

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІі НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2017. № 4

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2017. № 4

Журнал основан в 1956 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 395 от 18 мая 2009 г.

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

Главный редактор

Михаил Ефимович Никифоров – Отделение биологических наук
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Редакционная коллегия

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

А. Г. Лобанок – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. Е. Падутов – Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь
В. Н. Решетников – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. В. Титок – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Л. В. Хотылева – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
С. Н. Черенкевич – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
Н. В. Шальго – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. М. Шкуматов – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Редакционный совет

В. Ф. Багинский – Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Беларусь
А. Баршевский – Даугавпилский университет, Даугавпилс, Латвия
Я. Б. Блюм – Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина
В. В. Валетов – Мозырский государственный педагогический университет имени И. П. Шамякина, Мозырь, Беларусь
В. Е. Гайдук – Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, Брест, Беларусь
Ю. Ю. Дгебуадзе – Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия
Н. А. Колчанов – Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
В. В. Кузнецов – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия
В. Олех-Пяэцка – Варшавский университет сельского хозяйства, Варшава, Польша
О. Н. Пугачев – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
А. И. Рапопорт – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвия
И. А. Тихонович – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия
Е. Е. Фесенко – Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия
В. В. Швартау – Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина
Н. К. Янковский – Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Адрес редакции:

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

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2017. № 4.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *С. Н. Костюк*

Подписано в печать 16.10.2017. Выход в свет 27.10.2017. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 98 экз. Заказ 205.
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. 4

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. 395

*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

Mikhail E. Nikiforov – Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus

Editorial Board

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

N. V. Shalygo – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

V. M. Shkumatov – Belarusian State University, Minsk, Belarus

V. V. Titok – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Editorial Council

Vladimir F. Baginski – F. Skorina Gomel State University, Gomel, Belarus

Arvids Barsevskis – Daugavpils University, Daugavpils, Latvia

Yaroslav B. Blume – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Yuri Yu. Dgebuadze – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Vasiliy E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Belarus

Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Wanda Olech-Piasecka – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland

Evgeniy E. Phesenko – Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Oleg N. Pugachev – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Alexander I. Rapoport – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvia

Victor V. Schwartz – Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Igor A. Tikhonovich – All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

Valentin V. Valetov – I. P. Shamyakin Mozyr State Pedagogical University (Republic of Belarus), Mozyr, Belarus

Nikolai K. Yankovski – Vavilov Institute of General Genetics. Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Address of the Editorial Office:

1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.

Phone: +375 17 284-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru

Website: vestimed.belnauka.by

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series, 2017, no. 4.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*

Computer imposition *S. N. Kostsyuk*

Sent for press 16.10.2017. Output 27.10.2017. Format 60×84¹/₈. Offset paper.

Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 98 copies. Order 205.

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 of August 2, 2013. License for press no. 02330/455 dated of December 30, 2013.

Address: F. Skorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

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

ISSN 1029-8940 (print)

ЗМЕСТ

Вязов Е. В., Мананкина Е. Е., Филипчик Е. А., Гончарик Р. Г., Шалыго Н. В. Продуктивность и пигментный комплекс сине-зеленой водоросли <i>Spirulina platensis</i> при частичной замене бикарбоната натрия на гидроксид натрия в среде культивирования	7
Зубрицкая Г. П., Скоробогатова А. С., Лукьяненко Л. М., Горбенко Г. П., Слобожанина Е. И. Мембранные эффекты при сочетанном воздействии на эритроциты человека амилоидных фибрилл и ацетата свинца	13
Аверина Н. Г., Щербаков Р. А., Козел Н. В., Мананкина Е. Е., Гончарик Р. Г., Шалыго Н. В. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на продуктивность и пигментный состав водоросли <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Ризевский В. К. Морфометрические параметры девятиглай колюшки <i>Pungitius pungitius</i> (Linnaeus, 1758) из водоемов бассейна Черного моря	33
Торчик В. И., Холопук Г. А., Келько А. Ф. Влияние способов изолирования на приживаемость и развитие прививок декоративных форм листовых древесных видов	40
Володько И. К., Завадская Л. В., Кузьменкова С. М. Мониторинг состояния коллекций цветочно-декоративных луковичных растений	45
Дудчик Н. В., Сычик С. И., Емельянова О. А. Тест-модель оценки интегральной токсичности почв, контаминированных солями цинка	52
Побойнев В. В., Хрусталева Т. А., Хрусталева Т. А. Особенности аминокислотного состава альфа-спиральных участков в полипептидных цепях белков различных структурных классов	58
Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Савенко И. В., Луцай Д. А. Влияние катионов на активность НАДФ ⁺ -зависимой глутаматдегидрогеназы у бактерий родов <i>Acinetobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> и <i>Nocardia</i> – продуцентов поверхностно-активных веществ	67
Шапорева В. А., Змушко А. А., Колбанова Е. В. Влияние салициловой кислоты на ризогенез растений-регенерантов подвоев яблони в культуре <i>in vitro</i>	75
Дубарь Д. А. Сезонная динамика биохимического состава клубней топинамбура (<i>Helianthus tuberosus</i> L.) при интродукции в Беларусь	81
Зубей Е. С., [Реуцкий В. Г.] Влияние водного дефицита на параметры водообмена мезофилла листьев модифицированных по генам РІР аквапоринов растений <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	88

АГЛЯДЫ

Зинченко А. И., Щеколова А. С. СрG-олигодезоксинуклеотиды и их практическое применение	96
Балашенко Н. А., Дромашко С. Е. Длинные некодирующие РНК и их функции	110
Яцына А. П. Инвентаризация и инсерция белорусских образцов лишайников первой четверти XX в. в гербарии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE)	120

CONTENTS

Viazau Y. V., Manankina E. E., Filipchik E. A., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Productivity and pigment complex of blue-green alga <i>Spirulina platensis</i> after partial substitution of sodium bicarbonate with sodium hydroxide in culture medium	7
Zubritskaya G. P., Skarabahatava A. S., Lukyanenko L. M., Gorbenko G. P., Slobozhanina E. I. Membrane effects in combined impact on human erythrocytes of amyloid fibrils and lead ions	13
Averina N. G., Sherbakov R. A., Kozel N. V., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Influence of 5-aminolevulinic acid on the productivity and pigment composition of algae <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Rizevsky V. K. Morphometric parameters of ninespine stickleback <i>Pungitius pungitius</i> (Linnaeus, 1758) from Black sea basin reservoirs	33
Torchyk U. I., Kholopuk G. A., Kelko H. F. The influence of isolating means on the survival and development of deciduous woody plants cultivars grafts	40
Volodko I. K., Zavadskaya L. V., Kuzmenkova S. M. Monitoring of ornamental bulbous plants collections	45
Dudchik N. V., Sychik S. I., Emeliyanova O. A. Test model for the assessment of cumulative toxicity of soil contaminated with salts of zinc	52
Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A. The characteristic properties of amino acid content of alpha helices fragments in polypeptide chains of different structural classes of proteins	58
Pirog T. P., Shevchuk T. A., Savenko I. V., Lutsai D. A. Influence of cations on NADP ⁺ -dependent glutamate dehydrogenase activity in bacteria of genera <i>Acinetobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> and <i>Nocardia</i> – producers of surfactants	67
Shaporeva V. A., Zmushko A. A., Kolbanova E. V. Effect of salicylic acid on rhizogenesis of apple rootstock microplants in <i>in vitro</i> conditions	75
Dubar D. A. Seasonal dynamics of the biochemical composition of jerusalem artichoke (<i>Helianthus tuberosus</i> L.) tubers after introduction in Belarus	81
Zubei E. S., Reutskiy V. G. Impact of water deficit on the parameters of the water exchange of leave mesophyll of modified on the PIP aquaporins genes <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. plants	88

REVIEWS

Zinchenko A. I., Shchokolova A. S. CpG oligodeoxynucleotides and their practical usage	96
Balashenko N. A., Dromashko S. E. Long non-coding RNAs and their functions	110
Yatsyna A. P. The inventory and inseration belarusian lichen samples of the first quarter of the XX century in the herbarium of the Botanical institute V. L. Komarova RAS (LE)	120

ISSN 1029-8940 (print)

УДК 579.222

Поступила в редакцию 28.07.2017

Received 28.07.2017

Е. В. Вязов, Е. Е. Мананкина, Е. А. Филипчик, Р. Г. Гончарик, Н. В. Шалыго*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПИГМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС
СИНЕ-ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *SPIRULINA PLATENSIS* ПРИ ЧАСТИЧНОЙ ЗАМЕНЕ
БИКАРБОНАТА НАТРИЯ НА ГИДРОКСИД НАТРИЯ
В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Аннотация. Изучены продуктивность и содержание хлорофилла *a*, каротиноидов и фикоцианина в биомассе сине-зеленой водоросли спирулины (*Spirulina platensis*) при частичной замене NaHCO_3 на NaOH в среде культивирования. Показано, что замена 25, 50, 65 и 75 % NaHCO_3 (4,2; 5,88; 8,4 и 12,6 г/л) на NaOH (0,05; 0,10; 0,13 и 0,15 г/л соответственно) в питательной среде не влияет на продуктивность водоросли по сравнению с контролем (стандартная питательная среда Заррука, содержащая 16,8 г/л NaHCO_3), а количество хлорофилла *a* и каротиноидов (виолаксантина, лютеина и β -каротина) во всех опытных вариантах остается на уровне контроля. В то же время использование модифицированной питательной среды приводило к снижению количества фикоцианина, который не только является фотосинтетическим пигментом, но и признан одним из наиболее эффективных антиоксидантов. При замене 65 и 75 % NaHCO_3 на NaOH содержание фикоцианина уменьшалось на 16 и 34 % соответственно. Использование гидроксида натрия вместо бикарбоната натрия в среде культивирования позволило существенно снизить затраты на получение биомассы спирулины.

Согласно полученным результатам, показателем качества биомассы спирулины при частичной замене NaHCO_3 на NaOH в питательной среде является уровень таких фотосинтетических пигментов, как хлорофилл *a* или каротиноиды, но не уровень фикоцианина.

Ключевые слова: модифицированная среда Заррука, пигменты, продуктивность, *Spirulina platensis*

Для цитирования: Продуктивность и пигментный комплекс сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis* при частичной замене бикарбоната натрия на гидроксид натрия в среде культивирования / Е. В. Вязов [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 7–12.

Y. V. Viazau, E. E. Manankina, E. A. Filipchik, R. G. Goncharik, N. V. Shalygo*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***PRODUCTIVITY AND PIGMENT COMPLEX OF BLUE-GREEN ALGA *SPIRULINA PLATENSIS*
AFTER PARTIAL SUBSTITUTION OF SODIUM BICARBONATE WITH SODIUM HYDROXIDE
IN CULTURE MEDIUM**

Abstract. It has been shown that the partial substitution of NaHCO_3 with NaOH in the culture medium of *Spirulina platensis* does not lead to a change in productivity of the algal culture. Substitution of 25 to 50 % of sodium bicarbonate with sodium hydroxide makes it possible to obtain biomass with a similar content of key pigments as compared to the control (standard Zarrouk medium) while allowing for a significant reduction in the cost of reagents for the preparation of culture medium.

Keywords: modified Zarrouk medium, pigments, productivity, *Spirulina platensis*

For citation: Viazau Y. V., Manankina E. E., Filipchik E. A., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Productivity and pigment complex of blue-green alga *Spirulina platensis* after partial substitution of sodium bicarbonate with sodium hydroxide in culture medium. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 7–12 (in Russian).

Введение. Спирулина относится к сине-зеленым водорослям – цианобактериям. Она является одним из наиболее перспективных микроорганизмов, применяемых в промышленной биотехнологии, так как активно используется в качестве пищевой и кормовой добавки, в производстве косметики, а также в фармакологии. Спирулина содержит белок высокого качества, в состав которого входят незаменимые аминокислоты, пигменты, липиды, ненасыщенные жирные кислоты (в том числе и 3-омега-жирные), витамины, антиоксиданты и другие соединения, обладающие высокой биологической активностью [1–3].

Особенности культивирования спирулины достаточно хорошо изложены в научной литературе [4, 5]. Тем не менее дальнейшие исследования по оптимизации питательной среды для выращи-

вания спирулины продиктованы необходимостью снижения затрат на ее производство. Традиционно культура спирулины выращивается на среде Заррука либо аналогичных питательных средах, содержащих большое количество бикарбоната натрия – NaHCO_3 (в стандартной среде Заррука его содержание составляет 16,8 г/л), используемого в качестве источника углерода и для поддержания щелочной pH, равной 8–10 [6, 7]. Несмотря на наличие научных публикаций, посвященных вопросу уменьшения затрат на среду выращивания путем замены ее отдельных компонентов более дешевыми аналогами либо снижения их содержания в среде [8, 9], исключить использование большого количества бикарбоната натрия либо его источников, как правило, не удается. Ранее предприняты попытки полной замены NaHCO_3 на NaOH [10, 11]. Показано, что для культивирования спирулины достаточно 0,2 г/л NaOH [11], что делает такую модификацию среды экономически выгодной. Однако в подобных условиях для достижения высокой продуктивности водоросли требуется предварительная многочасовая продувка питательной среды CO_2 либо предварительная адаптация культуры к модифицированной среде [10, 11], что усложняет процесс культивирования спирулины и требует дополнительных расходов на реактивы и оборудование.

Цель данной работы – изучение продуктивности водоросли и содержания пигментов в ее биомассе при использовании питательной среды Заррука, в которой бикарбонат натрия частично заменен на гидроксид натрия.

Объект и методы исследования. В опытах использовали спирулину (*Spirulina platensis* IBCE S-2) из альгологической коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Суспензию спирулины выращивали в течение 7 сут при температуре 22 ± 2 °C с фотопериодом 14 ч в стандартной среде Заррука (контроль) [6] и в средах Заррука с заменой 25, 50, 65 и 75 % NaHCO_3 на NaOH (табл. 1). Для освещения использовали белые люминесцентные лампы Philips TD-36/765, освещенность на поверхности суспензии составляла 4500 лк. Плотность биомассы в исходной суспензии была одинакова для всех вариантов (0,2 г/л). Все пробы продували атмосферным воздухом в течение фотопериода.

Т а б л и ц а 1. Состав питательной среды (г/л), используемой для культивирования спирулины

Table 1. Composition of the culture medium (g/l) used for cultivation of spirulina

Вариант опыта	NaHCO_3	NaOH
Стандартная среда Заррука (контроль)	16,8	0,00
25 % NaOH	12,6	0,05
50 % NaOH	8,4	0,10
65 % NaOH	5,88	0,13
75 % NaOH	4,2	0,15

П р и м е ч а н и е. За 100 % NaHCO_3 принимали 16,8 г/л (как в среде Заррука), а за 100 % NaOH – 0,2 г/л (исходя из литературных данных [11]).

Продуктивность спирулины определяли по накоплению сухой биомассы в процессе ее роста. Для этого измеряли величину оптической плотности суспензии при 560 нм на спектрофотометре РВ 2201 (SOLAR, Беларусь). Сухую массу рассчитывали, принимая во внимание данные о том, что оптическая плотность культуры спирулины при 560 нм, равная единице, эквивалентна содержанию 699 мг сухой биомассы в 1 л суспензии [12]. Для определения содержания фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов) в каждом варианте отбирали по 4 мл суспензии спирулины и, предварительно добавив 40 мкл насыщенного раствора CaCl_2 , центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g, используя центрифугу с охлаждением (Sigma, Германия). Осадок очищали от среды культивирования путем ресуспендирования в 4 мл дистиллированной воды с последующим центрифугированием при 17 000 g в течение 10 мин, после чего его переносили в охлажденные (до +4 °C) фарфоровые ступки и растирали с добавлением кварцевого песка в 2 мл 100 %-ного ацетона. Полученный гомогенат центрифугировали как указано выше. Супернатант переносили в мерные пробирки, осадок ресуспендировали в 2 мл 100 %-ного ацетона и снова центрифугировали. Супернатант объединяли с предыдущим. Содержание хлорофилла *a*

и каротиноидов определяли с помощью ВЭЖХ согласно методикам, приведенным в работах [13] и [14], используя хроматограф Shimadzu LC 20 Prominence (Shimadzu, Япония) и колонки Nucleodur C18 Gravity длиной 150 мм и размером частиц 3 мкм (Macherey Nagel, Германия). Перед хроматографией объединенный супернатант, содержащий пигменты, еще раз центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g. Далее в стеклянные виалы вносили по 0,5 мл супернатанта и помещали их в камеру хроматографа. Отбираемый для анализа объем экстракта составлял 40 мкл. Хроматографию проводили при линейном градиенте подвижной фазы 100–0 % раствора А (90 % ацетонитрила с 9,9 % фильтрованной H₂O и 0,1 % триэтиламина) и 0–100 % этилацетата в течение 15 мин, затем при 100 % этилацетата в течение 3 мин, далее – при линейном градиенте подвижной фазы 0–100 % раствора А и 100–0 % этилацетата в течение 6 мин. Поток подвижной фазы составлял 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали детектором с диодной матрицей SPD-M20A Prominence (Shimadzu, Япония) по спектрам поглощения при длине волны от 200 до 700 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм. Площади пиков хроматограммы использовали для количественного определения виолаксантина, лютеина, β-каротина и хлорофилла *a* в биомассе спирулины.

Расчет содержания пигментов производили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = S_{440} F_{\text{пигм}} V / (V_{\text{инъекц}} m),$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг/г сухой массы; S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм; $F_{\text{пигм}}$ – коэффициент для расчета (табл. 2); V – суммарный объем экстракта; $V_{\text{инъекц}}$ – объем инъекции (40 мкл), m – сухая масса пробы, г.

Определение содержания фикоцианина в биомассе спирулины проводили согласно методике, описанной в работе [12]. Для этого осажденную путем центрифугирования и промытую дистиллированной водой биомассу водоросли растирали в ступке (без песка) в К-, Na-фосфатном буфере (50 мМ, рН 7,0). Полученный гомогенат выдерживали в холодильнике в течение 10 ч, затем центрифугировали 5 мин при 13 000 g. Супернатант спектрофотометрировали на приборе Uvikon 931 фирмы Kontron (Германия) при 615, 652 и 720 нм и рассчитывали содержание фикоцианина по формуле

$$C = (ОП_{615} - ОП_{720} - 0,474 (ОП_{652} - ОП_{720}))/5,34,$$

где ОП – оптическая плотность экстракта при длине волны 615, 652 и 720 нм соответственно.

В работе приведены средние значения трех независимых опытов и стандартные ошибки их среднего арифметического.

Результаты и их обсуждение. Анализ продуктивности спирулины после 7 сут выращивания на стандартной среде Заррука (контроль) и на среде Заррука с заменой 25, 50, 65 и 75 % NaHCO₃ на NaOH показал, что модификация среды культивирования не влияет на продуктивность водоросли (рис. 1).

При этом содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в биомассе спирулины во всех опытных вариантах достоверно не отличалось от контроля (рис. 2). В частности, содержание хлорофилла *a* при замене 25, 50, 65 и 75 % NaHCO₃ на NaOH в среде выращивания составило 104, 97, 102 и 103 % соответственно по отношению к контролю. Отличия от контроля по суммарному количеству каротиноидов составили –7, +2, –1 и +4 % при замене 25, 50, 65 и 75 % NaHCO₃ на NaOH. Уровни отдельных каротиноидов (виолаксантина, лютеина и β-каротина), зарегистрированные в опытных вариантах, практически не отличались от контроля (табл. 3).

Изучено содержание уникального для сине-зеленых водорослей фотосинтетического пигмента – фикоцианина, который является одним из наиболее сильных на сегодняшний день антиоксидантов, при частичной замене NaHCO₃ на NaOH в стандартной питательной среде Заррука [15].

Таблица 2. Коэффициенты для расчета содержания хлорофилла и каротиноидов

Table 2. Coefficients for calculation of chlorophyll and carotenoid contents

Пигмент	Коэффициент
Виолаксантин	44·10 ⁻⁹
Лютеин	45·10 ⁻⁹
Хлорофилл <i>a</i>	189·10 ⁻⁹
β-каротин	88·10 ⁻⁹

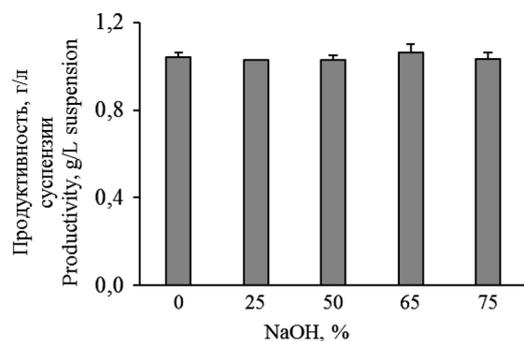


Рис. 1. Продуктивность спирулины при частичной замене NaHCO_3 на NaOH в среде культивирования

Fig. 1. Spirulina productivity in case of partial substitution of NaHCO_3 for NaOH in culture medium

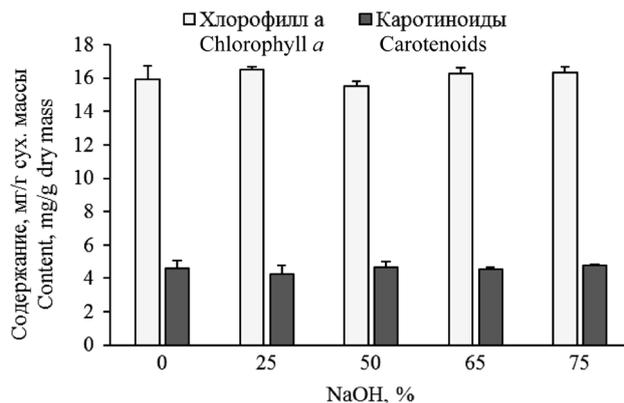


Рис. 2. Содержание хлорофилла a и каротиноидов в биомассе спирулины при частичной замене NaHCO_3 на NaOH в среде культивирования

Fig. 2. Chlorophyll and carotenoid contents in spirulina biomass in case of partial substitution of NaHCO_3 for NaOH in culture medium

Таблица 3. Содержание каротиноидов (мг/г сухой массы) в биомассе спирулины при частичной замене NaHCO_3 на NaOH в среде культивирования

Table 3. Carotenoid contents (mg/g dry mass) in spirulina biomass in case of partial substitution of NaHCO_3 for NaOH in culture medium

Вариант опыта	Виолаксантин	Лютеин	β -каротин
Контроль	$0,06 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,06$	$3,77 \pm 0,42$
25 % NaOH	$0,07 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,10$	$3,40 \pm 0,42$
50 % NaOH	$0,09 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,13$	$3,70 \pm 0,22$
65 % NaOH	$0,07 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,06$	$3,66 \pm 0,14$
75 % NaOH	$0,07 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,04$	$3,88 \pm 0,07$

Показано, что при замене 25, 50, 65 и 75 % NaHCO_3 на NaOH в питательной среде содержание фикоцианина в биомассе спирулины снижалось на 12, 5, 16 и 34 % соответственно по сравнению с контролем (рис. 3).

