 214, № 5. – С. 1214–1217.
28. Восстановление феофигина в световой реакции фотосистемы II высших растений / А. В. Клеваник [и др.] // Докл. Акад. наук СССР. – 1977. – Т. 236, № 1. – С. 241.
29. Исследование эффективности хроматографического разделения пигмент-белковолипидных комплексов реакционных центров фотосистемы 1 и фотосистемы 2 хлоропластов гороха на ДЭАЭ-целлюлозе / Н. И. Шутилова [и др.] // Биохимия. – 1982. – Т. 47, вып. 2. – С. 317–322.
30. Shutilova, N. I. A rapid procedure for isolating the photosystem II reaction centers in a highly enriched form / N. I. Shutilova, A. Faludi-Daniel, V. V. Klimov // FEBS Lett. – 1982. – Vol. 138. – P. 255–260.
31. Исследование фотовосстановления феофитина и фотоокисления хлорофилла P680 на препаратах фотосистемы II из хлоропластов гороха и *Chlamydomonas reinhardtii* / В. В. Климов [и др.] // Физиология растений. – 1980. – Т. 27, № 2. – С. 315–326.
32. Вершинин, А. В. Исследование пигмент-белковолипидных комплексов в модели моногибридного гетерозиса, полученного на основе хлорофильного мутанта гороха. Сообщ. 2. Фотохимическая активность / А. В. Вершинин, Н. И. Шутилова // Генетика. – 1980. – Т. 16, № 4. – С. 692–702.
33. Шутилова, Н. И. Фотоиндуцированное выделение протонов пигмент-белковолипидным комплексом фотосистемы 2 в присутствии феррицианида / Н. И. Шутилова, Г. М. Ананьев, Д. А. Закржевский // Докл. Акад. наук СССР. – 1980. – Т. 253, № 5. – С. 1263–1266.
34. Шутилова, Н. И. Спектральные формы хлорофилла у изолированных пигмент-белковолипидных комплексов хлоропластов гороха / Н. И. Шутилова, И. Г. Кадошникова, Д. А. Закржевский // Биофизика. – 1984. – Т. 29. – С. 844–853.
35. Изучение действия специфических ингибиторов трансляции на образование нативных форм хлорофилла в пигмент-белковолипидных комплексах хлоропластов гороха / И. Ю. Щербакова [и др.] // Молекуляр. биология. – 1980. – Т. 14, вып. 4. – С. 881–890.