Точный механизм влияния модифицированной питательной среды, в которой NaHCO_3 заменен на NaOH , на содержание фикоцианина в биомассе водоросли остается неясным. Фикоцианин – это пигмент-белковый комплекс, который состоит из хромофора (фикобилина – линейного тетрапиррола) и водорастворимого белка. Известно, что линейные тетрапирролы синтезируются в водорослях в результате окислительного разрыва замкнутого порфиринового кольца гема [16], в основе которого лежит протопорфирин IX – общий предшественник гема и хлорофилла.

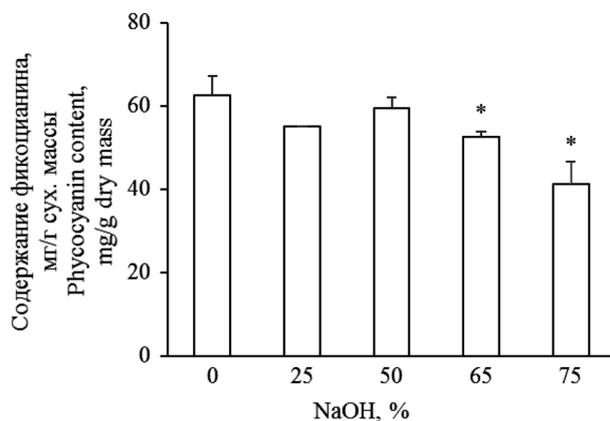


Рис. 3. Содержание фикоцианина в биомассе спирулины при частичной замене NaHCO_3 на NaOH в среде выращивания

Fig. 3. Phycocyanin contents in spirulina biomass in case of partial substitution of NaHCO_3 for NaOH in culture medium

Тот факт, что замена NaHCO_3 на NaOH в среде культивирования приводит к снижению уровня фикоцианина и при этом не влияет на количество хлорофилла a , позволяет сделать вывод о том, что в таких условиях происходит нарушение биосинтеза фикоцианина на этапах, следующих за образованием гема. Не исключено также влияние модификации питательной среды на синтез белка, участвующего в образовании фикоцианина.

Заключение. Таким образом, выращивание культуры в течение 7 сут на среде с заменой

25, 50, 65 и 75 % NaHCO_3 (4,2; 5,88; 8,4 и 12,6 г/л) на NaOH (0,05; 0,10; 0,13 и 0,15 г/л соответственно) в питательной среде не приводит к изменению продуктивности водоросли по сравнению с использованием стандартной питательной среды Заррука (контроль), содержащей 16,8 г/л NaHCO_3 . Показано, что в таких условиях содержание фотосинтетических пигментов – хлорофилла *a* и каротиноидов (виолаксантина, лютеина и β -каротина) в биомассе спирулины остается на уровне контроля. Установлено, что культивирование водоросли в модифицированной питательной среде приводит к снижению количества дополнительного фотосинтетического пигмента фикоцианина, являющегося сильным антиоксидантом. При замене 65–75 % NaHCO_3 на NaOH уменьшение уровня фикоцианина достигало 16 и 34 % соответственно относительно контроля. Необходимо отметить, что стоимость NaHCO_3 , используемой для приготовления 1 л питательной среды при культивировании спирулины, превышает стоимость требуемой для этих целей NaOH в 50 раз. Следовательно, любая частичная замена NaHCO_3 на NaOH позволит существенно снизить затраты на получение биомассы водоросли. Такая модифицированная среда может быть использована для получения биомассы спирулины в случаях, когда показателем ее качества служит содержание каротиноидов или хлорофилла *a*. Например, питательная среда с частичной заменой NaHCO_3 на NaOH может быть использована для получения биомассы спирулины как сырья для фармацевтической промышленности, когда биомасса водоросли выступает как источник хлорофилла *a* (другие пигменты рассматриваются как примесь), из которого затем получают хлорин e_6 – действующее вещество препарата фотодинамического действия, применяемого для лечения заболеваний глаз и некоторых онкологических заболеваний.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственной программы Республики Беларусь «Наукоёмкие технологии и техника» (грант № 33, 2016–2020 гг.).

Acknowledgments. This work was supported by the State Program of the Republic of Belarus “Science-intensive technologies and equipment”, grant no. 33 (2016–2020).

Список использованных источников

1. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina* / A. Belay [et al.] // J. of Appl. Phycology. – 1993. – Vol. 5. – P. 235–241.
2. Henrikson, R. Earth Food *Spirulina*: How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet / R. Henrikson. – California, USA : Ronore Interprises Inc., 1989. – 180 p.
3. Santillan, C. Mass production of *Spirulina* / C. Santillan // Experientia. – 1982. – Vol. 38, N 1/3. – P. 40–43.
4. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology / ed. A. Vonshak. – London : Taylor & Francis Ltd, 1997. – 233 p.
5. Мельников, С. С. Спирулина : справ. пособие в вопросах и ответах / С. С. Мельников ; ред. И. Д. Волотовский ; рец.: Л. Г. Емельянов, А. И. Заболотный ; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточной инженерии. – Минск : Право и экономика, 2005. – 51 с.
6. Zarrouk, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* : Ph. D. thesis / C. Zarrouk. – Paris, 1966. – 138 p.
7. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures / D. A. White [et al.] // J. of Appl. Phycology. – 2013. – Vol. 25. – P. 153.
8. Madkour, F. F. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media / F. F. Madkour, A. E. Kamil, H. S. Nasr // Egypt. J. of Aquatic Res. – 2012. – Vol. 38. – P. 51–57.
9. Pumas, P. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using low cost medium supplemented with lac wastewater / P. Pumas, C. Pumas // Chiang Mai J. of Sci. – 2016. – Vol. 43, N 5. – P. 1037–1047.
10. Cost-efficient cultivation of *Spirulina platensis* by chemical absorption of CO_2 into medium containing NaOH / J.-Y. Jung [et al.] // Korean J. of Chem. Engineering. – 2015. – Vol. 32. – P. 2285–2289.
11. Бородина, А. В. Способ культивирования *Spirulina (Arthrospira) platensis* / А. В. Бородина, И. Н. Гудвилевич // Экология моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 20–23.
12. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K. Sasaki [et al.] // J. of Fermentation and Bioengineering. – 1995. – Vol. 79, N 5. – P. 453–457.
13. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies / S. V. Milenković [et al.] // Advanced Technologies. – 2012. – Vol. 1. – P. 16–24.
14. Forni, E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas / E. Forni, M. Ghezzi, A. Polesello // Chromatography. – 2012. – Vol. 1. – P. 120–124.
15. C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects / C. Romay [et al.] // Curr. Protein and Peptide Sci. – 2003. – Vol. 4, N 3. – P. 207–216.
16. Avissar, Y. J. The common origins of the pigments of life – early steps of chlorophyll biosynthesis / Y. J. Avissar, P. A. Möberg // Photosynthesis Res. – 1995. – Vol. 44. – P. 221–242.

References

1. Belay A., Ota Y., Miyakawa K., Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of Applied Phycology*, 1993, vol. 5, pp. 235–241.
2. Henrikson R. *Earth Food Spirulina*. California, USA, Ronore Interprises Inc., 1989. 180 p.
3. Santillan C. Mass production of Spirulina. *Experientia*, 1982, vol. 38, no. 1/3, pp. 40–43.
4. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*, in Vonshak A. (ed.). London, Taylor & Francis Ltd, 1997. 233 p.
5. Mel'nikov S. S. *Spirulina: reference book of questions and answers*, in Volotovskii I. D. (ed.), National Academy of Sciences of Belarus, Institute of Biophysics and Cell Engineering. Minsk, Law and Economics, 2005. 51 p. (in Russian).
6. Zarrouk C. *Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima*. Ph. D. thesis. Paris, 1966. 138 p.
7. White D. A., Pagarette A., Rooks P., Ali S. T. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *Journal of Applied Phycology*, 2013, vol. 25, pp. 153–165.
8. Madkour F. F., Kamil A. E., Nasr H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2012, vol. 38, pp. 51–57.
9. Pumas P., Pumas C. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using low cost medium supplemented with lac wastewater. *Chiang Mai Journal of Science*, 2016, vol. 43, no. 5, pp. 1037–1047.
10. Jung J.-Y., Yang J.-W., Kim K., Hwang K.-T., Jung S. M., Kwon J. H. Cost-efficient cultivation of *Spirulina platensis* by chemical absorption of CO₂ into medium containing NaOH. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2015, vol. 32, pp. 2285–2289.
11. Borodina A. V., Gudvilovich I. N. Spirulina (*Arthrospira*) *platensis* cultivation method. *Ekologiya moria* [Sea ecology], 2005, rel. 70, pp. 20–23 (in Russian).
12. Sasaki K., Marquez F. J., Nishio N., Nagai S. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, vol. 79, no. 5, pp. 453–457.
13. Milenković S. V., Zvezdanović J. B., Anđelković T. D., Marković D. Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*, 2012, vol. 1, pp. 16–24.
14. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*, 2012, vol. 1, pp. 120–124.
15. Romay C., González R., Ledón N., Remirez D., Rimbau V. C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, 2003, vol. 4, no. 3, pp. 207–216.
16. Avissar Y. J., Möberg P. A. The common origins of the pigments of life – early steps of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, 1995, vol. 44, pp. 221–242. DOI: 10.1007/BF00048596

Информация об авторах

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

Мананкина Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: room454@mail.ru.

Гончарик Руслан Геннадьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rusgon@mail.ru.

Филипчик Елена Александровна – стажер мл. науч. сотрудника. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lenafil050494@mail.ru.

Шалыго Николай Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shalygo@ibp.org.by.

Information about the authors

Yauhen V. Viazau – Junior 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: viazau@yahoo.com.

Elena E. Manankina – 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: room454@mail.ru.

Ruslan G. Goncharik – Junior 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: rusgon@mail.ru.

Elena A. Filipchik – Junior researcher trainee. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lenafil050494@mail.ru.

Nikolai V. Shalygo – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shalygo@ibp.org.by.

ISSN 1029-8940 (print)
УДК 577.352.3; 577.112.7

Поступила в редакцию 19.07.2017
Received 19.07.2017

Г. П. Зубрицкая¹, А. С. Скоробогатова¹, Л. М. Лукьяненко¹,
Г. П. Горбенко², Е. И. Слобожанина¹

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Харьков, Украина

МЕМБРАННЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ И АЦЕТАТА СВИНЦА

Аннотация. Изучено влияние сочетанного воздействия на эритроциты человека полученных из лизоцима амилоидных фибрилл и ацетата свинца. Установлено, что комплексное воздействие этих двух компонентов на эритроциты приводит к снижению активности мембраносвязанных ферментов ацетилхолинэстеразы и NADH-метгемоглобинредуктазы, изменению микровязкости липидного бислоя мембран и усилению везикуляции эритроцитов. Полученные результаты свидетельствуют о более значительной модификации структурно-функционального состояния мембран эритроцитов при совместном воздействии амилоидных фибрилл и ионов свинца на эритроциты человека по сравнению с контролем.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, ацетат свинца, эритроцитарная мембрана, мембраносвязанные ферменты, флуоресцентные зонды

Для цитирования: Мембранные эффекты при сочетанном воздействии на эритроциты человека амилоидных фибрилл и ацетата свинца / Г. П. Зубрицкая [и др.] // Вест. Нац. Акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 13–20.

G. P. Zubritskaya¹, A. S. Skarabahatava¹, L. M. Lukyanenko¹, G. P. Gorbenko², E. I. Slobozhanina¹

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkov, Ukraine

MEMBRANE EFFECTS IN COMBINED IMPACT ON HUMAN ERYTHROCYTES OF AMYLOID FIBRILS AND LEAD IONS

Abstract. The effect of the combination of amyloid fibrils and lead acetate derived from lysozyme on human erythrocytes was studied. It was established that the complex effect of these two components on erythrocytes leads to a decrease in the activity of membrane-bound enzymes of acetylcholinesterase and NADH-methemoglobinreductase, a change in the microviscosity of the lipid bilayer of membranes, and an increase in the vesiculation of erythrocytes. The results indicate a more significant modification of the structural and functional state of erythrocyte membranes under the combined action of amyloid fibrils and lead ions on human erythrocytes compared with the control.

Keywords: amyloid fibrils, lead acetate, erythrocyte membrane, membrane-bound enzymes, fluorescent probes

For citation: Zubritskaya G. P., Skarabahatava A. S., Lukyanenko L. M., Gorbenko G. P., Slobozhanina E. I. Membrane effects in combined impact on human erythrocytes of amyloid fibrils and lead ions. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 13–20 (in Russian).

Введение. Известно, что многие заболевания человека, в частности болезни Альцгеймера и Паркинсона, сахарный диабет второго типа (инсулиннезависимый) и др. [1], связаны со структурными дефектами белков и отложением нерастворимых белковых фибрилл (амилоидов) в различных органах и тканях. Большинство белков, ассоциированных с развитием таких патологических состояний, способны образовывать фибриллярные агрегаты *in vitro* [2, 3].

Считается, что одним из ключевых факторов развития болезни Альцгеймера являются амилоидные отложения (экспериментально подтверждено участие ионов металлов в этом процессе). В исследованиях, проведенных *in vivo* на *Macaca mulatta*, показано, что у животных, которые в раннем возрасте получали обогащенную свинцом пищу, в старости образуются скопления бета-амилоидного белка в тканях головного мозга [4]. На основании этого авторы пришли к выводу о том, что воздействие свинца в раннем возрасте является эпигенетическим фактором риска развития нейродегенеративных заболеваний в будущем из-за его влияния на уровень экспрессии

генов и кодируемых ими белков. Установлено, что в лабораторных условиях ионы определенных металлов влияют на структуру и темпы роста фибрилл амилоидогенных белков [5]. Так, Cu^{2+} , Fe^{3+} и Co^{3+} способствуют образованию вторичной структуры α -синуклеина и значительно ускоряют образование фибрилл [3]. Исследования *in vitro* показали, что ионы металла могут выступать посредником при взаимодействии между амилоидными белками и мембранами [5].

Имеются данные о том, что в нейронных бляшках пациентов с болезнью Альцгеймера скапливаются Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} [5–7]. В связи с этим предполагается, что ионы металлов могут влиять на агрегацию и токсичность амилоидогенных белков [7].

Учитывая, что амилоидные структуры являются цитотоксичными [1–3], а механизмы клеточной токсичности амилоидных фибрилл остаются до сих пор не ясными, целью нашей работы являлось выявление особенностей модификации мембранотропной активности амилоидов ионами тяжелых металлов.

Материалы и методы исследования. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000 g в течение 5 мин, а затем трижды отмывали в 155 мМ растворе NaCl. Эритроцитарные мембраны (тени эритроцитов) выделяли по методу Доджа с сотр. [8].

Амилоидные структуры были получены из растворенного в 10 мМ HCl (pH 2,0) лизоцима куриного яйца (Fluka) по методу, приведенному в работе [9], при 65 °C в течение 7 сут при постоянном перемешивании. Образование амилоидных структур отслеживали с помощью специфического зонда тиофлавина T, интенсивность флуоресценции которого определяли ежедневно.

Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли спектрофотометрически по методу Элмана [10]. О везикуляции эритроцитов при их метаболическом истощении судили также по активности АХЭ в микровезикулах, находящихся в супернатантах после центрифугирования суспензии эритроцитов. Определение активности мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы (NADH-цитохром *b* редуктазы, диафоразы) проводили по скорости окисления NADH [11].

Оценку состояния липидного бислоя мембран эритроцитов осуществляли по параметрам флуоресценции липофильных зондов – 1-(4-триметиламмоний-фенил)-6-фенил-1,3,5-гексатриена *p*-толуенсульфоната (ТМА-ДФГ) и 6-додеканол-2-диметиламинонафтадена (лаурдана), встроенных в мембраны эритроцитов [12, 13]. Показатели зондовой флуоресценции мембран эритроцитов определяли на люминесцентном спектрофотометре CM2203 («Солар», Беларусь), спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord M-40 (Германия).

В работе использовали следующие реактивы: 1-(4-триметиламмоний-фенил)-6-фенил-1,3,5-гексатриен *p*-толуенсульфоната (ТМА-ДФГ), 2,2-динитро-5,5-дифенилпропановую кислоту (ДТНБ), ацетилхолинбромид, лизоцим куриного яйца фирмы Sigma (США); лаурдан фирмы Carl Roth (Германия); $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , NADH, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ фирмы «Реахим» (Россия).

Приведены средние значения 6–12 независимых экспериментов. Для анализа полученных результатов использовали метод вариационной статистики и параметрический критерий Стьюдента [14]. Статистически значимыми считали значения *p* менее 0,05. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение. Плазматические мембраны играют огромную роль как в структурной организации, так и в функционировании клеток, участвуя в осуществлении большинства жизненно важных функций. Мембрана эритроцитов человека чутко реагирует на внутренние и внешние сигналы и служит посредником в передаче регуляторных сигналов между клеткой и внешней средой, обеспечивая выполнение основной функции эритроцитов [15]. Одним из ферментов, характеризующих структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов, является мембраносвязанная АХЭ. Поскольку функциональные свойства АХЭ напрямую зависят от структурного состояния мембраны, показатель уровня ее активности используют в качестве структурного маркера для оценки различного рода модификаций мембранных компонентов под влиянием физико-химических факторов [16, 17].

Ранее нами показано, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл, происходит увеличение активности мембраносвязанной АХЭ (максимальной скорости реакции $V_{\text{макс}}$) по сравнению с таковой в клетках, обработанных лизоцимом, что свидетельствует

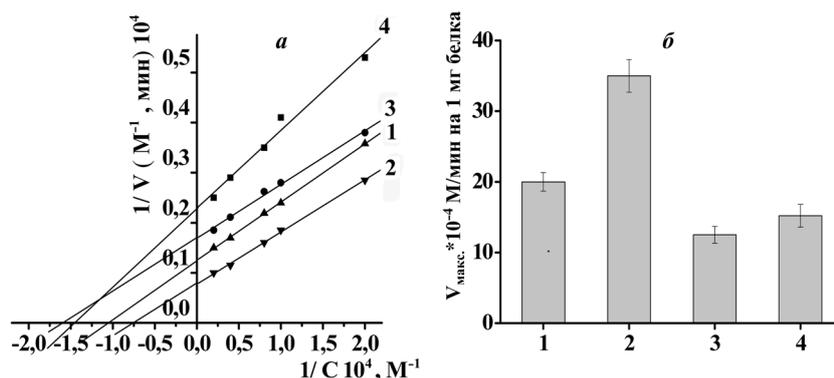


Рис. 1. Кривые зависимости Лайнуивера–Берка для ацетилхолинэстеразы (а) и среднее значение активности ацетилхолинэстеразы (V_{max}) в мембранах, полученных из эритроцитов человека, обработанных амилоидными структурами и ацетатом свинца (b): 1 – контроль (мембраны, выделенные из интактных эритроцитов); 2 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур в течение 3 ч; 3 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации в течение 3 ч в среде, содержащей 5 мкМ ацетата свинца; 4 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации с полученными из лизоцима амилоидными структурами и 5 мкМ ацетата свинца в течение 3 ч

Fig. 1. Relations Lineweaver–Burk for acetyl cholinesterase (a) and mean observation activity of acetyl cholinesterase (V_{max}) in membranes taken from human erythrocytes treated with amyloid structures and lead acetate (b): 1 – control (membranes isolated from intact erythrocytes); 2 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloid structures for 3 h; 3 – membranes isolated from erythrocytes exposed by 5 μM of lead acetate for 3 h; 4 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloid structures from lysozyme and 5 μM of lead acetate for 3 h

об изменении структурно-функционального состояния мембран эритроцитов после предварительного воздействия на клетки амилоидных фибрилл [18].

В литературе отсутствуют сведения о сочетанном влиянии амилоидных структур и ионов тяжелых металлов на активность мембраносвязанных ферментов. Поэтому нами изучено влияние белковых олигомеров, полученных из лизоцима, и ацетата свинца на активность АХЭ и метгемоглобинредуктазы.

На рис. 1, а представлены кривые зависимости Лайнуивера–Берка для мембран, выделенных из нативных эритроцитов (кривая 1), а также эритроцитов, обработанных амилоидными структурами (кривая 2), 5 мкМ ацетата свинца (кривая 3) и совместно амилоидными структурами и 5 мкМ ацетата свинца (кривая 4). Обнаружено, что предварительная инкубация эритроцитов человека с 5 мкМ ацетата свинца и белковыми олигомерами в течение 3 ч при 37 °С вызывает изменение параметров активности АХЭ в полученных из них мембранах. Так, наблюдалось значительное снижение среднего значения V_{max} по сравнению с аналогичным показателем в мембранах, полученных из клеток, предварительно проинкубированных 3 ч только с амилоидными структурами и 5 мкМ ацетата свинца (рис. 1, b).

Известно, что, присутствуя в клетке, свинец снижает цитозольную концентрацию АТФ. При воздействии в течение 24 ч ионов свинца на эритроциты *in vitro* провоцируется энергетическое истощение последних, что также приводит к сокращению продолжительности жизни и в итоге – к эриптозу [19]. При свинцовом отравлении также снижается количество NADH и NADP. Кроме того, в зрелых эритроцитах ионы свинца снижают активность 5'-нуклеотидазы [20].

В эритроцитах процессам метгемоглинообразования противостоит система ферментов – метгемоглобинредуктаз, которые восстанавливают метгемоглобин до гемоглобина. Дисбаланс в антиоксидантной системе эритроцитов приводит к снижению активности метгемоглобинредуктазы, что может вызывать усиление накопления метгемоглобина внутри мембран, образования телец Гейнца и приводить к гемолизу [21].

Ранее нами показано, что активность NADH-метгемоглобинредуктазы в мембранах, изолированных из эритроцитов, проинкубированных в течение 3 ч с 2–10 мкМ ацетата свинца, практически не изменялась по сравнению с нормой [22]. Кроме того, по результатам экспериментов, проведенных на эритроцитах человека, подверженных влиянию амилоидных структур *in vitro*, не выявлено изменения концентрации мембраносвязанного метгемоглобина [23].

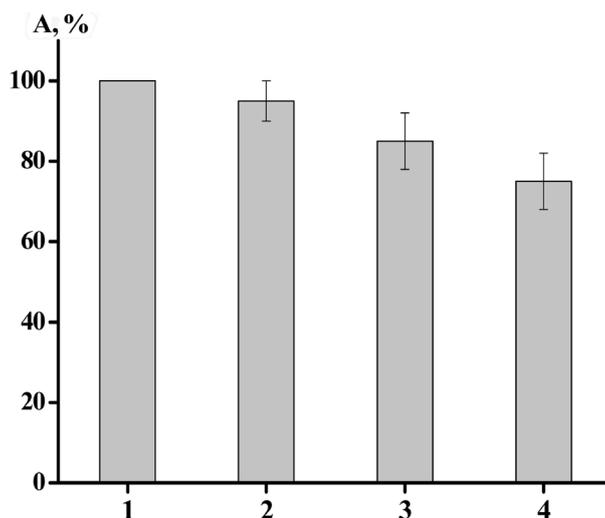


Рис. 2. Активность мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы (A, %) в эритроцитах, обработанных амилоидными структурами и ацетатом свинца: 1 – контроль (мембраны, выделенные из интактных эритроцитов); 2 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур в течение 3 ч; 3 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации в течение 3 ч в среде, содержащей 5 мкМ ацетата свинца; 4 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации в течение 3 ч в среде, содержащей амилоидные структуры и 5 мкМ ацетата свинца. За 100 % принято среднее значение активности фермента в интактных эритроцитах

Fig. 2. Activity of membrane bond NADH-methemoglobin reductase (A, %) in erythrocytes exposed by amyloid structures and lead acetate: 1 – control (membranes isolated from intact erythrocytes); 2 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloids structures for 3 h; 3 – membranes isolated from erythrocytes exposed by 5 μM of lead acetate for 3 h; 4 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloids structures and 5 μM of lead acetate for 3 h. 100 % is mean observation of enzyme activity in intact erythrocytes

Установлено, что предварительная инкубация эритроцитов человека с 5 мкМ ацетата свинца и амилоидными фибриллами в течение 3 ч при 37 °С, а также предварительная инкубация эритроцитов с 5 мкМ ацетата свинца в течение того же времени снижала активность мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы по сравнению с таковой у эритроцитов, обработанных только амилоидами (рис. 2).

Полученные результаты позволяют заключить, что воздействие амилоидных фибрилл в сочетании с субгемолитическими концентрациями ионов свинца на эритроциты человека *in vitro* нарушает структурно-функциональное состояние их мембран, что отражается в снижении активности мембраносвязанных ферментов.

Известно, что в условиях метаболического истощения от мембраны эритроцитов отделяются содержащие белок полосы 3 бесспектриновые везикулы, о количестве которых можно судить по активности АХЭ в супернатантах, полученных после осаждения клеток [24]. В зависимости от природы действующего на эритроциты агента скорость отделения от клеток мембранного материала, размер, форма и химический состав везикул сильно варьируются. Везикуляцию можно рассматривать как следствие изменения физико-химического состояния мембранных белков, вызванного в первую очередь окислением тиоловых групп белков свинцом и, возможно, изменением взаимодействия окисленного гемоглобина с мембраной.

Ранее нами показано, что выдерживание эритроцитов в безглюкозной среде, содержащей ацетат свинца в субгемолитических концентрациях, приводит к повышению скорости отделения от клеток микровезикул по сравнению с контролем [22]. Кроме того, установлено, что после 48-часового выдерживания клеток в безглюкозной среде уровень везикуляции эритроцитов, подвергшихся воздействию полученных из лизоцима амилоидных структур, на 25–30 % выше по сравнению с его уровнем у эритроцитов, предварительно проинкубированных с раствором лизоцима [25].

Как видно из рис. 3, предварительная инкубация эритроцитов человека в течение 48 ч в присутствии амилоидных фибрилл и ацетата свинца (5 мкМ) ускоряет везикуляцию эритроцитов по сравнению с таковой у эритроцитов, подвергшихся воздействию только амилоидов или ацетата свинца, что указывает на наличие различий в скорости отделения от мембран микровезикул при сочетанном воздействии субгемолитических концентраций ацетата свинца и амилоидов.

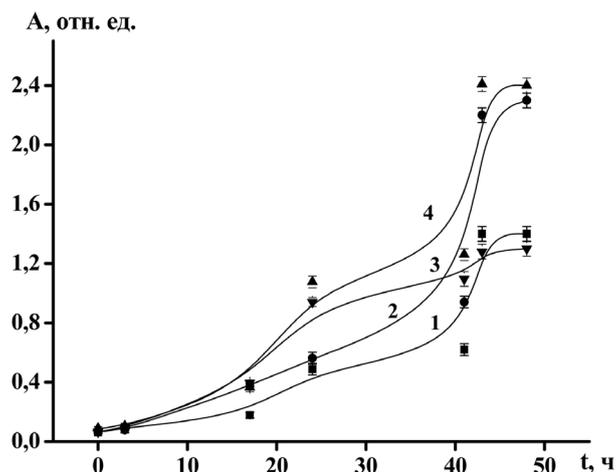


Рис. 3. Зависимость активности АХЭ (А, отн. ед.) в супернатантах, полученных после осаждения проинкубированных в различных средах эритроцитов, от времени выдерживания их в безглюкозной среде: 1 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4 (контроль); 2 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащем 5 мкМ ацетата свинца, затем эритроциты отмыты и повторно суспензированы в этом же буфере; 4 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащем белковые олигомеры и 5 мкМ ацетата свинца, затем эритроциты отмыты и повторно суспензированы в этом же буфере

Fig. 3. Relationship of activity AChE (A, r. u.) from time of incubation in medium without glucose in supernatants, which was taken after precipitation of erythrocytes previously, incubated in different solutions: 1 – 10 %-suspension of erythrocytes preliminary exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 for 3 h (control); 2 – 10 %-suspension of erythrocytes exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing amyloid structures from lysozyme for 3 h, after washed and again resuspended in these buffer; 3 – 10 %-suspension of erythrocytes exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 5 μM lead acetate for 3 h, after washed and again resuspended in these buffer; 4 – 10 %-suspension of erythrocytes exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing amyloid structures from lysozyme and 5 μM lead acetate for 3 h, after washed and again resuspended in these buffer

Известно, что физико-химическое состояние компонентов клеточных мембран и происходящие в них процессы часто играют важную роль в формировании ответа клетки на действие токсического агента. Имеющиеся в литературе данные о действии свинца на клетки свидетельствуют о том, что клеточная мембрана является одной из главных мишеней повреждающего действия свинца и других тяжелых металлов [15, 22, 26].

Ранее нами установлено, что полученные из лизоцима амилоидные структуры вызывают изменение параметров флуоресценции липидных зондов – генерализованную поляризацию

Флуоресцентные параметры ТМА-ДФГ и лаурдана, включенных в изолированные из эритроцитов мембраны, после инкубации их с амилоидными фибриллами и ионами свинца в течение 3 ч при 37 °С

Parameters of fluorescence TMA-DPH and laurdan incorporated into erythrocyte membranes isolated after incubation with amyloid fibrils and lead ions for 3 h under 37 °C

Серия экспериментов (среда инкубации эритроцитов)	ТМА-ДФГ	Лаурдан
	<i>p</i>	GP, отн. ед.
Контроль (мембраны выделены из интактных эритроцитов)	0,42 ± 0,02	0,33 ± 0,007
Мембраны выделены из эритроцитов, подвергшихся инкубации с амилоидными структурами в течение 3 ч	0,46 ± 0,03	0,35 ± 0,009
Мембраны выделены из эритроцитов, подвергшихся инкубации с 5 мкМ ацетата свинца в течение 3 ч	0,4 ± 0,04	0,34 ± 0,01
Мембраны выделены из эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур и 5 мкМ ацетата свинца в течение 3 ч	0,32 ± 0,03*	0,27 ± 0,008*

Примечание. * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

флуоресценции лаурдана и поляризацию ТМА-ДФГ, встроенных в изолированные мембраны эритроцитов, по сравнению с таковыми в мембранах клеток, предварительно проинкубированных с раствором лизоцима [27, 28].

Обнаружено, что предварительная инкубация эритроцитов человека с амилоидными структурами и субгемолитическими концентрациями ацетата свинца (5 мкМ) в течение 3 ч при 37 °С вызывает достоверное снижение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ и генерализованной поляризации флуоресценции лаурдана, встроенных в мембраны эритроцитов, по сравнению с таковой в клетках, обработанных только амилоидными структурами или ацетатом свинца в тех же условиях (см. таблицу).

Заключение. Полученные результаты позволяют заключить, что по сравнению с действием отдельно амилоидов или ионов тяжелых металлов сочетанное воздействие ионов свинца и амилоидных структур на эритроциты человека *in vitro* усиливает модификацию физического состояния липидного бислоя мембран, а также их структурно-функционального состояния, проявляющегося в изменении активности мембраносвязанных ферментов – ацетилхолинэстеразы и метгемоглибинредуктазы, в повышении количества отделившегося от эритроцитов части мембранного материала. Аналогичные процессы могут происходить и *in vivo* при патологических состояниях, связанных с образованием амилоидных белков, и в случаях повышения концентрации ионов свинца в организме.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б13-К115).

Acknowledgements. Work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Project no. B13-K115).

Список использованных источников

1. Нижников, А. А. От патогенеза к функции / А. А. Нижников, К. С. Антонец, С. Г. Инге-Вечтамов // Биохимия. – 2015. – Т. 80, вып. 9. – С. 1356–1375.
2. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology / M. Neumann [et al.] // Brain. – 2009. – Vol. 32, pt. 11. – P. 2922–2931.
3. Greenwald, J. Biology of amyloid: structure, function, and regulation / J. Greenwald, R. Riek // Structure. – 2010. – Vol. 18, N 10. – P. 1244–1260.
4. Bihaghi, S. W. Enhanced tauopathy and AD-like pathology in aged primate brains decades after infantile exposure to lead (Pb) / S. W. Bihaghi, N. H. Zawia // Neurotoxicology. – 2013. – Vol. 39. – P. 95–101.
5. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking / B. Huang [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – P. 794–800.
6. Amyloid- β peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions / T. L. Lau [et al.] // J. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 356, N 3. – P. 759–770.
7. Duce, J. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics / J. Duce, A. Bush // Prog. Neurobiol. – 2010. – Vol. 92, N 1. – P. 1–18.
8. Dodge, G. T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes / G. T. Dodge, C. Mitchell, D. J. Hanahan // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – Vol. 100. – P. 119–130.
9. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking / Bo Huang [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – P. 5794–5800.
10. Erythrocyte membrane AChE, Na⁺, K⁺-ATPase and Mg²⁺ ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery / D. G. Vlachos [et al.] // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2010. – Vol. 70, N 8. – P. 568–574.
11. Papandreou, P. Determination of NADH2-ferricyanide oxidoreductase (cytochrome b5 reductase, diaphorase) activity of human erythrocytes by an analysis of the time-dependence of NADH2 oxidation / P. Papandreou, E. T. Rakitzis // Clin. Chim. Acta. – 1989. – Vol. 181, N 2. – P. 189–196.
12. Is the glutathione S-conjugate pump a flippase? / A. Sokal [et al.] // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1998. – Vol. 44, N 1. – P. 97–105.
13. Harris, F. M. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order / F. M. Harris, K. B. Best, J. D. Bell // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – Vol. 1565. – P. 123–128.
14. Гланц, С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
15. Lead induced changes in human erythrocytes and lymphocytes / E. I. Slobozhanina [et al.] // J. of Appl. Toxicol. – 2005. – Vol. 25, N 2. – P. 109–114.
16. Aloni, B. Acetylcholinesterase as a probe for erythrocyte membrane intactness / B. Aloni, A. Livne // Biochim. Biophys. Acta. – 1974. – Vol. 339. – P. 359–366.
17. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами : учеб. пособие / В. Г. Артюхов, М. А. Наваксина. – Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та. – 2000. – 296 с.

18. Зубрицкая, Г. П. Биофизические характеристики клеток крови и биологических жидкостей как показатели патологических состояний человека : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.01.02 / Г. П. Зубрицкая ; Ин-т биофизики и клеточ. инженерии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2016. – 26 с.
19. Baranowska-Bosiacka, I. The effect of lead ions on the energy metabolism of human erythrocytes *in vitro* / I. Baranowska-Bosiacka, A. J. Hlynczak // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 134, N 6. – P. 403–416.
20. Grabowska, M. The effect of lead on lactate formation, ATP level and membrane ATPase activities in human erythrocytes *in vitro* / M. Grabowska, M. Gumińska // *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* – 1996. – Vol. 9, N 3. – P. 265–274.
21. Hjelt, K. Methemoglobinaemia among neonates in neonatal intensive care unit / K. Hjelt, J. T. Lung, B. Scherling // *Acta Paediatr.* – 1995. – Vol. 84, N 4. – P. 365–370.
22. Олексюк, О. Б. Мембранные механизмы действия свинца в субгемолитических концентрациях на эритроциты человека : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.00.02 / Олексюк О. Б. ; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточ. инженерии. – Минск, 2004. – 22 с.
23. Взаимодействие фибриллярного лизоцима с гемоглобином и мембранными белками эритроцитов / О. К. Куценко [и др.] // Актуальные проблемы химии и биологии : [всерос. молодеж. конф., 30 июля – 3 авг. 2012 г., Пущино] : сб. тез. / Пущин. науч. центр Рос. акад. наук, Ин-т ПНЦ, Тюмен. гос. ун-т. – Пущино, 2012. – С. 91–92.
24. Козлова, Н. М. Окисление мембранных белков и изменение поверхностных свойств эритроцитов / Н. М. Козлова, Е. И. Слободжанина, Е. А. Черницкий // *Биофизика.* – 1998. – Т. 43, № 3. – С. 480–483.
25. Влияние амилоидных структур на везикуляцию эритроцитов человека / Л. М. Лукьяненко [и др.] // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы X Междунар. конф., 6–7 апр. 2012 г., Минск / М-во образования Респ. Беларусь, Белорус. гос. ун-т ; [В. А. Прокашева (отв. ред.) и др.] – Минск, 2012. – С. 185–188.
26. Куценко, С. А. Основы токсикологии / С. А. Куценко. – М. : Фолиант, 2004. – 570 с.
27. Fluorescence study of the membrane effects of aggregated lysozyme / O. K. Kutsenko [et al.] // *J. Fluorescence.* – 2013. – Vol. 23, N 6. – P. 1229–1237.
28. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов / Л. М. Лукьяненко [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 9–13.

References

1. Nizhnikov A. A., Antonets K. S., Inge-Vechtamov S. G. From pathogenesis to function. *Biokhimiia* [Biochemistry], 2015, vol. 80, no. 9, pp. 1356–1375 (in Russian).
2. Neumann M., Rademakers R., Roeber S., Baker M., Kretzschmar H. A., Mackenzie I. R. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain: a Journal of Neurology*, 2009, vol. 32, pt. 11, pp. 2922–2931. DOI: 10.1093/brain/awp214
3. Greenwald J., Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Journal of Structure*, 2010, vol. 18, no. 10, pp. 1244–1260. DOI: 10.1016/j.str.2010.08.009
4. Bihagi S. W., Zawia N. H. Enhanced tauopathy and AD-like pathology in aged primate brains decades after infantile exposure to lead (Pb). *Neurotoxicology*, 2013, vol. 39, pp. 95–101. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.07.010
5. Huang B. L., He J., Ren J., Yan X. Y., Zeng C. M. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, pp. 794–800.
6. Lau T. L., Ambroggio E. E., Tew D. J., Cappai R., Masters C. L., Fidelio G. D., Barnham K. J., Separovic F. Amyloid- β peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *Journal of Molecular Biology*, 2006, vol. 356, no. 3, pp. 759–770.
7. Duce J., Bush A. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, 2010, vol. 92, no. 1, pp. 1–18.
8. Dodge G. T., Mitchell C., Hanahan D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1963, vol. 100, pp. 119–130.
9. Huang Bo, He Jing, Ren Jing, Yan Xiang-Yang, Zeng Cheng-Ming. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 25, pp. 5794–5800.
10. Vlachos D. G., Schulpis K. H., Antsaklis A., Mesogitis S., Biliatis I., Tsakiris S. Erythrocyte membrane AChE, Na⁺, K⁺-ATPase and Mg²⁺ ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 2010, vol. 70, no. 8, pp. 568–574.
11. Papandreou P., Rakitzis E. T. Determination of NADH2-ferricyanide oxidoreductase (cytochrome b5 reductase, diaphorase) activity of human erythrocytes by an analysis of the time-dependence of NADH2 oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 1989, vol. 181, no. 2, pp. 189–196.
12. Sokal A., Pułaski L., Rychlik B., Fortuniak A., Bartosz G. Is the glutathione S-conjugate pump a flippase? *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, vol. 44, no. 1, pp. 97–105.
13. Harris F. M., Best K. B., Bell J. D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, vol. 1565, pp. 123–128.
14. Glants S. *Medico-biological statistics*, Translated from English. Moscow, Praktika Publ., 1998. 459 p. (in Russian).
15. Slobozhanina E. I., Kozlova N. M., Lukyanenko L. M., Oleksiuk O. B., Gabbianelli R., Fedeli D., Caulini G. C., Falcioni G. Lead induced changes in human erythrocytes and lymphocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 2005, vol. 25, no. 2, pp. 109–114. DOI: 10.1002/jat.1043
16. Aloni B., Livne A. Acetylcholinesterase as a probe for erythrocyte membrane intactness. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1974, vol. 339, pp. 359–366.