36. О связи образования нативных форм хлорофилла с процессами трансляции в хлоропластах и цитоплазме / Ю. Е. Гиллер [и др.] // Докл. Акад. наук СССР. – 1979. – Т. 244, № 3. – С. 739–742.
37. Стадничук, И. Н. Структура спектров поглощения и флуоресценции и пигментная организация комплекса хлорофилл-антенны высших растений / И. Н. Стадничук, Н. И. Шутилова // Биофизика. – 1980. – Т. 25, вып. 5. – С. 781–786.
38. Об оптическом поглощении при 700 нм спектрах ЭПР хлоропластов и субхлоропластных частиц / М. Г. Гольдфельд [и др.] // Биофизика. – 1976. – Т. 21, вып. 1. – С. 183–185.
39. Реактивация функции выделения кислорода у субхлоропластных фрагментов фотосистемы 2, отмытых от белков с молекулярной массой 17, 23, и 33 кДа / Н. И. Шутилова [и др.] // Биохимия. – 1987. – Т. 52, вып. 12. – С. 1958–1964.
40. Выделение, стабилизация и исследование кислородвыделяющего пигмент-белковолипидного комплекса фотосистемы 2 мембран хлоропластов / Н. И. Шутилова [и др.] // Биол. мембраны. – 1990. – Т. 7, № 4. – С. 359–367.
41. О механизме термоинактивации кислородвыделяющего комплекса функционального ядра фотосистемы 2 хлоропластов / Н. И. Шутилова [и др.] // Биохимия. – 1992. – Т. 57, вып. 10. – С. 1508–1518.
42. Temperature-isolated structural and functional transitions in the oxygen-evolving complex of photosystem 2 subchloroplast preparations / N. I. Shutilova [et al.] // Biochem. and Mol. Biol. Inter. – 1995. – Vol. 35. – P. 1233–1243.
43. Семенова, Г. А. Влияние хранения при низких положительных температурах на структуру, функциональную активность и изменения липидного состава хлоропластов / Г. А. Семенова, Н. И. Шутилова // Биол. мембраны. – 1996. – Т. 13, № 2. – С. 138–145.
44. Фотоэлектрический ответ, генерируемый при восстановлении негемового железа на акцепторном участке фотосистемы 2 / М. Д. Мамедов [и др.] // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 6. – С. 854–958.
45. Исследование соотношения фотоавтотрофной и гетеротрофной энергозапасующих систем клеток растений для оценки воздействия стрессовых факторов / Н. И. Шутилова [и др.] // Приклад. биохимия и микробиология. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 448–454.
46. Shutilova, N. I. Model of the structural organization of the oxygen-evolving complex // Molecular Biology and Genetics of Photosynthesis: Proc. Inter. Conf. / Moscow State University. – Moscow, 1977. – P. 22–24.
47. Шутилова, Н. И. Молекулярные механизмы ингибирующего действия тяжелых металлов на кислородвыделяющий комплекс мембран хлоропластов / Н. И. Шутилова // Биол. мембраны. – 2006. – Т. 23, № 5. – С. 355–363.
48. Shutilova, N. I. The mechanism and quantum-chemical modeling of the reaction of photosynthetic water oxidation and oxygen formation / N. I. Shutilova, D. N. Moiseev // Rus. J. of Phys. Chem. B. – 2010. – Vol. 4, N 5. – P. 801–809.
49. Shutilova, N. I. The role of transitional metals in biological systems. Mn-protein center of water oxidation and its functioning in the process of photosynthetic oxygen formation / N. I. Shutilova, D. N. Moiseev // Protection of Metals and Phys. Chemistry of Surfaces. – 2010. – Vol. 46, N 4. – P. 502–507.
50. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution / A. Zouni [et al.] // Nature. – 2001. – Vol. 409. – P. 739–743.
51. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center / K. N. Ferreira [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 303. – P. 1831–1838.
52. Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models / T. A. Jones [et al.] // Acta Crystallographica. Section A. – 1991. – Vol. 47. – P. 110–119.
53. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II / B. Loll [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 438. – P. 1040–1044.
54. Umena, Y. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å / Y. Umena, K. Kawakami, N. Kamiya // Nature. – 2011. – Vol. 473. – P. 55.
55. Directed mutagenesis indicates that the donor to P680⁺ in Photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide / R. J. Debus [et al.] // Biochemistry. – 1988. – Vol. 27. – P. 9071–9074.
56. Directed alteration of the D1 polypeptide of Photosystem II: Evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680 / J. Metz [et al.] // Biochemistry. – 1989. – Vol. 28. – P. 6960–6969.
57. Laikov, D. N. Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets / D. N. Laikov // Chem. Phys. Lett. – 1997. – Vol. 281. – P. 151–156.
58. Photosynthetic Water Oxidation: Insights from Manganese Model Chemistry / K. Joungh [et al.] // Accounts of Chem. Res. – 2015. – Vol. 48. – P. 567–574.

References

1. Shutilova N. I. The oxygen-evolving complex of chloroplast membranes. *Biologicheskie membrany* [Biological Membranes], 2010, vol. 27, no. 2, pp. 147–155. (in Russian).
2. Shutilova N. I. The concept of the mechanism of oxygen formation during photosynthesis of plants and its substantiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Azerbaijan*, 2011, vol. 66, pp. 77–90.
3. Shutilova N. I. On the mechanism of photosynthetic water oxidation in the dimeric oxygen-evolving complex of chloroplast photosystem II. *Biofizika* [Biophysics], 2000, vol. 45, no. 1, pp. 51–57. (in Russian).
4. Shutilova N. I. On the principles of molecular organization and functioning of the oxygen-evolving complex of chloroplast photosystem II. *Uspekhi sovremennoi biologii* [Advances in Modern Biology], 1999, vol. 119, no. 1, pp. 42–55. (in Russian).