17. Artukhov V. G., Navaksina M. A. *Biological membranes: structural organization, functions, modification by physico-chemical agents*. Voronezh, Publishing house of Voronezh State University, 2000. 296 p. (in Russian).
18. Zubritskaya G. P. *Biophysical parameters of blood cells and biological fluids as indicators of human pathological states*, Abstract of Ph. D. diss., Biophysics, Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus. Minsk, 2016. 26 p. (in Russian).
19. Baranowska-Bosiacka I., Hlynchak A. J. The effect of lead ions on the energy metabolism of human erythrocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 2003, vol. 134, no. 3, pp. 403–416.
20. Grabowska M., Gumińska M. The effect of lead on lactate formation, ATP level and membrane ATPase activities in human erythrocytes *in vitro*. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental*, 1996, vol. 9, no. 3, pp. 265–274.
21. Hjelt K., Lung J. T., Scherling B. Methemoglobinemia among neonates in neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica*, 1995, vol. 84, no. 4, pp. 365–370.
22. Oleksiuk O. B. *Membrane mechanisms of action of lead in subhemolytic concentrations on human erythrocytes*, Abstract of Ph. D. diss., Biological Sciences, Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus. Minsk, 2004. 21 p. (in Russian).
23. Kutsenko O. K., Trusova V. M., Gorbenko G. P., Zubritskaya G. P., Lukyanenko L. M., Slobozhanina E. I. Interaction of fibrillary lysozyme with hemoglobin and membrane proteins of erythrocytes. *Aktual'nye problemy khimii i biologii: [vserossiiskaia molodezhnaia konferentsiia] : sbornik tezisov* [Actual problems of chemistry and biology: All-Union Youth Conference: a collection of abstracts], Pushchino Research Center of the Russian Academy of Sciences. Pushchino, Institute of PSC, Tyumen State University, 2012, pp. 91–92 (in Russian).
24. Kozlova H. M., Slobozhanina E. I., Chernitskiy E. A. Oxidation of membrane proteins and changes in surface properties of erythrocytes. *Biofizika* [Biophysics], 1998, vol. 43, no. 3, pp. 480–483 (in Russian).
25. Lukyanenko L. M., Zubritskaya G. P., Venskaya E. I., Slobozhanina E. I. Influence of amyloid structures on the vesiculation of human erythrocytes. *Mediko-sotsial'naya ekologiya lichnosti: sostoianie i perspektivy: materialy X Mezhdunarodnoi konferentsii* [Mediko-social ecology of the person: a condition and prospects: materials of X international conference], Ministry of Education of the Republic of Belarus, Belarusian State University, in Prokasheva V. A. (ed.) et al. Minsk, 2012, pp. 185–188 (in Russian).
26. Kutsenko S. A. *Fundamentals of Toxicology*. Moscow, Foliant Publ., 2004. 570 p. (in Russian).
27. Kutsenko O. K., Trusova V. M., Gorbenko G. P., Lipovaya A. S., Slobozhanina E. I., Lukyanenko L. M., Deligeorgiev T., Vasilev A. Fluorescence study of the membrane effects of aggregated lysozyme. *Journal of Fluorescence*, 2013, vol. 23, no. 6, pp. 1229–1237. DOI: 10.1007/s10895-013-1254-2
28. Lukyanenko L. M., Zubritskaya G. P., Venskaya E. I., Skorobogatova A. S., Kut'ko A. G., Slobozhanina E. I. The effect of amyloids on the physical and chemical state of the lipid bilayer of erythrocyte membranes. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Biomedical Sciences], 2013, vol. 7, no. 1, pp. 9–13 (in Russian).

Информация об авторах

Зубрицкая Галина Петровна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: petro371@mail.ru.

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

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

Горбенко Галина Петровна – д-р физ.-мат. наук, профессор. Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина (майдан Свободы, 4, 61000, г. Харьков, Украина). E-mail: galyagor@yahoo.com.

Слобозханина Екатерина Ивановна – член-корреспондент, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: slobozhanina@ibp.org.by.

Information about the authors

Galina P. Zubritskaya – 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: petro371@mail.ru.

Aliaksandra S. Skarabahatava – 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: sas.alesya@gmail.com.

Lyudmila M. Lukyanenko – Ph. D. (Biol.), Deputy Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). lukyanenko@gmail.com.

Galina P. Gorbenko – D. Sc. (Phys. and Math.), Professor. V. N. Karazin Kharkiv National University (4, Maydan of Freedom, 61000, Kharkov, Ukraine). galyagor@yahoo.com.

Ekaterina I. Slobozhanina – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: slobozhanina@ibp.org.by.

**Н. Г. АВЕРИНА, Р. А. ЩЕРБАКОВ, Н. В. КОЗЕЛ, Е. Е. МАНАНКИНА,
Р. Г. ГОНЧАРИК, Н. В. ШАЛЫГО**

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

**ВЛИЯНИЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ
НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ
ВОДОРΟΣЛИ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

Аннотация. Изучено влияние экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) на продуктивность водоросли *Haematococcus pluvialis*, оцениваемой по таким показателям, как сухой вес, количество и размер клеток, а также содержание белка и фотосинтетических пигментов. Выращивание водоросли на среде Рудика с добавлением экзогенной АЛК стимулировало накопление сухой биомассы гематококка в период активного роста водоросли по сравнению как с контрольной культурой, выращиваемой без АЛК, так и с исходной. За 2 сут инкубации гематококка с АЛК в концентрации 10 мг/л сухая биомасса выросла в среднем на 31 % по отношению к таковой в исходной культуре и на 17 % по сравнению с контролем. В вариантах с использованием АЛК отмечено дозозависимое повышение содержания клеток водоросли в среднем на 26 % и уменьшение их диаметра на 15 % по сравнению с этими показателями в контрольной культуре. В 7-суточной культуре во всех вариантах опыта при добавлении АЛК повышалось содержание фотосинтетических пигментов и белка. Так, при расчете на 1 г сухого вещества содержание хлорофиллов *a*, *b* и β -каротина при использовании всех концентраций АЛК превысило контрольные значения в среднем на 37, 37 и 58 %, а ксантофиллов – неоксантина, виолаксантина и лютеина – на 31, 30 и 47 % соответственно. При этом содержание белка возросло в среднем на 20–73 %. После 12 сут инкубации эффективность действия АЛК снижалась при сохранении отмеченной выше тенденции. При обсуждении результатов учитывалось влияние экзогенной АЛК на синтез эндогенных цитокининов и стимуляцию последними роста и развития клеток водоросли, а также на формирование пигментного аппарата фотосинтеза.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, 5-аминолевулиновая кислота, сухой вес, количество и размер клеток, белок, фотосинтетические пигменты

Для цитирования: Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на продуктивность и пигментный состав водоросли *Haematococcus pluvialis* / Н. Г. Аверина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 21–32.

N. G. Averina, R. A. Sherbakov, N. V. Kozel, E. E. Manankina, R. G. Goncharik, N. V. Shalygo

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

**INFLUENCE OF 5-AMINOLEVULINIC ACID ON THE PRODUCTIVITY
AND PIGMENT COMPOSITION OF ALGAE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

Abstract. Influence of exogenous 5-aminolevulinic acid (ALA) on the algae *Haematococcus pluvialis* productivity – dry weight, number and size of cells as well as proteins and photosynthetic pigment content has been studied. Growing of algae cells in Rudic's medium with supplementation of ALA (0.5; 5; 10; 20 and 30 mg/l) stimulated accumulation of cell dry weight during active algae growth as compared with control cells as well as with initial algae culture. So, for two days of algae incubation with ALA 10 mg/l the dry weight increased by an average of 31 % in relation to initial culture and by 17 % in relation to control. A dose-dependent increase in content of cell number by an average of 26 % and decrease of cell diameter by 15 % was registered in "ALA" variants as compared with these characteristics in control. After 7 days of incubation with ALA content of the photosynthetic pigments and proteins increased. So, content of chlorophylls *a*, *b* and β -carotene per g of dry matter exceeded the control values by 37, 37 and 58 %, respectively. For xanthophylls such as neoxanthin, violaxanthin and lutein – by 31, 30 and 47 %, respectively. While the protein content on average increased by 20–73 %. After 12 days of incubation, the effectiveness of ALA decreased while maintaining the above trend. The results are discussed from the position of using exogenous ALA in the synthesis of endogenous cytokinins that stimulated the growth and development of algal cells, as well as the formation of the pigmentary apparatus of photosynthesis.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, 5-aminolevulinic acid, dry weight, number and size of cells, protein, photosynthetic pigments

For citation: Averina N. G., Sherbakov R. A., Kozel N. V., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Influence of 5-aminolevulinic acid on the productivity and pigment composition of algae *Haematococcus pluvialis*. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 21–32 (in Russian).

Введение. Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) является одним из наиболее перспективных натуральных источников кетокаротиноида астаксантина (β,β -каротин-3,3'-дигидро-4,4'-диона) – красного пигмента, широко используемого в сельском хозяйстве, пищевой, фармакологической промышленности, а также в косметологии благодаря его чрезвычайно высокой антиоксидантной активности, которая в определенных условиях значительно превышает таковую β -каротина и витамина Е [1, 2]. В клетках *H. pluvialis* содержание астаксантина составляет от 2 до 5 % от сухой массы водоросли [3, 4]. Химически синтезированный искусственный астаксантин, представляющий смесь из трех стереоизомеров, отличается от натурального структурно и обладает гораздо меньшей биоактивностью, чем натуральный пигмент [5–7]. Значительно возросший в последние годы интерес к *H. pluvialis* связан с его промышленным производством, поиском способов увеличения общей продуктивности и выхода астаксантина, а также с желанием познать природу механизмов, контролирующих эти процессы.

В нормальных условиях клетки гематококка имеют зеленую окраску и достаточно подвижны. Однако при попадании в неблагоприятные, стрессовые условия они прекращают рост, превращаясь в неподвижные цисты, и начинают накапливать астаксантин для защиты от внутриклеточного окислительного потенциала, повышение которого обусловлено индуцированным стрессом. При этом клетки водоросли приобретают насыщенный красный цвет.

Один из методов повышения выхода астаксантина является сначала максимальное увеличение скорости роста культуры водоросли с целью достижения ее высокой продуктивности, а затем создание условий для перехода клеток к состоянию покоя и накоплению астаксантина [8].

В литературе описано использование физиологически активных соединений, таких как цитокинины, ауксины, брассиностероиды, с целью увеличения продуктивности *H. pluvialis* [9–11]. Ранее нами было показано, что экзогенная 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) – предшественник всех циклических (хлорофиллов (Хл), гемов, корриноидов) и линейных (билинов, фикобилинов) тетрапирролов, которые играют центральную роль в метаболизме растительных, животных и бактериальных организмов, – проявляет свойства регулятора роста растений и антистрессора [12–14]. Кроме того, установлено, что в основе росторегулирующих и защитных свойств АЛК лежит ее способность индуцировать накопление эндогенных цитокининов [15], пролина [16], стабилизировать белковый метаболизм [14], усиливать ассимиляцию неорганического азота путем стимуляции экспрессии гена нитратредуктазы [17], а также увеличивать активность защитных ферментов [14]. Положительное действие АЛК оказывает и на водоросли. Так, добавление 3 мМ АЛК в культуральную среду для выращивания клеток *Spirulina platensis* стимулировало синтез Хл и фикоцианина, усиливало рост клеток водоросли и увеличивало их фотосинтетическую активность [18]. Имеется единственная публикация [19], в которой описывалось положительное воздействие экзогенной АЛК (0,3 мг/л) на рост водоросли *H. pluvialis*, а кроме того, отмечалось, что АЛК ограничивает накопление астаксантина в клетках водоросли.

Цель данной работы – теоретическое и практическое обоснование возможности применения экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты при выращивании водоросли *H. pluvialis* с целью повышения ее продуктивности, оцениваемой по таким показателям, как сухой вес, количество и размер клеток, содержание белка, фотосинтетических пигментов – Хл *a*, *b* и каротиноидов.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм ИВСЕ Н-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [20]. Клетки гематококка, эллипсоидные или удлинненно-яйцевидные, с гладкой оболочкой и двумя жгутиками, стерильно пересевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ВВМ [21], состав которой приведен в табл. 1. Чашки выносили на свет и подращивали культуру гематококка в течение 5–7 сут при температуре 23 ± 2 °С. После этого клетки водоросли смывали с чашек стерильной средой Рудика [22] (табл. 1) в стерильные стеклянные колбы объемом 250–300 мл, где с целью накопления их выращивали в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре в световом периоде 23 ± 2 °С, используя люминесцентные лампы Philips TD-36/765 с освещенностью 2000 лк.

Таблица 1. Составы питательной среды BBM [21] и среды Рудика [22]
 Table 1. Compositions of the BBM nutrient medium [21] and the Rudic's medium [22]

Среда BBM				Среда Рудика			
Макроэлементы		Микроэлементы, мг/л		Макроэлементы, г/л		Микроэлементы, мг/л	
NaNO ₃ , г/л	0,25	H ₃ BO ₃	2,86	NaNO ₃	0,3	H ₃ BO ₃	0,3
KH ₂ PO ₄ , г/л	0,175	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	K ₂ HPO ₄	0,08	MnSO ₄ ·H ₂ O	1,5
K ₂ HPO ₄ , г/л	0,075	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	KH ₂ PO ₄	0,02	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г/л	0,075	MoO ₃	0,017	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·9H ₂ O	0,3
CaCl ₂ ·2H ₂ O, г/л	0,025	NH ₄ VO ₃	0,023	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0585	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08
NaCl, г/л	0,025			ЭДТА	0,0075	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,26
FeSO ₄ , г/л	0,005			NaCl	0,02	FeCl ₃ ·6H ₂ O	17,0
ЭДТА, г/л	0,05						
Агар, %	1,7						

В процессе выращивания водоросли культуру гематококка барботировали (продуvalи воздухом) с помощью компрессора АСО-9903 для аквариумов HAILEA, подающего воздух со скоростью до 4,2 л/мин. Через 4 сут выращивания суспензию гематококка, находящуюся на стадии активного роста и содержащую около 80 % подвижных клеток, использовали в экспериментах (суспензия А). На этой стадии в суспензию водорослей с оптической плотностью (ОП) 0,3–0,4 (при длине волны 560 нм) добавляли АЛК таким образом, чтобы ее конечная концентрация в суспензии составляла 0,5; 5; 10; 20 и 30 мг/л. В этих условиях водоросль культивировали в течение 12 сут. В отдельных опытах культуру клеток выращивали в накопительном режиме в жидкой среде в течение 1 мес. Периодически клетки осаждали, помещали в свежую питательную среду Рудика и через 4 сут суспензию, содержащую около 80 % подвижных клеток, доводили до ОП 0,3–0,4 (при длине волны 560 нм) и использовали в эксперименте, как описано выше (суспензия Б). Перспективность использования среды Рудика для интенсивного культивирования гематококка показана в работе [23].

Количество клеток в культуре водоросли оценивали при помощи камеры Горяева [24] и построения калибровочной кривой. Для построения последней измеряли ОП суспензии клеток гематококка при длине волны 560 нм, предварительно определив количество клеток. Количество клеток определяли по формуле

$$y = -8,4 \cdot 10^4 + 101 \cdot 10^4 x,$$

где y – количество клеток гематококка в 1 мл суспензии; x – ОП суспензии клеток гематококка при длине волны 560 нм.

После проведения предварительной калибровки определяли диаметр клеток гематококка с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, используя программное обеспечение NIS-Elements Advanced Solutions v.4.40 (Nikon, Япония).

Продуктивность *H. pluvialis* определяли по изменению сухой биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензий водоросли в красной и инфракрасной областях спектра при длине волны 680 и 750 нм на спектрофотометре Solar PB-2201 (Беларусь). Поглощение при 680 нм соответствует максимуму поглощения Хл, а поглощение при 750 нм определяется в основном светорассеянием на клетках гематококка. Для количественного расчета сухой массы *H. pluvialis* использовали формулу, описанную Tomohisa Katsuda с соавт. в работе [25]:

$$\text{Сухой вес (мг/мл)} = (3,04((\text{ОП}_{750} - \text{ОП}_{680})/\text{ОП}_{680}) + 1,40)\text{ОП}_{680}.$$

Для определения белка промытую и осажденную путем центрифугирования сырую биомассу *H. pluvialis* (20–100 мг) заливали 0,2 мл 1 М NaOH и экстрагировали белок в течение 10 мин на шейкере при 80 °С и 500 об/мин. Экстракт разбавляли 1,8 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 4 °С 30 мин при ускорении 12 000 g на центрифуге Sigma 1-15K (Sigma Laborzentrifugen,

Германия). Экстракцию, разбавление и центрифугирование повторяли еще 2 раза. Экстракты объединяли, отбирали 10 мкл для определения количества белка по методу Бредфорд [30]. Контролем служили 10 мкл экстракта, к которому приливали реактив Бредфорд без Кумасси G-250. Из показателя ОП опытной пробы вычитали значение поглощения контрольной пробы (при длине волны 595 нм) и по калибровочной кривой определяли количество белка (в мкг) в 1 мл суспензии [30].

Для определения качественного и количественного состава фотосинтетических пигментов в клетках водоросли использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Содержание Хл и каротиноидов в образцах оценивали с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия). В основу метода выделения, разделения и идентификации пигментов были положены методики, описанные в работах [26–29]. Экстракцию фотосинтетических пигментов из клеток *H. pluvialis* осуществляли с помощью щелочного ацетона (100 % ацетона + 0,4 % водного NH_3 в соотношении 9:1). Экстракт центрифугировали 5 мин при 17 000 г на центрифуге Heraeus Pico 17 (Thermo Fisher Scientific Inc., США), супернатант переносили в мерные пробирки, а осадок промывали щелочным ацетоном. Процедуру отмывки повторяли до полного извлечения пигментов. Для разделения экстрагированных пигментов в колонке использовали растворы А (90 % ацетонитрила, 9,9 % H_2O , 0,1 % триэтиламина) и В (100 % этилацетата) по программе (табл. 2) с потоком 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония) в диапазоне 200–800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм. Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы. Содержание пигментов рассчитывали по формуле

$$C_{\text{пигм}} = S_{440} F_{\text{пигм}} V/V_{\text{инъекц}} m,$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг/г сухой массы; S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм; $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета, полученный с помощью стандартов разделяемых веществ; V – объем супернатанта; $V_{\text{инъекц}}$ – объем инъекции; m – масса навески, г.

Таблица 2. Программа изменения концентрации растворителей для разделения фотосинтетических пигментов на хроматографической колонке Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см)

Table 2. The program for changing of the concentration of solvents for separation of photosynthetic pigments on a Nucleodur C18 Gravity chromatographic column (type C18, particle size 3 μm , length 15 cm)

Время проведения хроматографии, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор А, %	Раствор В, %	Режим
0,01	0,5	100	0	Линейный градиент
15,00	0,5	0	100	Изократический режим
18,00	0,5	0	100	Линейный градиент
19,00	0,5	100	0	Изократический режим
25,00	0,5	100	0	Остановка

В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее, стандартное отклонение среднего, достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ($p = 0,05$) и данного числа степеней свободы. Представлены данные 8 опытов в двукратной биологической повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2010, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [31].

Результаты и их обсуждение. Прежде всего было изучено влияние экзогенной АЛК на содержание клеток *H. pluvialis*, их диаметр и сухой вес в отдельные периоды 12-суточного культивирования водоросли. Количественная оценка содержания клеток водоросли, выращиваемых в течение 5–7 сут (с учетом разных вариантов), приведена в табл. 3. Подсчет клеток в контрольной культуре и выращиваемой на среде с добавлением АЛК показал значительное увеличение их содержания в вариантах с применением АЛК. Так, при выращивании водоросли с использо-

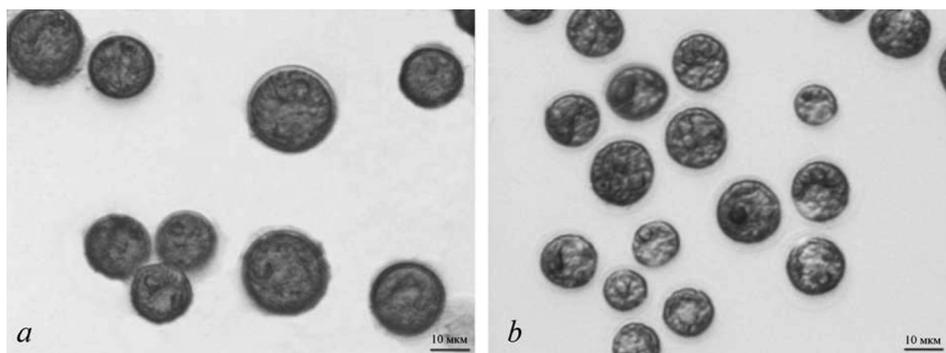


Рис. 1. Клетки водоросли *H. pluvialis* в контрольной (а) и опытной (б, АЛК 20 мг/л) культурах, выращиваемых в течение 7 сут на среде Рудика

Fig. 1. Cells of *H. pluvialis* algae in control (a) and experimental (b, ALA 20 mg/l) cultures grown for 7 days on Rudic's medium

ванием АЛК (0,5; 5; 10; 20 и 30 мг/л) их количество в 1 мл суспензии возрастало на 12; 33; 11–30; 37 и 31 % соответственно по сравнению с контролем (табл. 3). При этом размер клеток в вариантах с применением АЛК существенно уменьшался, составляя в среднем 85 % от контроля (рис. 1). В опыте № 2 (см. табл. 3) с использованием 5 мг/л АЛК к 5-м суткам инкубации отмечено снижение содержания клеток в обоих вариантах в среднем на 15 %. Но и в этом случае количество клеток в варианте с применением АЛК оказалось на 33 % выше, чем в контрольной культуре. При этом диаметр клеток в среднем составил 89 % от такового в контрольной культуре.

Таблица 3. Влияние АЛК (0,5; 5; 10; 20 и 30 мг/л) на количество клеток в 1 мл суспензии водоросли, выращиваемой в течение 5–7 сут, а также на диаметр клеток

Table 3. Effect of ALA (0,5, 5, 10, 20 and 30 mg/l) on the number of cells in 1 ml of the algae suspension grown for 5–7 days, as well as the diameter of the cells

Вариант опыта	К-во клеток		Диаметр клеток	
	тыс/мл	%	мкм	%
Опыт 1 (7 сут инкубации)				
Контроль	108	100	19,66	100
АЛК, мг/л:				
0,5	121	112	19,73	100
10	140	130	16,63	85
20	148	137	16,63	85
30	142	131	17,36	88
Опыт 2 (5 сут инкубации)				
Контроль	72	100	21,32	100
АЛК 5 мг/л	96	133	19,10	89
Опыт 3 (5 сут инкубации)				
Контроль	300	100	19,50	100
АЛК 10 мг/л	334	111	15,70	80

Примечание. Показатели в контроле приняты за 100 %. Представлены результаты трех опытов.

Через сутки после начала культивирования с АЛК (0,5; 5 и 10 мг/л) клеток гематококка, взятых из культуры, выращиваемой в жидкой среде в накопительном режиме (суспензия Б), наблюдали возрастание сухой биомассы в 1 мл суспензии водоросли как в контрольном (112 %), так и в опытных вариантах (122, 128 и 132 % соответственно) по отношению к показателям в исходной культуре, принятыми за 100 % (рис. 2). На рис. 2 отчетливо видна зависящая от концентрации АЛК стимуляция накопления сухой биомассы водоросли по сравнению с контролем. Аналогичная картина наблюдалась и через 2 сут инкубации – 111 % для контроля и 108, 131 и 127 % для вариантов с применением 0,5; 5,0 и 10 мг/л АЛК соответственно (рис. 2). На 5-е сутки инку-

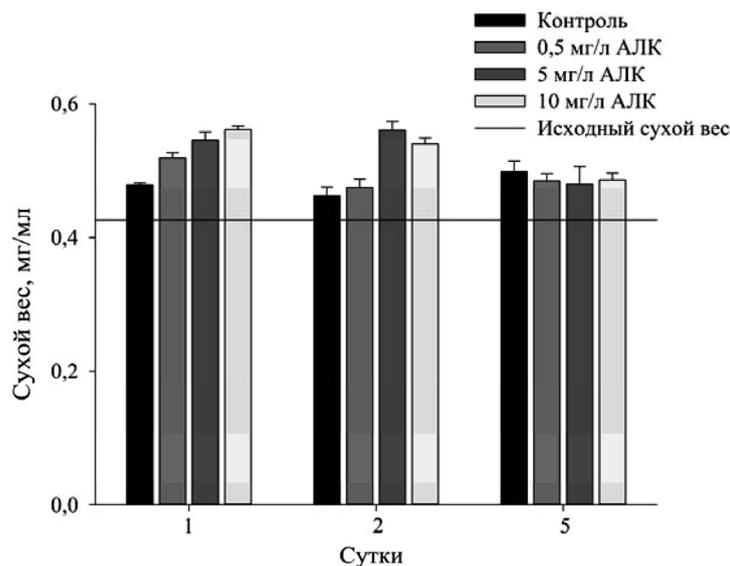


Рис. 2. Изменение сухого веса клеток водоросли *H. phuvialis* в контрольной и опытных культурах, выращиваемых в течение 1, 2, 5 сут на среде Рудика с добавлением АЛК (0,5; 10; 20 и 30 мг/л). Линия на рисунке показывает содержание сухого вещества в исходной культуре

Fig. 2. Change in dry weight of *H. phuvialis* algae cells in control and experimental cultures grown for 1, 2, 5 days in Rudic's medium supplemented with ALA (0,5, 10, 20 and 30 mg/l). The line in the figure shows the dry matter content of the initial culture

бации наблюдали снижение сухой биомассы водоросли при всех вариантах АЛК, так что эти показатели оказывались на уровне контроля (117 % от сухой биомассы исходной культуры) и составляли 114, 112 и 114 % для соответствующих вариантов АЛК. Таким образом, за 2 сут инкубации культуры клеток с 10 мг/л экзогенной АЛК сухая биомасса клеток водоросли выросла в среднем на 31 % по отношению к исходной культуре и на 17 % по сравнению с контролем.

В ряде опытов с использованием суспензии А, полученной после смыва клеток с чашек Петри, наряду с концентрациями 0,5 и 10 мг/л АЛК использовали также концентрации 20 и 30 мг/л и более длительный период инкубации культуры (вплоть до 12 сут). Анализ содержания сухого вещества в 7-суточной культуре показал снижение сухого веса как в контроле, так и в вариантах с применением АЛК, составляя в среднем в контроле 83, а в вариантах с использованием АЛК в концентрациях 0,5; 10; 20 и 30 мг/л – 78, 80, 76 и 83 % соответственно по сравнению с величиной сухого веса в исходной культуре до инкубации, принятой за 100 %.

В течение последующих 5 сут инкубации (12-суточная культура) сухой вес возрастал при применении всех вариантов, превышая сухую биомассу исходной культуры (рис. 3). Из рис. 3 видно, что экзогенная АЛК стимулировала процесс накопления сухого вещества и способствовала увеличению сухого веса клеток водоросли к 12-м суткам инкубации по сравнению как с контрольной, так и с исходной культурой. Для контрольной культуры превышение над сухим весом исходной культуры составило 116 %, для вариантов с добавлением 0,5; 10; 20 и 30 мг/л АЛК – 130, 105, 128 и 121 % соответственно.

Далее было изучено влияние экзогенной АЛК на содержание белка и фотосинтетических пигментов в клетках гематококка. Добавление в питательную среду АЛК эффективно сказалось на содержании общего белка. При использовании 0,5; 10; 20 и 30 мг/л АЛК содержание белка в расчете на 1 г сухого вещества через 7 сут культивирования клеток водоросли возрастало в среднем на 20, 24, 42 и 73 % соответственно по сравнению с контролем (рис. 4, а). Через 12 сут культивирования положительное действие АЛК несколько снижалось при сохранении отмеченной выше тенденции (рис. 4, б).

Под действием экзогенной АЛК возросло и содержание фотосинтетических пигментов – Хл и каротиноидов. Так, при расчете на 1 мл суспензии клеток содержание Хл а, б и β-каротина возросло на 8, 5 и 12 % по сравнению с 7-суточным контролем в случае использования 0,5 мг/л АЛК. При добавлении 10 мг/л АЛК эти величины составили 18, 17 и 18 %. При выращивании в среде

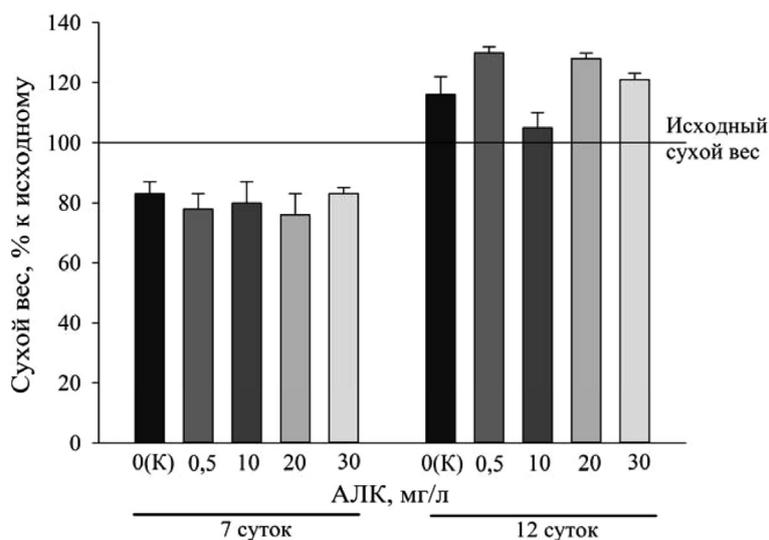


Рис. 3. Изменение сухого веса клеток водоросли *H. pluvialis* при культивировании в течение 7 и 12 сут на среде Рудика с добавлением разных концентраций АЛК либо без ее добавления (К). За 100 % принят сухой вес в исходной культуре

Fig. 3. Change in dry weight of *H. pluvialis* algae cells during cultivation for 7 and 12 days in Rudic's medium with addition of different concentrations of ALA, or without its additives (K). Dry weight in the initial culture is presented as 100 %

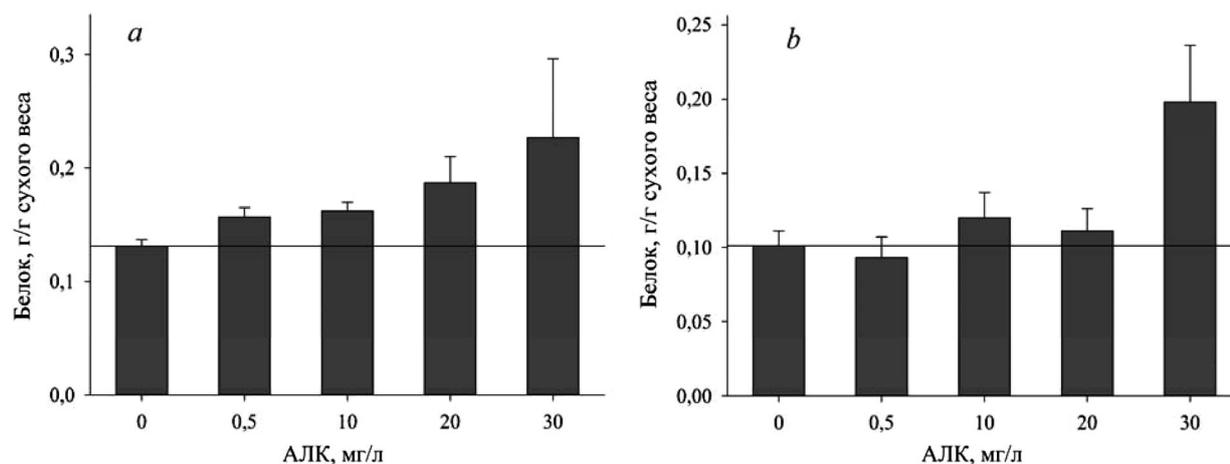


Рис. 4. Влияние экзогенной АЛК (0,5–30 мг/л) на содержание общего белка в клетках водоросли *H. pluvialis*, выращиваемой в течение 7 (а) и 12 (б) сут. Линии на рисунках показывают содержание белка в контрольной культуре

Fig. 4. Effect of exogenous ALA (0,5–30 mg/l) on the total protein content in *H. pluvialis* algae cells grown for 7 (a) and 12 (b) days. The lines in the figures show the protein content in the control cultures

с добавлением 20 мг/л АЛК содержание Хл *a*, *b* и β -каротина по сравнению с контролем возросло в среднем на 21, 21 и 15 %, а при добавлении 30 мг/л АЛК – на 30, 34 и 36 % соответственно. Положительный эффект отмечен и для ксантофилловых пигментов. Так, содержание неоксантина, виолаксантина и лютеина по сравнению с 7-суточным контролем составило 105, 95 и 106 % при использовании 0,5 мг/л АЛК; 104, 102 и 117 % при добавлении 10 мг/л АЛК; 84, 79 и 115 % при использовании 20 мг/л АЛК и 112, 107 и 134 % при добавлении 30 мг/л экзогенной АЛК.

Наиболее впечатляющие результаты получены при расчете содержания пигментов на единицу сухого веса вещества (данные представлены на рис. 5, *a*, *b*). В частности, содержание Хл *a*, *b* и β -каротина при добавлении 0,5 мг/л АЛК составило 120, 115 и 133 % от показателей 7-суточного контроля, при добавлении 10 мг/л АЛК – 147, 141 и 160 %. При использовании 20 мг/л АЛК эти величины составили 149, 152 и 159 %, а при применении 30 мг/л АЛК – 132, 141 и 182 % соответственно. Стимуляция накопления ксантофилловых пигментов – неоксантина, виолаксантина

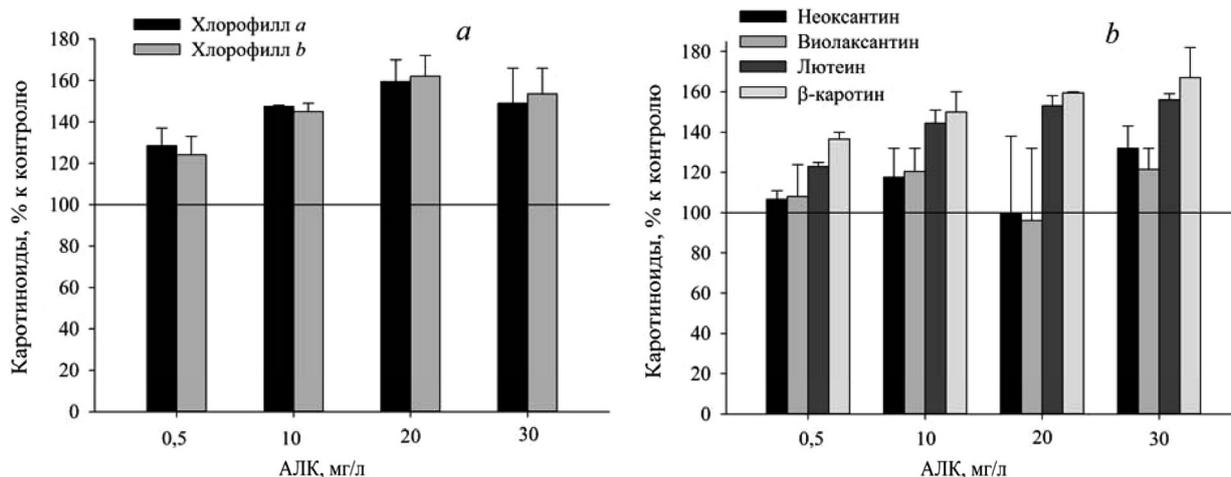


Рис. 5. Влияние экзогенной АЛК (0,5–30 мг/л) на содержание Хл (а) и каротиноидов (б) в клетках водоросли *H. pluvialis*, выращиваемой в течение 7 сут. За 100 % принято содержание пигментов в контрольной культуре, выращиваемой без добавления АЛК

Fig. 5. Effect of exogenous ALA (0.5–30 mg/l) on the content of chlorophyll (a) and carotenoids (b) in cells of *H. pluvialis* algae grown for 7 days. Content of pigments in the control cultures grown without ALA is presented as 100 %

и лютеина – составила 11, 24 и 21 % при добавлении 0,5 мг/л АЛК; 32, 32 и 51 % при применении 10 мг/л АЛК; 38, 32 и 58 % при использовании 20 мг/л АЛК и 43, 32 и 59 % при добавлении 30 мг/л АЛК.

Закключение. Таким образом, выращивание водоросли на среде Рудика с добавлением экзогенной АЛК стимулировало накопление сухой биомассы гематококка в период активного роста водоросли, что приводило к превышению содержания сухого вещества по сравнению с таковым как в контрольной, так и в исходной культуре. АЛК как регулятор роста хорошо зарекомендовал себя в опытах на высших растениях [32–34]. Ранее нами было показано, что в основе росторегулирующих свойств АЛК лежит ее способность индуцировать накопление эндогенных цитокининов – зеатина и его производных [15]. Содержание веществ с цитокининовой активностью было отмечено в клетках водоросли *Chlorella* и в 7 штаммах *Chlorophyta* [35–38]. Наряду с этим выращивание хлореллы в условиях избыточного накопления эндогенной АЛК (инкубация на левулиновой кислоте) увеличивало цитокининовую активность культуральной среды, содержащей экскретируемые клетками водоросли метаболиты, а также экстрактов клеток хлореллы в биотестах на цитокинины по сравнению с контрольной культурой без добавления левулиновой кислоты [37]. Наблюдаемое нами повышение продуктивности гематококка при использовании экзогенной АЛК позволяет предположить, что результатом ее положительного действия может являться повышение уровня эндогенных цитокининов в клетках гематококка. Полученные результаты показывают, что увеличение содержания клеток гематококка при добавлении АЛК разной концентрации может быть связано со стимуляцией клеточного деления избыточными количествами цитокининов, одной из основных функций которых является индукция клеточного деления [39, 40].

Значительное повышение содержания фотосинтетических пигментов – Хл и каротиноидов в клетках гематококка при выращивании в присутствии экзогенной АЛК может быть результатом влияния экзогенного субстрата на процессы синтеза дополнительного количества пигментов. Наряду с этим одним из ярких проявлений биологической активности цитокининов является контроль биогенеза хлоропластов путем стимуляции формирования внутренней структуры хлоропластов, повышения фотосинтетической активности и активации синтеза фотосинтетических пигментов – Хл и каротиноидов. Не исключено, что этот механизм может вносить вклад и в стимуляцию образования фотосинтетических пигментов в клетках гематококка, наблюдаемую в присутствии экзогенной АЛК.

Добавление экзогенной АЛК способствовало также увеличению содержания белка (от 20 до 73 % в расчете на 1 г сухого вещества водоросли после 7 сут культивирования. Ранее нами показано,

что в условиях усиления роста растений, обработанных экзогенной АЛК, наблюдаются активация экспрессии гена нитратредуктазы – ключевого фермента ассимиляции неорганического азота, повышение активности фермента, его содержания, а также возрастание содержания белка в таких растениях [17]. Выявленная нами активация белкового метаболизма в клетках гематококка может быть результатом усиления ассимиляции неорганического азота в присутствии экзогенной АЛК и его превращения в органическую форму, в частности в белковые аминокислоты.

Список использованных источников

1. Shimidzu, N. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms / N. Shimidzu, M. Goto, W. Miki // Fisheries Science. – 1996. – Vol. 62, N 1. – P. 134–137.
2. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition / G. Hussein [et al.] // J. Nat. Prod. – 2006. – Vol. 69, N 3. – P. 443–449.
3. Johnson, E. A. Microbial carotenoids / E. A. Johnson, W. A. Schroeder // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 1996. – Vol. 53. – P. 119–178.
4. Krishna, K. B. Secondary carotenoid production in green algae / K. B. Krishna, P. Mohanty // J. Sci. Industr. Res. – 1998. – Vol. 57. – P. 51–63.
5. Guerin, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition / M. Guerin, M. E. Huntley, M. Olaizola // Trends Biotechnol. – 2003. – Vol. 21, N 5. – P. 210–216.
6. Higuera-Ciajara, I. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications / I. Higuera-Ciajara, L. Felix-Valenzuela, F. Goycoolea // Crit. Rev. in Food Sci. and Nutrition. – 2006. – Vol. 46, N 2. – P. 185–196.
7. Yuan, J.-P. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection / J.-P. Yuan, F. Chen // Biotechnol. Techniques. – 1997. – Vol. 11, N 7. – P. 455–459.
8. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions / A. Cifuentes [et al.] // Biol. Res. – 2003. – Vol. 36. – P. 343–357.
9. Chunmei, H. Cell growth and astaxanthin accumulation of four strains of *Haematococcus pluvialis* exposed to different plant regulators / H. Chunmei, L. Jianguo, Z. Yong // Oceanologia et Limologia Sinica. – 2006. – Vol. 40, N 4. – P. 430–436.
10. Raposo, M. Influence of the growth regulators kinetin and 2,4-D on the growth of two chlorophyte microalgae, *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* / M. Raposo, R. M. de Moraes // J. of Basic and Appl. Sci. – 2013. – Vol. 9. – P. 302–308.
11. Analysis of mRNA expression profiles of carotenogenesis and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under exogenous 2,4-epibrassinolide (EBR) / Z. Gao [et al.] // Biol. Res. – 2013. – Vol. 46, N 2. – P. 201–206.
12. Аверина, Н. Г. Изучение влияния 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, вып. 5. – С. 916–920.
13. Averina, N. G. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth / N. G. Averina, E. B. Yaronkaya // Photosynthetica. – 1991. – Vol. 25, N 1. – P. 27–31.
14. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 413 с.
15. Яронская, Е. Б. Содержание зеатина и его производных в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с повышенным уровнем 5-аминолевулиновой кислоты / Е. Б. Яронская, И. В. Вершиловская, Н. Г. Аверина // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2004. – № 3. – С. 70–73.
16. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid / N. G. Averina [et al.] // Rus. J. of Plant Physiol. – 2010. – Vol. 57, N 6. – P. 792–798.
17. Beyzaei, Z. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants / Z. Beyzaei, R. A. Sherbakov, N. G. Averina // J. Plant Growth Regul. – 2014. – Vol. 33, N 4. – P. 745–750.
18. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K. Sasaki [et al.] // J. Ferment. Bioengin. – 1995. – Vol. 79, N 5. – P. 453–457.
19. Jie, L. Effect of 5-Aminolevulinic acid on algae growth and product accumulation: Master's Thesis / L. Jie. – Hangzhou : Zhejiang University, 2013. – 67 p.
20. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / Нац. акад. наук Беларусі, Ин-т биофизики и клеточной инженерии ; [сост.: С. С. Мельников и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 101 с.
21. Nichols, H. W. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. / H. W. Nichols, H. C. Bold // J. of Phycology. – 1965. – Vol. 1. – P. 34–38.
22. Imamoglu, E. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of Astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis* / E. Imamoglu, M. C. Dalay, F. V. Sukan // New Biotechnol. – 2009. – Vol. 26, N 3/4. – P. 199–204.
23. Imamoglu, E. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis* / E. Imamoglu, F. Sukan, M. Dalay // Int. J. of Natural & Engineering Sci. – 2007. – Vol. 1, N 3. – P. 5–9.
24. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л. А. Сиренко [и др.]. – Киев : Наук. думка, 1975. – 248 с.

25. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* / T. Katsuda [et al.] // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. – Vol. 102, N 5. – P. 442–446.
26. Rodriguez-Amaya, D. B. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis / D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. – Washington : HarvestPlus, 2004. – 63 p.
27. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies / S.V. Milenković [et al.] // *Advanced technologies.* – 2012. – Vol. 1. – P. 16–24.
28. Forni, E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas / E. Forni, M. Ghezzi, A. Polesello // *Chromatography.* – 2012. – Vol. 1. – P. 120–124.
29. Occurrence and distribution of metals and porphyrins in Nigerian coal minerals / A. A. Olajire [et al.] // *J. Fuel. Chem. Technol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 641–647.
30. Bradford, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. A. Bradford // *Analyt. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
31. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск : Выш. шк., 1973. – 320 с.
32. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content and plant growth / Y. Hotta [et al.] // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 1997. – Vol. 61, N 12. – P. 2025–2028.
33. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops / Y. Hotta [et al.] // *Plant Growth Regul.* – 1997. – Vol. 22. – P. 109–114.
34. Roy, C. B. Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vigna catjung*, *V. mungo*, and *V. radiata* / C. B. Roy, M. Vivekanandan // *Biol. Plantarum.* – 1998. – Vol. 41, N 2. – P. 211–215.
35. Мельников, С. С. Цитокининовая активность экзометаболитов хлореллы / С. С. Мельников, Е. Е. Мананкина, Е. А. Будакова // *Вест. акад. наук БССР. Сер. бйял. навук.* – 1988. – № 6. – С. 97–99.
36. Мельников, С. С. Биосинтез цитокининов клетками хлореллы из 5-аминолевулиновой кислот / С. С. Мельников, Е. Е. Мананкина // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. бйял. навук.* – 2002. – № 4. – С. 47–49.
37. Stirk, W. Changes in the phytohormones of *Chlorella minutissima* on a daily cycle / W. Stirk, D. Drimalova, M. Strnad // *South African J. of Botany.* – 2006. – Vol. 72. – P. 333.
38. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae / W. Stirk [et al.] // *J. of Appl. Phycology.* – 2002. – Vol. 14. – P. 215–221.
39. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division / C. O. Miler [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1956. – Vol. 78. – P. 1375.
40. Кулаева, О. Н. Цитокинины, их структура и функции / О. Н. Кулаева. – М. : Наука, 1973. – 264 с.

References

1. Shimidzu N., Goto M., Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*, 1996, vol. 62, no. 1, pp. 134–137.
2. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 2006, vol. 69, no. 3, pp. 443–449. DOI: 10.1021/np050354+
3. Johnson E. A., Schroeder W. A. Microbial carotenoids. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1996, vol. 53, pp. 119–178.
4. Krishna K. B., Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 1998, vol. 57, pp. 51–63.
5. Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 2003, vol. 21, no. 5, pp. 210–216. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7
6. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea Higuera-Ciapara F. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, vol. 46, no. 2, pp. 185–196. DOI: 10.1080/10408690590957188
7. Yuan J-P., Chen F. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*, 1997, vol. 11, no. 7, pp. 455–459.
8. Cifuentes A. S., González M. A., Vargas S., Hoeneisen M., González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 2003, vol. 36, pp. 343–357.
9. Chunmei H., Jianguo L., Yong Z. Cell growth and astaxanthin accumulation of four strains of *Haematococcus pluvialis* exposed to different plant regulators. *Oceanologia et Limologia Sinica*, 2006, vol. 40, no. 4, pp. 430–436.
10. Raposo M., de Moraes R. M. Influence of the growth regulators kinetin and 2,4-D on the growth of two chlorophyte microalgae, *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 2013, vol. 9, pp. 302–308.
11. Gao Z., Meng C., Gao H., Zhang X., Xu D., Su Y., Wang Y., Zhao Y., Ye N. Analysis of mRNA expression profiles of carotenogenesis and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under exogenous 2,4-epibrassinolide (EBR). *Biological Research*, 2013, vol. 46, no. 2, pp. 201–206. DOI: 10.4067/S0716-97602013000200012
12. Averina N. G., Iaronskaia E. B. The study of the effect of 5-aminolevulinic acid on the growth of barley plants. *Fiziologiya rastenii* [Plant Physiology], 1988, vol. 35, no. 5, pp. 916–920 (in Russian).
13. Averina N. G., Yaronskaya E. B. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth. *Photosynthetic*, 1991, vol. 25, no. 1, pp. 27–31.
14. Averina N. G., Yaronskaya E. B. *Biosynthesis of tetrapyrroles in plants*. Minsk, Belarusian Science, 2012. 413 p. (in Russian).

15. Yaronskaya E. B., Vershilovskaia I. V., Averina N. G. The content of zeatin and its derivatives in barley sprouts (*Hordeum vulgare* L.) with an increased level of 5-aminolevulinic acid. *Vestsi Natsyianal'nai Akademii navuk Belarusi. Seriya biialagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2004, no. 3, pp. 70–73 (in Russian).
16. Averina N. G., Gritskevich E. R., Vershilovskaya I. V., Usatov A. V., Yaronskaya E. B. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, vol. 57, no. 6, pp. 792–798.
17. 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. 4, pp. 745–750. DOI: 10.1007/s00344-014-9422-4
18. Sasaki K., Marquez F. J., Nishio N., Nagai S. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, vol. 79, no. 5, pp. 453–457.
19. Jie, L. *Effect of 5-Aminolevulinic acid on algae growth and product accumulation*, Master's Thesis. Hangzhou, Zhejiang University, 2013. 67 p.
20. *Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae*, compilers: Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. F., Shalygo N. V. Minsk, Belarusian science, 2011. 101 p. (in Russian).
21. Nichols H. W., Bold H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. *Journal of Phycology*, 1965, vol. 1, pp. 34–38. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x
22. Imamoglu E., Dalay M. C., Sukan F. V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of Astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*, 2009, vol. 26, no. 3/4, pp. 199–204. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.08.007
23. Imamoglu E., Sukan F. V., Dalay M. C. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, 2007, vol. 1, no. 3, pp. 5–9.
24. Sidorenko L. F., Sakevich A. I., Osipov L. F., Lukina I. F., Kuzmenko M. I., Kozitskaia V. N., Velichko I. M., Myslovich V. O., Gavrilenko V. Y., Arendarchuk V. V., Kirpenko U. A. Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice. Kiev, Scientific thought, 1975. 248 p. (in Russian).
25. Katsuda T., Shimahara K., Shiraishi H., Yamagami K., Ranjbar R., Katoh S. Effect of Flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, vol. 102, no. 5, pp. 442–446.
26. Rodriguez-Amaya D. B., Kimura M. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. Washington, HarvestPlus, 2004. 63 p.
27. Milenković S. V., Anđelković T. D., Zvezdanović J. B., Marković D. Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*, 2012, vol. 1, pp. 16–24.
28. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*, 2012, vol. 1, pp. 120–124.
29. Olajire A. A., Ameen A. B., Abdul-Hameed M., Adekola F. A. Occurrence and distribution of metals and porphyrins in Nigerian coal minerals. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 2007, vol. 35, pp. 641–647.
30. Bradford M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.
31. Rokitskii P. F. *Biological statistics*. Minsk, Graduate school, 1973. 320 p. (in Russian).
32. Hotta Y., Tanaka T., Takaoka H., Takeuchi Y., Konnai M. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content and plant growth. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, vol. 61, no. 12, pp. 2025–2028. DOI:10.1271/bbb.61.2025
33. Hotta Y., Tanaka T., Takaoka H., Takeuchi Y., Konnai M. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. *Plant Growth Regulation*, 1997, vol. 22, pp. 109–114.
34. Roy C. B., Vivekanandan M. Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vigna catjang*, *V. mungo*, and *V. radiata*. *Biologia Plantarum*, 1998, vol. 41, no. 2, pp. 211–215.
35. Melnikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A. Cytokinin activity of chlorella exometabolites. *Vestsi akademii navuk BSSR. Seriya biialagichnykh navuk = Proceedings of the Academy of Sciences of BSSR*, 1988, no. 6, pp. 97–99 (in Russian).
36. Melnikov S. S., Manankina E. E. Biosynthesis of cytokinins by chlorella cells from 5-aminolevulinic acids. *Vestsi Natsyianal'nai Akademii navuk Belarusi. Seriya biialagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2002, no. 4, pp. 47–49 (in Russian).
37. Stirk W., Drimalova D., Strnad M. Changes in the phytohormones of *Chlorella minutissima* on a daily cycle. *South African Journal of Botany*, 2006, vol. 72, p. 333.
38. Stirk W., Ördög V., J. V. Staden, Jäger K. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 2002, vol. 14, pp. 215–221.
39. Miler C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society*, 1956, vol. 78, p. 1375.
40. Kulaeva O. N. *Cytokinins, their structure and functions*. Moscow, Science, 1973. 264 p. (in Russian).

Информация об авторах

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

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

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kmu@tut.by.

Мананкина Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: room454@mail.ru.

Гончарик Руслан Геннадьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rusgon@mail.ru.

Шальго Николай Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shalygo@ibp.org.by.

Information about the authors

Nataliya G. Averina – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief 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: averina@ibp.org.by.

Rostislav A. Sherbakov – 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: shebakov@ibp.org.by.

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Senior 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: kmu@tut.by.

Elena E. Manankina – 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: room454@mail.ru.

Ruslan G. Goncharik – Junior 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: rusgon@mail.ru.

Nikolai V. Shalygo – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shalygo@ibp.org.by.

ISSN 1029-8940 (print)
УДК 597.531.087(262.5)

Поступила в редакцию 20.04.2017
Received 20.04.2017

В. К. Ризевский

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

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ДЕВЯТИИГЛОЙ КОЛЮШКИ
PUNGITIUS PUNGITIUS (LINNAEUS, 1758) ИЗ ВОДОЕМОВ
БАСЕЙНА ЧЕРНОГО МОРЯ**

Аннотация. Аборигенный для водоемов бассейна Балтийского моря циркумполярный вид рыб – колюшка девятииглая *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) – проник в водоемы бассейна Черного моря, натурализовался и в последние годы широко распространился на территории Беларуси в бассейне р. Припять. В работе впервые приводится описание морфометрических параметров девятииглой колюшки из водоемов бассейна р. Припять (в пределах Беларуси) – новом для вида морском бассейне (бассейн Черного моря). Показано, что девятииглая колюшка из рек Кречет и Тур представлена особями без костных пластин по бокам тела. При этом разброс значений меристических признаков девятииглой колюшки для бассейна р. Припять в целом не выходит за пределы колебаний признаков для вида в ареале и составляет: D_1 8–11, D_2 8–12, A 7–11, P 9–11, $vert.$ 29–34, $sp. br.$ 7–13. Представленные в статье материалы являются первым описанием морфометрических параметров девятииглой колюшки не только в новых условиях обитания (в водоемах бассейна Черного моря), но и в целом для водоемов Беларуси.

Ключевые слова: колюшка девятииглая, бассейн р. Припять, меристические признаки, пластические признаки

Для цитирования: Ризевский, В. К. Морфометрические параметры девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) из водоемов бассейна Черного моря / В. К. Ризевский // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 33–39.

V. K. Rizevsky

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

**MORPHOMETRIC PARAMETERS OF NINESPINE STICKLEBACK
PUNGITIUS PUNGITIUS (LINNAEUS, 1758) FROM BLACK SEA BASIN RESERVOIRS**

Abstract. Native for the water bodies of the Baltic Sea basin, the circumpolar fish species – the ninespine stickleback *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) – penetrated into the Black Sea basin's water bodies on the territory of Belarus, was naturalized and in recent years is widely distributed in the Pripyat River basin. The morphometric characteristics of the ninespine stickleback from the Pripyat River basin's water bodies (a new sea basin for this species – Black Sea basin) are given for the first time in present paper. It is shown that individuals of the ninespine stickleback from the Krechet River and Tur River don't have bone plates on the each side of the body. However, variation in the meristic features obtained for the ninespine stickleback coincide with values in the range and make up: D_1 8–11, D_2 8–12, A 7–11, P 9–11, $vert.$ 29–34, $sp. br.$ 7–13. The materials presented in this article are the first description of the morphometric characteristics of the ninespine stickleback not only in new habitats (water bodies of the Black Sea basin – the Pripyat River basin), but also for the water bodies of Belarus in general.

Keywords: Ninespine stickleback, Pripyat River basin, meristic characters, plastic characters

For citation: Rizevsky V. K. Morphometric parameters of ninespine stickleback *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) from Black sea basin reservoirs. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 33–39 (in Russian).

Введение. Девятииглая колюшка *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) – циркумполярный вид северных морей. В Европе вид отмечен в бассейнах Северного, Балтийского, Норвежского, Баренцева и Белого морей. Встречается в континентальных и островных пресноводных водоемах и частично в морских прибрежных водах [1]. Начиная с 1980-х годов этот вид регистрируется в бассейне Каспийского моря (от Верхней Волги до Средней Волги и ее притоков) [2–5].

В бассейне Черного моря единственный экземпляр девятииглой колюшки был описан В. И. Грациановым [6] в бассейне р. Припять на территории Беларуси в 1905 г. Автор отмечал: «Вероятно, здесь мы имеем случай перекочевывания вида из одного бассейна в другой через систему соединительных каналов, очевидно, распространившись далеко по Неману и Щаре, вид этот проник

через Огинский канал в бассейн Припять. Нахождение ее только в одном месте и лишь в одном экземпляре не дает возможности заключить, насколько укоренилось такое распространение вида».

Других упоминаний об обитании девятииглой колюшки в бассейне Черного моря до 1980-х годов в научной литературе не имеется. Исследователи фауны рыб р. Днепр на территории Украины отмечают наличие в бассейне данного водотока другого представителя рода *Pungitius* – колюшки малой южной *Pungitius platygaster* (Kessler, 1859) [7–12].

В 1985 г. сотрудниками лаборатории ихтиологии Института зоологии (в настоящее время ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам») девятииглая колюшка в большом количестве была отловлена в р. Ясельда (левый приток верхнего участка р. Припять). Тогда же было отмечено, что девятииглая колюшка довольно многочисленна в каналах мелиоративной системы «Верховье Ясельды» и в водохранилище Селец (бассейн р. Ясельда). В 1998 г. данный вид был выявлен уже на нижнем участке р. Припять возле г. Мозырь [13].

В 2010 г. девятииглая колюшка помимо р. Ясельда и ряда впадающих в нее мелиоративных каналов была отмечена в р. Кречет (правый приток р. Ясельда), а также в р. Тур (правый приток р. Припять) [14–16].

Таким образом, следует считать, что в Беларуси аборигенный для водоемов бассейна Балтийского моря циркумполярный вид рыб – колюшка девятииглая – проник в водоемы бассейна Черного моря, натурализовался и в последние годы широко распространился в бассейне р. Припять.

Цель работы – описание морфометрических параметров девятииглой колюшки из водных объектов бассейна Черного моря и выявление их особенностей в новых условиях обитания.

Материалы и методы исследования. Лов рыб был осуществлен в реках Кречет (река в Березовском р-не Брестской обл., правый приток р. Ясельда, бассейн р. Припять) и Тур (река в Мозырском р-не Гомельской обл., правый приток р. Припять). Отлов рыб осуществляли на глубине 0,2–1,2 м сачком с ячейей 8 мм, высотой рамы 60 см, шириной 55 см, имеющим плоское основание. Особей фиксировали сразу после отлова в 4 %-ном изотоническом растворе формалина (100 мл формальдегида, 900 мл воды и 7 г NaCl).

Для определения массы рыбу взвешивали на весах с точностью до 0,01 г. Возраст определяли по жаберным крышкам. Всего у 63 половозрелых самок примерно одинаковой длины исследовано по 9 меристических признаков и по 21 пластическому.

Для определения морф колюшек произведен подсчет костных пластинок, идущих вдоль тела по бокам (пластинки считали с левой стороны тела, отдельно на киле (II caud.) и на теле (II)), спинных колючек (D_1), ветвистых лучей в спинном (D_2), анальном (A), грудном (P) и хвостовом (C) плавниках, а также жаберных тычинок на первой жаберной дуге (sp. br.) и позвонков (vert.).

По пластическим характеристикам исследовано 17 признаков длины тела без C и 4 признака длины головы (в %): H – наибольшая высота тела; h – наименьшая высота тела; aD_1 – расстояние антедорсальное; dp – расстояние постдорсальное; aV – расстояние антевентральное; aA – расстояние антеанальное; PV – расстояние между грудным плавником и брюшной колючкой; VA – расстояние между брюшной колючкой и анальным плавником; lp – длина хвостового стебля; ID – длина основания спинного плавника; hD – высота спинного плавника; IA – длина основания анального плавника; hA – высота анального плавника; IP – длина грудного плавника; IV – длина брюшной колючки; IC – длина хвостового плавника; ao – длина головы; qm – высота головы у затылка; ag – длина рыла; gn – диаметр глаза; po – заглазничное расстояние.

Для математической обработки материала использовали пакеты программ Statistica и Excel.

Данные по морфометрии девятииглой колюшки из рек Кречет и Тур собраны и обработаны А. В. Турчиным (за что автор выражает ему искреннюю благодарность). Кроме того, проанализированы архивные материалы лаборатории ихтиологии «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» по девятииглой колюшке из р. Ясельда сборов 1985 г. и ряд литературных материалов по колюшке из водоемов в пределах ареала [1, 17].

Результаты и их обсуждение. Первые данные по морфометрическим показателям девятииглой колюшки в водотоках бассейна Черного моря были получены сотрудниками лаборатории ихтиологии Института зоологии (ныне «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам») в 1985 г. по колюшке из р. Ясельда (приток р. Припять, бассейн Черного моря). К сожалению, имеющиеся мате-

риалы характеризуют только меристические признаки, данные по пластическим показателям отсутствуют.

По нашим данным, отловленные из р. Ясельда колюшки характеризовались следующими признаками: костные пластины по боку тела отсутствуют, в киле 4–8 ($5,97 \pm 0,18$) пластин, позвонков 30–34 ($31,97 \pm 0,21$), в спинном плавнике 8–11 ($9,60 \pm 0,12$) колючек и 9–12 ($10,30 \pm 0,14$) ветвистых лучей, в анальном плавнике 8–10 ($9,17 \pm 0,11$) ветвистых лучей, в грудных плавниках 9–11 ($10,27 \pm 0,10$) ветвистых лучей, в хвостовом плавнике 12–13 ($12,1 \pm 0,05$) лучей, тычинок на первой жаберной дуге 9–13 ($11,17 \pm 0,17$) (табл. 1).

Сравнение меристических признаков колюшки из бассейна р. Припять (сборов 1985 г.) с колюшкой из р. Сходня (бассейн р. Волга) показало достоверное различие между ними по трем признакам. У рыб из р. Ясельда достоверно меньше количество пластин в киле, позвонков, а также ветвистых лучей в анальном плавнике. Рыбы из оз. Рейдовое (Курильские острова) отличаются от рыб из р. Ясельда достоверно меньшим количеством тычинок на первой жаберной дуге.

Таблица 1. Меристические признаки девятииглой колюшки из различных водоемов ареала

Table 1. Meristic characters of the ninespine stickleback from several water reservoirs in the range

Показатель	р. Ясельда (1) (материалы лаб. ихтиологии)		р. Сходня (2) [Зюганов, 1991]		оз. Рейдовое (3) [Зюганов, 1991]		t_{st}	
	lim	$M \pm m$	lim	$M \pm m$	lim	$M \pm m$	1/2	1/3
ll caud.	4–8	$5,97 \pm 0,18$	8–12	$10,0 \pm 0,3$	–	–	11,99	–
ll	0	0	1–4	$5,97 \pm 0,18$	0–4	$2,7 \pm 1,1$	–	–
vert.	30–34	$31,97 \pm 0,21$	32–34	$33,0 \pm 0,1$	31–34	$32,3 \pm 0,9$	3,75	0,42
D_1	8–11	$9,60 \pm 0,12$	9–10	$9,8 \pm 0,09$	7–11	$9,2 \pm 0,6$	1,20	0,77
D_2	9–12	$10,30 \pm 0,14$	10–11	$10,7 \pm 0,1$	10–13	$10,8 \pm 0,$	2,06	0,82
A	8–10	$9,17 \pm 0,11$	9–11	$10,0 \pm 0,2$	7–11	$9,6 \pm 0,9$	3,84	0,57
P	9–11	$10,27 \pm 0,10$	10	10 ± 0	–	–	2,12	–
C	12–13	$12,10 \pm 0,05$	12	12 ± 0	–	–	1,60	–
sp. br.	9–13	$11,17 \pm 0,17$	11–13	$11,7 \pm 0,2$	7–10	$8,2 \pm 1,3$	1,96	2,94

В совокупности с полученными нами материалами по колюшке из рек Кречет и Тур разброс значений меристических признаков девятииглой колюшки в целом для бассейна р. Припять несколько увеличился и составил: D_1 8–11, D_2 8–12, A 7–11, P 9–11, vert. 29–34, sp. br. 7–13 (табл. 2), что укладывается в пределы колебаний признаков для вида в ареале [1, 17, 18].

Таблица 2. Меристические признаки девятииглой колюшки из водоемов бассейна р. Припять

Table 2. Meristic characters of the ninespine stickleback from different water reservoirs of the Pripyat River basin

Признак	р. Ясельда (1985)	р. Кречет (2010)	р. Тур (2010)	В целом для бассейна р. Припять
D_1	8–11	9–11	9–11	8–11
D_2	9–12	8–11	9–11	8–12
A	8–10	8–10	7–11	7–11
P	9–11	9–11	10–11	9–11
C	12–13	8–12	12	8–13
vert.	30–34	29–33	30–32	29–34
ll caud.	4–8	5–9	6–9	4–9
ll	0	0	0	0
sp. br.	9–13	8–11	7–10	7–13

По нашим данным, у девятииглой колюшки из р. Кречет и Тур на киле имеется от 5 до 9 пластин, и, так же как у колюшки из р. Ясельда сборов 1985 г., пластины по боку тела отсутствуют. Согласно В. В. Зюганову [1], по количеству и расположению костных пластин у девятииглой колюшки реализовано два фенотипа – 3а (пластины имеются на боку тела и на киле) и 4а (пластины только на киле, по боку тела отсутствуют). Автор также указывает, что фенотип 4а известен только для популяций колюшки из водоемов Северной Америки (миссисипская форма) и для отдельных

экземпляров девятиглой колюшки из оз. Рейдовое на о. Итуруп (Курильские о-ва) (см. табл. 1). В наших материалах (табл. 2) колюшка представлена исключительно особями без костных пластинок по боку тела, что свидетельствует о более широком распространении рыб такого фенотипа.