5. Barber J. Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochemical Society Transactions*, 2006, vol. 34, pp. 619–631.
6. Komissarov, G. G. *Photosynthesis: the Physico-Chemical Approach*. Moscow, Editorial URSS, 2003, 223 p. (in Russian).
7. Kuturyn V. M. On the mechanism of water decomposition in the photosynthetic process. *Izvestia AN SSSR. Seriya biologicheskaja* [Transactions of the Academy of Sciences of the Soviet Union. Biological Series], 1970, no. 4, pp. 569–580. (in Russian).
8. Shutilova N. I. *Isolation and investigation of three types of pigment-lipoprotein complexes of chloroplast membranes: complex of photosystem 1, complex of photosystem 2, and light-collecting complex*, Abstract of Ph. D. dissertation, Moscow, A. N. Bakh Institute of Biochemistry, 1976. (in Russian).
9. Shutilova N. I., Kuturyn V. M. Isolation and investigation of three types of pigment-lipoprotein chloroplast complexes: complex that contains the reaction center of PS-1, complex that contains the reaction center of PS-2, and light-collecting complex. *Fiziologiya rastenii* [Physiology of Plants], 1976, vol. 23, no. 1, pp. 43–49. (in Russian).
10. Shutilova N. I. *Oxygen-evolving pigment-lipoprotein complex of chloroplast photosystem 2*, Abstract of D. Sc. Dissertation, Biophysics, Moscow, Emanuel Institute of Biochemical Physics, 1997. (in Russian).
11. Blyumenfeld L. A. *Problemy biologicheskoi fiziki* [Problems of biological physics], Moscow, Nauka, 1977. (in Russian).
12. Semenov N. N., Shilov A. E., Likhtenshtein G. I. Multi-electron processes in chemistry and biology. *Doklady Akademii Nauk SSSR* [Doklady of the Academy of Sciences of the Soviet Union], 1975, vol. 221, pp. 1374–1377. (in Russian).
13. Kok B., B. Forbush B., McGloin M. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. – 1. A linear four-step mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 1970, vol. 11, pp. 457–475.
14. Rutherford A. W. Photosystem II, the water-splitting enzyme. *Trends in Biochemical Sciences*, 1989, vol. 14, pp. 227–232.
15. Debus R. J. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, vol. 1102, pp. 269–352.
16. Yachandra V. K., Sauer K., Klein M. P. Manganese cluster in photosynthesis: where plants oxidize water in dioxygen, *Chemical Reviews*, 1996, vol. 96, pp. 2927–2950.
17. Dau H., Luzzolino L., Dittmer J. The tetra-manganese complex of photosystem II during its redox cycle – X-ray absorption results and mechanistic implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, vol. 1503, pp. 24–39.
18. Siegbahn P. E. M., Crabtree R. H. Manganese oxyl radical intermediates and O-O bond formation in photosynthetic oxygen evolution and a proposed role for the calcium cofactor in photosystem II. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, vol. 121, pp. 117–127.
19. Vrettos J. S., Limburg J., Brudvig G. W. Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, vol. 1503, pp. 229–245.
20. Hillier W., Wydrzynski T. Oxygen ligand exchange at metal sites – implications for the O₂ evolving mechanism of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, vol. 1503, pp. 197–209.
21. Kuturyn V. M., Shutilova N. I. Electron-donor properties of the pigment-lipoprotein complex of chloroplast PS-2. *Biokhimiya* [Biochemistry], 1974, vol. 39, no. 1, pp. 102–110. (in Russian).
22. Kuturyn V. M., Shutilova N. I. On the method for isolating photochemically active pigment-lipoprotein complexes of chloroplasts. *Biofizika* [Biophysics], 1975, vol. 20, no. 2, pp. 246–249. (in Russian).
23. Shutilova N. I., Zhigal'tsova Z. V., Kuturyn V. M. Research on photo-induced changes of the carotenoid composition in isolated pigment-lipoprotein complexes of pea chloroplast PS-1 and PS-2. *Fiziologiya rastenii* [Physiology of Plants], 1976, vol. 23, no. 3, pp. 452–459. (in Russian).
24. Shutilova N. I., Klimov V. V., Shuvalov V. A., Kuturyn V. M. Research on the photochemical and spectral properties of subchloroplast PS-2 fragments highly purified from PS-1 admixture. *Biofizika* [Biophysics], 1975, vol. 20, no. 5, pp. 844–847. (in Russian).
25. Shutilova, N. I., Kadoshnikova, I. G., Kozlovskaya, N. G., Klevanik, A. V., Zakrzhevskii, D. A. Optimization of the conditions for isolating three types of pigment-lipoprotein complexes of pea chloroplasts under solubilization with triton X-100. *Biokhimiya* [Biochemistry], 1979, vol. 44, no. 7, pp. 1160–1171. (in Russian).
26. Vershinin A. V., Shutilova N. I. Investigation of pigment-lipoprotein complexes in the model of monohybrid heterosis obtained based on a chlorophyll pea mutant. Report 1. Chlorophyll-protein composition and spectral properties]. *Genetika* [Genetics], 1980, vol. 16, no. 4, pp. 667–676. (in Russian).
27. Skuropatov A. Ya., Shutilova N. I., Stolovitskii Yu. M., Evstigneev V. B. Research into the photochemical interaction of photosystem I pigment-lipoprotein complex with n-benzoquinone by the potentiometric method. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Doklady of the Academy of Sciences of the Soviet Union], 1974, vol. 214, no. 5, pp. 1214–1217. (in Russian).
28. Klevanik A. V., Klimov V. V., Shuvalov V. A., Krasnovskii A. A. Reduction of pheophytin in the light reaction of photosystem II of higher plant. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Doklady of the Academy of Sciences of the Soviet Union], 1977, vol. 236, no. 1, p. 241. (in Russian).
29. Shutilova N. I., Demidova L. N., Kadoshnikova I. G., Klimov V. V., Zakrzhevskii A. D. Research into the efficiency of DEAE-cellulose chromatographic separation of pigment-lipoprotein complexes of reaction centers of photosystem 1 and photosystem 2 in chloroplast membranes. *Biokhimiya* [Biochemistry], 1982, vol. 47, no. 2, pp. 317–322. (in Russian).
30. Shutilova N. I., Faludi-Daniel A., Klimov V. V. A rapid procedure for isolating the photosystem II reaction centers in a highly enriched form. *FEBS Letters*, 1982, vol. 138, pp. 255–260.