В то же время в последние годы появились сведения, что в одном и том же водоеме количество пластин по боку тела у колюшек с течением времени может как снижаться, так и увеличиваться. Выделяют три основных фактора, обуславливающих изменение количества пластин: наличие/отсутствие хищников, наличие/отсутствие убежищ и концентрация солей кальция в воде [19, 20].

Согласно полученным нами данным, у колюшки девятиглой из водоемов бассейна р. Припять антеанальное расстояние составляет 2/3 от длины тела без С (у колюшки из р. Кречет – $62,85 \pm 0,21$, у колюшки из р. Тур – $65,03 \pm 0,38$, что в 2 раза больше антедорсального расстояния (1/3 от длины тела) – $30,01 \pm 0,18$ и $30,15 \pm 0,23$ соответственно) (табл. 3).

Длина основания анального плавника достигает около 1/5 части длины тела особей ($20,48 \pm 0,19$ и $20,07 \pm 0,26$), что в 2 раза больше его высоты ($10,01 \pm 0,11$ и $9,97 \pm 0,23$), составляющей примерно

Таблица 3. Морфометрические признаки девятиглой колюшки (самки) *Pungitius pungitius* из рек Кречет и Тур

Table 3. Morphometric characters of the ninespine stickleback (females) from the Krechet River and Tur River

Показатель	р. Кречет (n = 43)			р. Тур (n = 20)		
	lim	M ± m	δ	lim	M ± m	δ
<i>Меристические признаки</i>						
I D	9,00–11,00	9,84 ± 0,09	0,57	9,00–11,00	9,75 ± 0,12	0,55
II D	8,00–11,00	10,07 ± 0,09	0,59	9,00–11,00	9,95 ± 0,11	0,51
A	8,00–10,00	8,86 ± 0,10	0,68	7,00–11,00	9,05 ± 0,18	0,83
P	9,00–11,00	10,12 ± 0,06	0,39	10,00–11,00	10,05 ± 0,05	0,22
C	8,00–12,00	11,91 ± 0,09	0,61	12,00–12,00	12,00 ± 0,00	0,00
II	0,00–0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00–0,00	0,00 ± 0,00	0,00
II caud.	5,00–9,00	6,56 ± 0,15	0,96	6,00–9,00	7,00 ± 0,19	0,86
vert.	29,00–33,00	31,72 ± 0,12	0,77	30,00–32,00	31,90 ± 0,07	0,31
sp. br.	8,00–11,00	9,60 ± 0,12	0,76	7,00–10,00	9,40 ± 0,18	0,82
<i>Пластические признаки (в % от длины тела без С)</i>						
ao	24,56–28,82	26,57 ± 0,14	0,89	25,10–28,41	26,49 ± 0,17	0,75
H	15,89–21,01	17,80 ± 0,16	1,03	18,51–23,25	21,46 ± 0,29	1,31
h	1,64–2,37	1,98 ± 0,02	0,16	1,70–2,20	1,99 ± 0,03	0,14
aD ₁	26,98–33,33	30,01 ± 0,18	1,21	28,20–31,48	30,15 ± 0,23	1,04
dp	11,61–17,90	15,13 ± 0,18	1,17	12,93–15,75	14,09 ± 0,17	0,76
aV	36,18–41,04	38,29 ± 0,18	1,21	37,10–41,25	39,10 ± 0,25	1,12
aA	60,32–66,17	62,85 ± 0,21	1,38	62,16–68,07	65,03 ± 0,38	1,70
PV	4,20–6,45	5,09 ± 0,08	0,51	5,95–9,50	7,54 ± 0,22	1,00
VA	22,28–27,16	24,99 ± 0,17	1,11	23,96–29,60	26,40 ± 0,30	1,35
lp	10,11–17,86	15,24 ± 0,19	1,28	12,59–15,43	14,07 ± 0,18	0,82
ID	20,54–25,30	23,03 ± 0,18	1,17	21,70–24,57	22,72 ± 0,18	0,82
hD	8,91–12,06	10,23 ± 0,11	0,73	8,09–10,96	9,81 ± 0,15	0,65
IA	17,46–22,42	20,48 ± 0,19	1,27	16,75–21,50	20,07 ± 0,26	1,18
hA	8,71–11,44	10,01 ± 0,11	0,72	7,45–11,41	9,97 ± 0,23	1,03
IP	13,33–16,41	14,65 ± 0,12	0,77	12,55–15,66	14,23 ± 0,19	0,86
IV	8,51–14,70	10,93 ± 0,18	1,21	8,20–11,68	10,16 ± 0,18	0,81
IC	11,69–14,82	13,23 ± 0,13	0,83	11,71–15,12	13,28 ± 0,19	0,86
<i>Пластические признаки (в % от длины головы)</i>						
qm	55,30–66,19	60,36 ± 0,35	2,29	58,27–68,18	63,43 ± 0,59	2,62
ag	20,00–29,50	24,24 ± 0,28	1,83	19,82–27,27	24,07 ± 0,39	1,76
gn	26,67–31,53	29,00 ± 0,20	1,34	26,56–32,00	29,24 ± 0,27	1,21
no	43,75–50,91	46,40 ± 0,26	1,71	44,88–50,00	47,30 ± 0,32	1,41

1/10 часть длины тела. Примерно такие же параметры имеют длина основания и высота спинного плавника. Длина брюшного плавника, как и спинного анального, также примерно составляет 1/10 длины тела ($10,93 \pm 0,18$ и $10,16 \pm 0,18$). Наибольшая высота тела практически в 10 раз больше его наименьшей высоты (соответственно $17,80 \pm 0,16$ и $1,98 \pm 0,02$ у колюшки из р. Кречет; $21,46 \pm 0,29$ и $1,99 \pm 0,03$ у колюшки из р. Тур).

По нашим данным, длина головы девятииглой колюшки из водоемов бассейна р. Припять составляет чуть больше 1/4 длины тела без С ($26,57 \pm 0,14$ и $26,49 \pm 0,17$), длина рыла – 1/4 часть длины головы ($24,24 \pm 0,28$ и $24,07 \pm 0,39$), а заглазничное расстояние в 2 раза больше длины рыла ($46,40 \pm 0,26$ и $47,30 \pm 0,32$).

Необходимо отметить, что до проведения настоящих исследований показатели пластических признаков девятииглой колюшки из водоемов Беларуси в научной литературе опубликованы не были. Данные, приведенные в монографии П. И. Жукова «Рыбы Белоруссии» [18], касаются только отдельных меристических признаков девятииглой колюшки в ареале. Таким образом, представленные выше материалы являются первым описанием морфометрических признаков девятииглой колюшки не только в новых условиях обитания (в водоемах бассейна Черного моря – бассейне р. Припять), но и в целом для водоемов Беларуси.

Заключение. В результате анализа морфометрических показателей девятииглой колюшки из водных объектов бассейна Черного моря (реки Кречет и Тур) и выявления их особенностей в новых условиях обитания установлено следующее:

девятииглая колюшка из водоемов бассейна р. Припять (в пределах Беларуси) представлена особями без костных пластин по боку тела;

разброс значений меристических признаков девятииглой колюшки для бассейна р. Припять в целом не выходит за пределы колебаний признаков для вида в ареале.

Список использованных источников

1. Зюганов, В. В. Фауна СССР. Рыбы. Семейство колюшковых (Gasterosteidae) мировой фауны / В. В. Зюганов. – Л. : Наука, 1991. – Т. 5, вып. 1. – 258 с.
2. Соколов, Л. И. Антропогенные изменения ихтиофауны речных систем центрального района России (на примере бассейна Москвы-реки) / Л. И. Соколов, Е. А. Цепкин // Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол. – 1992. – № 1. – С. 3–39.
3. Евланов, И. А. Кадастр рыб Самарской области / И. А. Евланов, С. В. Козловский, П. И. Антонов. – Тольятти : Ин-т зоологии Волж. бассейна, 1998. – 222 с.
4. Зусмановский, Г. С. О находке девятииглой колюшки (*Pungitius pungitius*, L.) в г. Ульяновске / Г. С. Зусмановский, В. А. Назаренко // VII съезд Гидробиологического общества РАН (Казань, 14–20 окт. 1996 г.) : материалы съезда. – Казань, 1996. – С. 143–145.
5. Инвазии чужеродных рыб в бассейнах крупнейших рек Понто-Каспийского бассейна: состав, векторы, инвазионные пути и темпы / Ю. В. Слынько [и др.] // Рос. журн. биол. инвазий. – 2010. – № 4. – С. 74–89.
6. Грацианов, В. И. Опыт обзора рыб Российской империи в систематическом и географическом отношении / В. И. Грацианов. – М. : Тип. Вильде, 1907. – 567 с. – (Труды Отдела ихтиологии Императорского Русского общества акклиматизации животных и растений ; т. 4).
7. Vasil'eva, E. D. Main alterations in ichthyofauna of the largest rivers of the northern coast of the Black Sea in the last 50 years: a review / E. D. Vasil'eva // Folia Zool. – 2003. – Vol. 52, N 4. – P. 337–358.
8. Щербуха, А. Я. Ихтиофауна України у ретроспективі та сучасні проблеми збереження її різноманіття / А. Я. Щербуха // Vestn. zool. – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 3–18.
9. Шандиков, Г. А. Редкие виды рыб бассейна Северского Донца Северо-восточной Украины / Г. А. Шандиков, Г. Л. Гончаров // Вісн. Харківськ. Нац. ун-ту імені В. Н. Каразіна. Сер. «Біологія». – 2008. – Вип. 8, № 828. – С. 65–90.
10. Бондарев, Д. Л. Новые аутаклиматизанты в составе ихтиофауны Днепровско-Орельского природного заповедника / Д. Л. Бондарев, О. А. Христов, В. Н. Кочет // Проблемы аквакультуры и функционирования водных экосистем : междунар. науч.-практ. конф. мол. ученых. – Киев, 2002. – С. 17–19.
11. Бондарев, Д. Л. Фауна рыб Днепровско-Орельского заповедника на современном этапе функционирования Днепровского водохранилища / Д. Л. Бондарев, О. А. Христов, В. Н. Кочет // Биологические исследования на природоохранных территориях и биологических стационарах : Юбилейная конф., посвящ. 85-летию биол. станции Харьк. гос. ун-та (Харьков. обл., Змиевский р-н, с. Гайдары, 16–19 сент. 1999 года) : тез. докл. – Харьков, 1999. – С. 31–32.
12. Аннотированный список рыб Днепровского водохранилища и его притоков / Р. А. Новицкий [и др.] // Вісн. ДНУ. Біологія, екологія. – 2005. – Т. 1, вип. 13. – С. 185–201.
13. Куницкий, Д. Ф. Роль антропогенных факторов в изменении видового состава рыб бассейна р. Припять / Д. Ф. Куницкий // Структурно-функциональное состояние биологического разнообразия животного мира Беларуси : тез. докл. VIII зоол. науч. конф. – Минск, 1999. – С. 189–191.

14. Турчин, А. В. Антропогенное воздействие как один из факторов распространения рыб семейства колюшковые Gasterosteidae / А. В. Турчин // Экологические проблемы речных экосистем : тез. Междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2010. – С. 68.
15. Турчин, А. В. Распространение представителей семейства колюшковые Gasterosteidae на территории Беларуси / А. В. Турчин // Биология внутренних вод : XIV шк.-конф. мол. ученых. – Борок, 2010. – С. 54.
16. Турчин, А. В. Современное распространение рыб семейства колюшковые Gasterosteidae на территории Белорусского Полесья / А. В. Турчин // Итоги полевого сезона 2010 : материалы регион. науч. зоол. конф. – Брест, 2010. – С. 132.
17. Биологические особенности девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) локальной популяции реки Ушаковка / А. А. Клевакин [и др.] // Рос. журн. биол. инвазий. – 2011. – № 2. – С. 86–105.
18. Жуков, П. И. Рыбы Белоруссии / П. И. Жуков. – Минск : Наука и техника, 1965. – 415 с.
19. Predation-imposed selection on threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) morphology: a test of the refuge use hypothesis / T. Leinonen [et al.] // Evolution. – 2011. – Vol. 65, iss. 10. – P. 2916–2926.
20. Leaver, S. D. Abrupt changes in defence and trophic morphology of the giant threespine stickleback (*Gasterosteus sp.*) following colonization of a vacant habitat / S. D. Leaver, T. E. Reimche // Biol. J. of the Linnean Society. – 2012. – Vol. 107, iss. 3. – P. 494–509.

References

1. Zyuganov V. V. *Fauna of the USSR. Fish. Family of gingerbread (Gasterosteidae) world fauna*. Leningrad, Science, 1991, vol. 5, no. 1. 258 p. (in Russian).
2. Sokolov L. I., Tsepkin E. A. Anthropogenic changes in the ichthyofauna of the river systems of the central region of Russia (on the example of the Moscow River basin). *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16, Biologiya* [Bulletin of the Moscow University. Series 16, Biology], 1992, no. 1, pp. 3–39 (in Russian).
3. Evlanov I. A., Kozlovsky S. V., Antonov P. I. *Fish inventory of the Samara Region*. Toliatti, Institute of Zoology of the Volga Basin, 1998. 222 p. (in Russian).
4. Zusmanovskii G. S., Nazarenko V. A. About the discovery of the nine-headed stickleback (*Pungitius pungitius*, L.) in Ulyanovsk. *VII s'ezd Gidrobiologicheskogo obshchestva RAS: materialy s'ezda* [VII Congress of the Hydrobiological Society of RAS: materials of the Congress]. Kazan, 1996, pp. 143–145 (in Russian).
5. Slyn'ko Iu. V., Dgebuadze Iu. Iu., Novitskii R. A., Khristov O. A. Invasion of alien fish in the basins of the largest rivers of the Ponto-Caspian basin: composition, vectors, invasive pathways and rates. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii* [Russian Journal of Biological Invasions], 2010, no. 4, pp. 74–89 (in Russian).
6. Gratsianov V. I. *The experience of reviewing the fish of the Russian Empire in a systematic and geographic sense*, Proceedings of the Department of the Ichthyology of the Imperial Russian Society for the Acclimatization of Animals and Plants, vol. 4. Moscow, Typography Wilde, 1907. 567 p. (in Russian).
7. Vasil'eva E. D. Main alterations in ichthyofauna of the largest rivers of the northern coast of the Black Sea in the last 50 years: a review. *Folia Zoologica*, 2003, vol. 52, no. 4, pp. 337–358.
8. Scherbuha A. J. Retrospective of ichthyofauna of Ukraine and Contemporary Problems of Preserving its Diversity. *Vestnik zoologii* [Herald of zoology], 2004, vol. 38, no. 3, pp. 3–18 (in Russian).
9. Shandikov G. A., Goncharov G. L. Rare species of fish in the Seversky Donets basin of North-Eastern Ukraine. *Visnik Kharkivskogo natsional'nogo universitetu imeni V. N. Karazina, Seriya "Biologiya"* [News of Kharkiv National University V. N. Karazina, Seriya "Biology"], 2008, iss. 8, no. 828, pp. 65–90 (in Russian).
10. Bondarev D. L., Khristov O. A., Kochet V. N. New autoklimatizanty in the composition of the ichthyofauna of the Dnieper-Orel nature reserve. *Problemy akvakul'tury i funkcionirovaniia vodnykh ekosistem : mezhdunarodnaia nauchno-prakticheskaya konferentsiia molodykh uchenykh* [Problems of aquaculture and functioning of aquatic ecosystems: the international scientific-practical conference of young scientists]. Kiev, 2002, pp. 17–19 (in Russian).
11. Bondarev D. L., Khristov O. A., Kochet V. N. Fauna of the fishes of the Dnieper-Orel Reserve at the present stage of the functioning of the Dnieper reservoir. *Biologicheskie issledovaniia na prirodookhrannykh territoriiakh i biologicheskikh stantsionakh : Iubileinaia konferentsiia, posviashchennaia 85-letiiu biologicheskoi stantsii Khar'kovskogo gosudarstvennogo universiteta: tezisy dokladov* [Biological studies in nature protection areas and biological hospitals: jubilee conference, devoted to the 85th anniversary of the biological station of Kharkov State University: abstracts]. Kharkov, 1999, pp. 31–32 (in Russian).
12. Novitskii R. A., Khristov O. A., Kochet V. N., Bondarev D. L. An anonymous list of fish of the Dnieper reservoir and its tributaries. *Visnik DNU. Biologiya, ekologiya* [News of the DNU. Biology, Ecology], 2005, vol. 1, no. 13, pp. 185–201 (in Russian).
13. Kunitskii D. F. The role of anthropogenic factors in changing the species composition of the fish in the basin of the river Pripyat. *Strukturno-funktsional'noe sostoianie biologicheskogo raznoobraziia zhitnogo mira Belarusi: tezisy dokladov VIII zoologicheskoi nauchnoi konferentsii* [Structural and functional state of the biological diversity of the animal world of Belarus: abstracts of the VIII zoological scientific conference], 1999, pp. 189–191 (in Russian).
14. Turchin A. V. Anthropogenic impact as one of the factors of distribution of fish of the family of the guttural Gasterosteidae. *Ekologicheskie problemy rechnykh ekosistem : tezisy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii* [Ecological problems of river ecosystems: the theses of the International scientific and practical conference], Minsk, 2010, p. 68 (in Russian).
15. Turchin A. V. Distribution of representatives of the gut family Gasterosteidae in Belarus. *Biologiya vnutrennikh vod : XIV shkola-konferentsiia molodykh uchenykh* [Biology of inland waters: XIV school-conference of young scientists]. Boroк, 2010, p. 54 (in Russian).

16. Turchin A. V. The modern distribution of fish of the family of the gingerbread Gasterosteidae in the territory of the Belorussian Polissya. *Itogi polevogo sezona 2010 : materialy regional'noi nauchnoi zoologicheskoi konferentsii* [Results of the field season 2010: materials of the regional scientific zoological conference]. Brest, 2010, p. 132 (in Russian).
17. Klevakin A. A., Loginov V. V., Moreva O. A., Tarbeev M. L. Biological features of the nine-headed stickleback *Pungitius pungitius* (Linnaeus, 1758) of the local population of the Ushakovka River. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii* [Russian Journal of Biological Invasions], 2011, no. 2, pp. 86–105 (in Russian).
18. Zhukov P. I. *Pisces of Belarus*. Minsk, Science and technology, 1965. 415 p. (in Russian).
19. Leinonen T., Herczeg G., Cano J., Merilä J. Predation-imposed selection on threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) morphology: a test of the refuge use hypothesis. *Evolution*, 2011, vol. 65, iss. 10, pp. 2916–2926. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2011.01349.x
20. Leaver S. D., Reimche T. E. Abrupt changes in defense and trophic morphology of the giant threespine stickleback (*Gasterosteus sp.*) following colonization of a vacant habitat. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2012, vol. 107, iss. 3, pp. 494–509. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2012.01969.x

Інфармацыя аб аўторе

Ризевский Виктор Казимирович – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: RVK869@mail.ru.

Information about the author

Viktar K. Rizevsky – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: RVK869@mail.ru.

В. И. Торчик, Г. А. Холопук, А. Ф. Келько

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ ИЗОЛИРОВАНИЯ НА ПРИЖИВАЕМОСТЬ И РАЗВИТИЕ ПРИВИВОК ДЕКОРАТИВНЫХ ФОРМ ЛИСТВЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ ВИДОВ**

Аннотация. На примере трех декоративных форм с различным регенерационным потенциалом изучено влияние на приживаемость прививок пяти изолирующих веществ. Установлено, что для декоративных форм с высоким регенерационным потенциалом (ива козья *'Pendula'* и карагана древовидная *'Lorbergii'*) вещество, используемое для изоляции места прививки, не оказывает существенного влияния на приживаемость. В то же время у растений с низким регенерационным потенциалом (клен остролистный *'Globosum'*) высокая приживаемость прививок обеспечивается путем создания герметичной изоляции места прививки.

При прививке ивы козьей *'Pendula'* для изоляции места прививки рекомендуется использовать замазку садовую с добавлением Корневина (5,6 мг индолилмасляной кислоты на 1 г смеси), при которой приживаемость достигает 100 %, при прививке караганы древовидной *'Lorbergii'* – парафин медицинский, изоленту ПВХ и смесь озокерита и парафина (2:1 v/v) (приживаемость 90,0 % во всех вариантах), при прививке клена остролистного *'Globosum'* – парафин медицинский и смесь озокерита и парафина, обеспечивающих приживаемость на уровне 62,5 и 75,0 % соответственно.

Ключевые слова: древесные растения, декоративная форма, прививка, изолирующее вещество, приживаемость

Для цитирования: Торчик, В. И. Влияние способов изолирования на приживаемость и развитие прививок декоративных форм лиственных древесных видов / В. И. Торчик, Г. А. Холопук, А. Ф. Келько // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. ботан. наук. – 2017. – № 4. – С. 40–44.