31. Klimov V. V., Allakhverdiev S. I., Shutilova N. I., Krasnovskii A. A. Study of photo-reduction of pheophytin and photo-oxidation of chlorophyll P680 based on photosystem II preparations from chloroplasts of pea and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Fiziologiya rastenii* [Physiology of Plants], 1980, vol. 27, no. 2, pp. 315–326. (in Russian).
32. Vershinin A. V., Shutilova N. I. Study of pigment-lipoprotein complexes in the model of monohybrid heterosis obtained based on a chlorophyll pea mutant. Report 2. Photochemical activity. *Genetika* [Genetics], 1980, vol. 16, no. 4, pp. 692–702. (in Russian).
33. Shutilova N. I., Ananyev G. M., Zakrzhevskii D. A. Photo-induced proton release by the pigment-lipoprotein complex of photosystem II in the presence of ferricyanide. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Doklady of the Academy of Sciences of the Soviet Union], 1980, vol. 253, no. 5, pp. 1263–1266. (in Russian).
34. Shutilova N. I., Kadoshnikova I. G., Zakrzhevskii D. A. Spectral forms of chlorophyll in the isolated pigment-lipoprotein complexes of pea chloroplasts. *Biofizika* [Biophysics], 1984, vol. 29, pp. 844–853. (in Russian).
35. Shcherbakova I. Yu., Shutilova N. I., Kadoshnikova I. G., Giller Yu. E. Research into the effect of specific translation inhibitors on the formation of native chlorophyll forms in the pigment-lipoprotein complexes of pea chloroplasts. *Molekuliarnaya biologiya* [Molecular Biology], 1980, vol. 14, pp. 881–890. (in Russian).
36. Giller Yu. E., Shcherbakova I. Yu., Shutilova N. I., Kadoshnikova I. G. On the relationship between the formation of native chlorophyll forms and processes of translation in chloroplasts and cytoplasm. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Doklady of the Academy of Sciences of the Soviet Union], 1979, vol. 244, no. 3, pp. 739–742. (in Russian).
37. Stadnichuk I. N., Shutilova N. I. The structure of absorption and fluorescence spectra and pigment organization of the chlorophyll antenna complex in higher plants. *Biofizika* [Biophysics], 1980, vol. 25, no. 5, pp. 781–786. (in Russian).
38. Goldfeld M. G., Tsapin A. I., Shutilova N. I., Khangulov S. V. On the optical absorption at 700 nm EPR of spectra of chloroplasts and subchloroplast particles. *Biofizika* [Biophysics], 1976, vol. 21, no. 1, pp. 183–185. (in Russian).
39. Shutilova N. I., Kadoshnikova I. G., Smolova T. N., Klimov V. V. Reactivation of the oxygen-evolving function in photosystem II subchloroplast fragments washed from proteins with molecular weights 17, 23, and 33 kDa. *Biokhimiya* [Biochemistry], 1987, vol. 52, no. 12, pp. 1958–1964. (in Russian).
40. Shutilova N. I., Strizhova V. P., Khristin M. S., Antropova T. M., Klimov V. V. Isolation, stabilization, and study of the oxygen-evolving pigment-lipoprotein complex of photosystem II in chloroplast membranes. *Biologicheskiye membrany* [Biological Membranes], 1990, vol. 7, no. 4, pp. 359–367. (in Russian).
41. Shutilova N. I., Klimov V. V., Antropova T. M., Shnyrov V. L. On the mechanism of thermal inactivation of the oxygen-evolving complex of the functional core of chloroplast photosystem II. *Biokhimiya* [Biochemistry], 1992, vol. 57, no. 10, pp. 1508–1518. (in Russian).
42. Shutilova N. I., Semenova G. A., Klimov V. V., Shnyrov V. L. Temperature-isolated structural and functional transitions in the oxygen-evolving complex of photosystem 2 subchloroplast preparations. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1995, vol. 35, p. 1233–1243.
43. Semenova G. A., Shutilova N. I. Influence of storage at low positive temperatures on the structure, functional activity, and changes in the lipid composition of chloroplasts. *Biologicheskiye membrany* [Biological Membranes], 1996, vol. 13, no. 2, pp. 138–145. (in Russian).
44. Mamedov M. D., Beshta O. E., Shutilova N. I., Semenov A. Yu. Photoelectric response generated during the reduction of non-heme iron in the acceptor site of photosystem 2. *Biokhimiya* [Biochemistry], 2000, vol. 65, no. 6, pp. 854–958. (in Russian).
45. Shutilova N. I., Pinskii D. L., Vasilyeva G. V., Dmitriev V. V., Brynskikh M. N., Litkens E. S. Estimation of environmentally stressful factors by a comparative luminescence assay of autotrophic and heterotrophic energy storage systems of plant cells. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], 1997, vol. 33, no. 4, pp. 448–454. (in Russian).
46. Shutilova N. I. Model of the structural organization of the oxygen-evolving complex. *Proc. Inter. Conf. "Molecular Biology and Genetics of Photosynthesis"*, Moscow, Moscow State University, 1977, pp. 22–24.
47. Shutilova N. I. Molecular mechanisms of the inhibitory effect of heavy metals on the oxygen-evolving complex of chloroplast membranes. *Biologicheskiye membrany* [Biological Membranes], 2006, vol. 23, no. 5, pp. 355–363. (in Russian).
48. Shutilova N. I., Moiseev D. N. The mechanism and quantum-chemical modeling of the reaction of photosynthetic water oxidation and oxygen formation. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2010, vol. 4, no. 5, pp. 801–809.
49. Shutilova N. I., Moiseev D. N. The role of transitional metals in biological systems. Mn-protein center of water oxidation and its functioning in the process of photosynthetic oxygen formation. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 2010, vol. 46, no. 4, pp. 502–507.
50. Zouni A., Witt H., Kern J., Fromme P., Krauß N., Saenger W., Orth P. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 2001, vol. 409, pp. 739–743.
51. Ferreira K. N., Iverson T. M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 2004, vol. 303, pp. 1831–1838.
52. Jones T. A., Zou J. Y., Cowan S. W., Kjeldgaard M. Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A*, 1991, vol. 47, pp. 110–119.
53. Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A., Biesiadka J. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 2005, vol. 438, pp. 1040–1044.
54. Umena Y., Kawakami K., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 2011, vol. 473, p. 55.

55. Debus R. J., Barry B. A., Sathole I., Babcock G. T., McIntosh L. Directed mutagenesis indicates that the donor to P680⁺ in Photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry*, 1988, vol. 27, pp. 9071–9074.

56. Metz J., Nixon P., Rogner M., Brudvig G., Diner B. Directed alteration of the D1 polypeptide of Photosystem II: Evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, pp. 6960–6969.

57. Laikov D. N. Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets. *Chemical Physics Letters*, 1997, vol. 281, pp. 151–156.

58. Joung K., Brennan B., Tagure R., Brudvig G. Photosynthetic Water Oxidation: Insights from Manganese Model Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 2015, vol. 48, pp. 567–574.

Інфармацыя аб аўторе

Шутилова Надежда Ивановна – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ул. Институтская, 2, 142290, г. Пушкино, Московская область, Российская Федерация). E-mail: shn-bio@rambler.ru.

Information about the author

Shutilova Nadezhda Ivanovna – D. Sc. (Biol.), Leading researcher. Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences (2, Institutskaya Str., 142290, Pushchino, Moscow District, Russian Federation). E-mail: shn-bio@rambler.ru.

Для цитирования

Шутилова, Н. И. Механизм фотосинтетического образования молекулярного кислорода / Н. И. Шутилова // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 112–128.

For citation

Shutilova N. I. Mechanism of photosynthetic molecular oxygen formation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 112–128.