U. I. Torchyk, G. A. Kholopuk, H. F. Kelko

*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***THE INFLUENCE OF ISOLATING MEANS ON THE SURVIVAL AND DEVELOPMENT OF DECIDUOUS WOODY PLANTS CULTIVARS GRAFTS**

Abstract. Using the example of three decorative forms, with different regenerative potential, the influence of five isolating substances on the grafts survival was studied. It has been established that decorative forms with a high regeneration potential (*Salix caprea 'Pendula'* and *Caragana arborescens 'Lorbergii'*), the substance used to isolate the site of grafting does not have a significant effect on survival. At the same time, in plants with a low regeneration potential (*Acer platanoides 'Globosum'*), the high survival rate of grafts is provided by creating a sealed isolation of the site of grafting.

When grafting *Salix caprea 'Pendula'* to isolate the place of grafting it is recommended to use garden putty with the addition of Kornevin (5.6 mg IBA per 1 g of mixture), at which the survival rate reaches 100%; *Caragana arborescens 'Lorbergii'* – medical paraffin, PVC insulating tape and a mixture of ozocerite and paraffin (2:1 v/v) (90.0% survival at all means), *Acer platanoides 'Globosum'* – medical paraffin and a mixture of ozocerite and paraffin that provide survival rate of 62.5% and 75.0% respectively.

Keywords: woody plants, decorative form, grafting, insulating substance, survival

For citation: Torchyk U. I., Kholopuk G. A., Kelko H. F. The influence of isolating means on the survival and development of deciduous woody plants cultivars grafts. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 40–44 (in Russian).

Введение. В современном декоративном садоводстве повышенным спросом пользуются привитые декоративные формы древесных растений, использование которых значительно расширяет возможности ландшафтных дизайнеров при проектировании и создании объектов садово-паркового строительства. Прививка садовых форм на штамп позволяет не только получить растения с необычной формой кроны (шаровидной, зонтичной, плакучей и др.), но часто является единственным способом массового размножения декоративных культиваров с низкой способностью к адвентивному корнеобразованию.

Общеизвестно, что успешность регенерации тканей при прививке определяется как эндогенными, так и экзогенными факторами, что в определенной степени позволяет управлять процессом

приживаемости компонентов прививки. В частности, можно стимулировать их срастание путем воздействия различными видами излучения, импульсным током, теплом [1–4], однако чаще всего для этой цели применяются биологически активные вещества [5–7]. Обработка проводится посредством замачивания черенков привоя перед прививкой, нанесения их непосредственно на срезы подвоя и привоя или введения раствора в зону прививки с помощью шприца [8–10]. В то же время это делает процедуру прививки более длительной и сложной, поэтому актуальным является экспериментальный подбор эффективных изолирующих материалов, которые стимулируют или ускоряют приживаемость компонентов прививки.

Цель настоящей работы – оценка эффективности влияния различных изолирующих материалов на приживаемость и развитие прививок некоторых садовых форм лиственных древесных видов.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследований использовали иву козью '*Pendula*' (*Salix caprea* '*Pendula*'), карагану древовидную '*Lorbergii*' (*Caragana arborescens* '*Lorbergii*') и клен остролистный '*Globosum*' (*Acer platanoides* '*Globosum*'), различающихся регенерационно-восстановительной способностью компонентов прививки.

Подвоем служили саженцы, выращенные в 3-литровых контейнерах. Прививку осуществляли в условиях отапливаемой теплицы, куда опытные растения помещали в середине февраля. Привой заготавливали за 2–3 сут до прививки и хранили в полиэтиленовых пакетах в холодильнике. Прививку проводили в период набухания почек (21 марта) у подвоев способом в расщеп. Обвязку прививок выполняли полосками эластичной полиэтиленовой ленты. Для изоляции места прививки использовали:

- 1) парафин медицинский, разогретый до жидкого состояния на водяной бане (+65...+67 °С);
- 2) смесь озокерита и парафина медицинского (2:1 v/v), разогретую до жидкого состояния на водяной бане (+65...+70 °С);
- 3) замазку садовую, состоящую из петролатума, полиэтилена и масла соснового;
- 4) замазку садовую с добавлением Корневина (пудра, 5 г/кг индолилмасляной кислоты (ИМК)) с концентрацией ИМК в готовой смеси 5,6 мг на 1 г смеси;
- 5) изоляционную ленту ПВХ.

Нанесение изолирующих веществ осуществляли непосредственно после фиксации привоя и подвоя обвязкой. При этом место прививки опускали в разогретый до жидкого состояния парафин или смесь парафина и озокерита. Садовую замазку и ее смесь с Корневином тщательно наносили поверх фиксирующей обвязки.

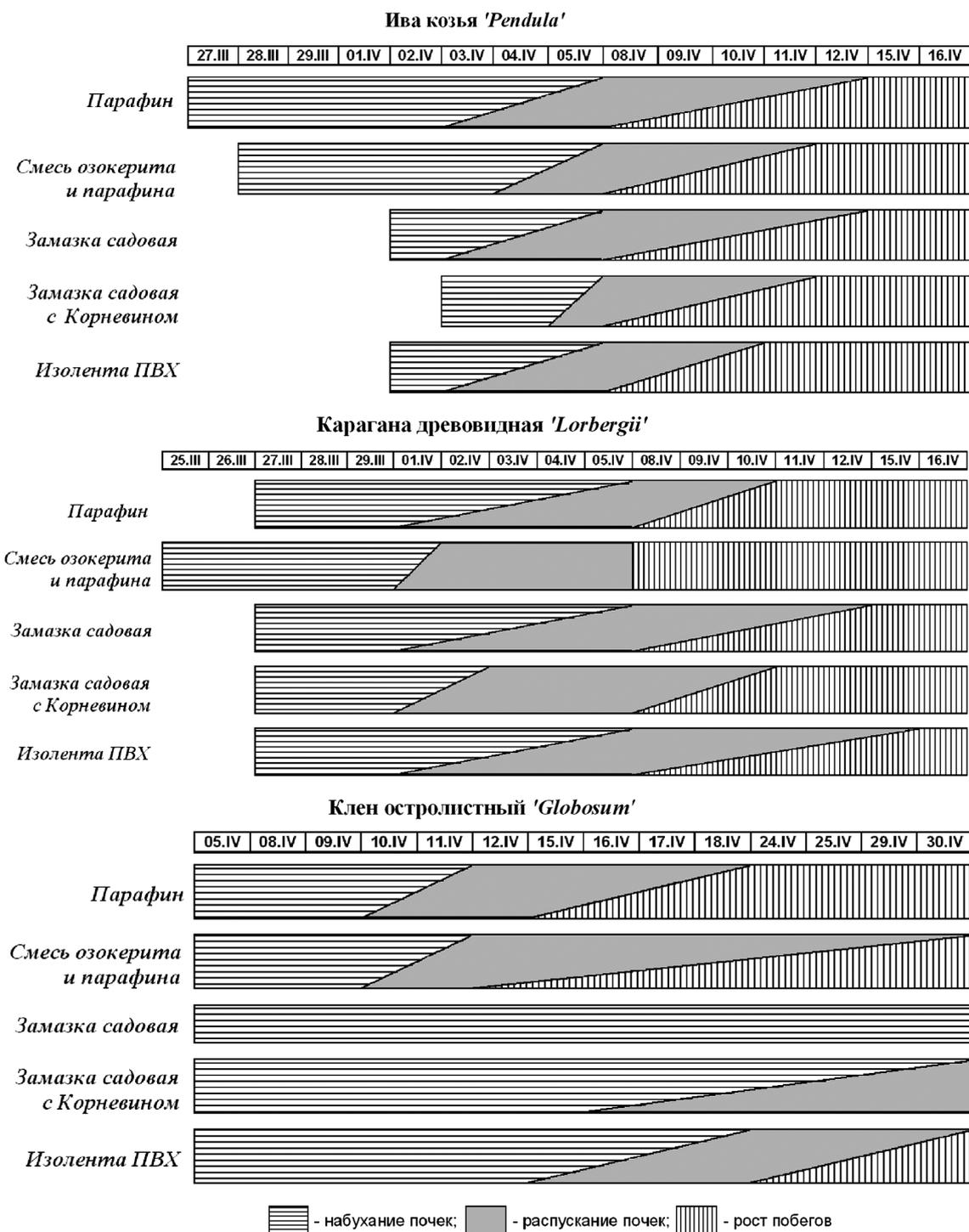
Наблюдения за развитием растений проводили по методике Совета ботанических садов СССР [11]. Фиксировали следующие фенофазы: набухание почек, распускание почек, начало и линейный рост побегов. При этом до наступления роста побегов наблюдения проводили ежедневно, а затем через 3–4 сут.

Вынос растений в открытый грунт проводили в III декаде мая при отсутствии угрозы поздних весенних заморозков. Приживаемость и годичный прирост побегов у прививок учитывали в I декаде октября.

Для обработки экспериментального материала использовали общепринятые методы описательной статистики. Достоверность различий между выборками определяли с помощью *U*-критерия Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования показали, что на развитие и рост прививок значительное влияние оказывают состав изолирующего материала и видовая принадлежность декоративной формы (см. рисунок). Наиболее отчетливо это прослеживается на примере ивы козьей '*Pendula*'. Так, при изоляции ее прививок парафином и смесью парафина с озокеритом набухание почек привоя отмечалось на 6-е и 7-е сутки соответственно после проведения прививки, тогда как при применении широко используемой для изоляции прививок садовой замазки, садовой замазки с добавлением Корневина и изолирующей ленты набухание почек наступало на 5–6 сут позже.

В опыте с караганой древовидной '*Lorbergii*' более раннее набухание почек (на 4-е сутки после прививки, т. е. на 2 сут раньше, чем в других вариантах опыта) отмечено в тех случаях, когда для изоляции прививок использовали смесь озокерита и парафина.



Феноспектр развития прививок в зависимости от изолирующего материала

Phenospectrum of grafting development depending on the insulating material

Набухание почек у привоев клена остролистного '*Globosum*' наступало значительно позже, чем у ивы и караганы, – лишь на 14-е сутки после прививки.

Следует также отметить, что от вида использованного изолирующего вещества зависели продолжительность фазы набухания почек, начало и продолжительность их распускания, а также начало роста побегов у прививок (см. рисунок). Например, несмотря на более позднее набухание почек у ивы козьей '*Pendula*', их распускание у ряда растений наступало уже на 2-е сутки при использовании замазки садовой и изоленты ПВХ, тогда как при изоляции парафином и смесью изокерита

и парафина – на 7–8-е сутки. У прививок караганы древовидной *'Lorbergii'* распускание почек, хотя и с разной степенью интенсивности, также началось одновременно, независимо от использованного изолирующего вещества.

Рост побегов как у прививок ивы козьей *'Pendula'*, так и у караганы древовидной *'Lorbergii'* во всех вариантах опыта начался одновременно – на 18-е сутки. Причем при использовании смеси озокерита и парафина в фазу роста вступили 100 % прививок, тогда как в других вариантах – от 40 до 80 %.

Приживаемость прививок ивы козьей *'Pendula'* составила 60–100 %, причем максимальный выход привитых растений получен в варианте с использованием для изоляции места прививки замазки садовой с добавлением Корневина (см. таблицу). В этом же варианте отмечался и наибольший прирост побегов.

**Влияние изолирующего материала на прирост побегов и приживаемость прививок
декоративных форм древесных растений**
**The influence of insulating material on the growth of shoots and the survival
of grafts on decorative forms of woody plants**

Изолирующий материал	Прирост побегов, см			Приживаемость прививок, %		
	Ива козья <i>'Pendula'</i>	Карагана древовидная <i>'Lorbergii'</i>	Клен остролистный <i>'Globosum'</i>	Ива козья <i>'Pendula'</i>	Карагана древовидная <i>'Lorbergii'</i>	Клен остролистный <i>'Globosum'</i>
Парафин	67,2 ± 9,6 ^{ab}	52,5 ± 1,8 ^a	21,3 ± 5,0 ^a	80,0 ± 20,0	90,0 ± 10,0	75,0 ± 0,0
Смесь озокерита и парафина	60,1 ± 4,4 ^b	49,5 ± 3,6 ^{ab}	12,6 ± 1,3 ^a	60,0 ± 0,0	90,0 ± 10,0	62,5 ± 12,5
Замазка садовая	62,6 ± 6,0 ^b	43,2 ± 2,5 ^b	0	70,0 ± 10,0	60,0 ± 0,0	0
Замазка садовая с Корневином	79,0 ± 2,7 ^a	52,7 ± 4,6 ^{ab}	0	100 ± 0,0	70,0 ± 10,0	0
Изолента ПВХ	73,1 ± 9,4 ^{ab}	55,1 ± 4,9 ^a	3,5 ± 0,0 ^b	70,0 ± 10,0	90,0 ± 10,0	12,5 ± 12,5

Примечание. Средние значения, отмеченные одинаковыми буквами в рамках одной декоративной формы, не различаются значимо с вероятностью 95 %.

Максимальная приживаемость прививок караганы древовидной *'Lorbergii'* получена при использовании в качестве изолирующего материала парафина, смеси парафина с озокеритом и изоленты. Средний выход привитых растений достигал 90 %. В этих же вариантах наблюдался и максимальный прирост побегов. При применении замазки садовой, в том числе с добавлением Корневина, приживаемость прививок была на 20–30 % ниже.

Рост побегов у привоев клена остролистного *'Globosum'* при использовании смеси озокерита и парафина начался на 21-е сутки, при использовании парафина – на 3 сут позже. В вариантах с применением изоленты и замазки садовой с Корневином начало роста побегов у некоторых прививок пришлось лишь на 33-и сутки, и на этом этапе развитие остановилось. При использовании замазки садовой наблюдалось лишь набухание почек у ряда привоев. Наиболее интенсивный рост побегов отмечался у прививок, для изоляции которых использовался парафин, при этом величина прироста не отличалась значимо от варианта с использованием смеси озокерита и парафина.

Заключение. Экспериментально установлено, что на приживаемость прививок влияние оказывает вещество, используемое для изоляции места прививки, действие которого зависит от уровня регенерационного потенциала компонентов прививки. Для декоративных форм с высоким регенерационным потенциалом (ива козья *'Pendula'* и карагана древовидная *'Lorbergii'*) вещество, используемое для изоляции, не оказывает решающего влияния на приживаемость прививок. В то же время у растений с низким регенерационным потенциалом (клен остролистный *'Globosum'*) высокая приживаемость прививок обеспечивается путем создания герметичной изоляции места прививки.

Список использованных источников

1. Способ стимулирования приживаемости прививки : пат. РФ № 2370018 / А. С. Демидов, М. Т. Кръстев, И. А. Бондорина, И. Г. Жукова, И. В. Карьянова ; дата публ. 20.10.2009.
2. Способ обработки прививок садовых культур : пат. РФ № 2424653 / М. Т. Упадышев, В. И. Донецких, Г. Ю. Упадышева ; дата публ. 27.07.2011.

3. Средство для стимулирования срастания прививок : пат. СССР № 1683623 ; МПК А01N 45/00 / Е. В. Плоский, А. Г. Оникийчук, Ф. Н. Гридин, А. Б. Левин, В. Г. Страхов ; дата публ. 15.10.1991.
4. Состав для улучшения срастания прививок яблони : пат. СССР № 1395254 ; МПК А01N 37/44 / А. Г. Оникийчук, В. Г. Страхов, А. Б. Левин, А. Ф. Пожарицкий ; дата публ. 15.05.1988.
5. Бондорина, И. А. Воздействие физиологически активных веществ на процессы регенерации у древесных растений : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.02.01 / И. А. Бондорина ; Гос. бот. сад им. Н. В. Цицина Рос. акад. наук. – М., 2012. – 40 с.
6. Hormonal signaling in rootstock-scion interactions / B. Aloni [et al.] // *Scientia Horticulturae*. – 2010. – Vol. 127. – P. 119–126.
7. Самощенко, Е. Г. Способы применения регуляторов роста при зимней и весенней прививке сливы / Е. Г. Самощенко, А. А. Слукин // *Изв. ТСХА*. – 2003. – Вып. 3. – С. 102–118.
8. Влияние микроэлементов и стимуляторов роста на процессы срастания зимних прививок яблони / А. Г. Оникийчук [и др.] // *Вопросы биологии и агротехники плодовых культур* : сб. науч. тр. / МСХ СССР; Одес. с-х. ин-т ; редкол. : А. Г. Оникийчук (отв. ред.), Ф. К. Тихомиров. – Одесса, 1985. – С. 70–74.
9. Астраханцева, Н. В. Стимуляция срастания привоя с подвоем у деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / Н. В. Астраханцева // *Вестн. КрасГАУ*. – 2013. – № 9. – С. 137–140.
10. Кръстев, М. Т. Использование физиологически активных веществ для повышения эффективности прививки / М. Т. Кръстев, И. А. Бондорина // *Вестн. КрасГАУ*. – 2009. – № 3. – С. 76–79.
11. Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР / Акад. наук СССР, Совет ботан. садов СССР ; отв. ред. П. И. Лапин. – М. : ГБС АН СССР, 1975. – 27 с.

References

1. Dyemidov A. S., Krstev M. T., Bondorina I. A., Zhukova I. G., Kar'ianova I. V. A method of stimulating grafting survival. Patent RF, 2009, no. 2370018 (in Russian).
2. Upadyshev M. T., Donetskikh V. I., Upadysheva G. Iu. Method of processing of inoculations of garden crops. Patent RF, 2011, no. 2424653 (in Russian).
3. Ploskii E. V., Onikiuchik A. G., Gridin F. N., Levin A. B., Strakhov V. G. A means for stimulating the fusion of graftings. Patent SSSR, 1991, no. 1683623 (in Russian).
4. Onikiyuchuk A. G., Strakhov V. G., Levin A. B., Pozharitskii A. F. Composition for the improvement of the growth of apple tree inoculations. Patent SSSR, 1988, no. 1395254 (in Russian).
5. Bondorina I. A. *The effect of physiologically active substances on regeneration processes in woody plants*. Abstract of D. Sc. diss., Botany. Moscow, 2012. 40 p. (in Russian).
6. Aloni B., Cohen R., Karni L., Aktas H., Edelstein M. Hormonal signaling in rootstock-scion interactions. *Scientific Horticulture*, 2010, vol. 127, pp. 119–126. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.09.003
7. Samoshchenkov E. G., Slukin A. A. Methods of application of growth regulators during winter and spring grafting of plums. *Izvestia TSKhA [News of the TACA]*, 2003, iss. 3, pp. 102–118 (in Russian).
8. Onikiyuchuk A. G., Strakhov V. G., Levin A. B. Influence of trace elements and growth stimulants on the processes of intergrowth of winter apple grafts. *Voprosy biologii i agrotekhniki plodovykh kul'tur [Issues of biology and agrotechnology of fruit crops]*, in Onikiuchuk A. G., Tikhomirov F. K. (ed.). Odessa, 1985, pp. 70–74 (in Russian).
9. Astrakhantseva N. V. Stimulation of the conjugation of the scion with stock in pine trees of *Pinus sylvestris* L. *Vestnik KrasGAU [Bulletin of the KrasSAU]*, 2013, no. 9, pp. 137–140 (in Russian).
10. Kr'stev M. T., Bondorina I. A. Use of physiologically active substances to improve the effectiveness of vaccination. *Vestnik KrasGAU [Bulletin of the KrasSAU]*, 2009, no. 3, pp. 76–79 (in Russian).
11. *The methodology of phenological observations in the botanical gardens of the USSR*, USSR Academy of Sciences, Council of Botanical Gardens of the USSR, in P. I. Lapin (ed.). Moscow, CBG AS USSR, 1975. 27 p. (in Russian).

Информация об авторах

Торчик Владимир Иванович – д-р биол. наук, доцент, заведующий сектором. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова 2В, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dendro@tut.by.

Холопук Геннадий Анатольевич – канд. с.-х. наук, ст. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова 2В, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gax.forestbat@gmail.com.

Келько Анна Федоровна – канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова 2В, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna.kelko@inbox.ru.

Information about the authors

Uladzimir I. Torchyk – D. Sc. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Department. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dendro@tut.by.

Gennadiy A. Kholopuk – Ph. D. (Agric.), Senior researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gax.forestbat@gmail.com.

Hanna F. Kelko – Ph. D. (Biol.), Junior researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna.kelko@inbox.ru.

И. К. Володько, Л. В. Завадская, С. М. Кузьменкова

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ КОЛЛЕКЦИЙ
ЦВЕТОЧНО-ДЕКОРАТИВНЫХ ЛУКОВИЧНЫХ РАСТЕНИЙ**

Аннотация. Предложена методика мониторинга состояния коллекций цветочно-декоративных луковичных растений, в основе которой – балльная система оценки информативных биологических показателей, характеризующих состояние растений. В качестве оцениваемых показателей определены 9: зимостойкость растений; повреждаемость весенними заморозками; поражение бактериальными или грибными болезнями; поражение вирусной инфекцией; заселенность вредителями; сохранение декоративных параметров и репродуктивной способности, свойственных данному сорту; общефизиологическое состояние растений; динамика численности сортообразца. Общее состояние отдельно взятого сорта коллекции оценивается по совокупности всех показателей и считается «отличным» при сумме баллов оцениваемых параметров 85–100 % от максимально возможной суммарной оценки; «хорошим» – при 70–84 %; «удовлетворительным» – при 55–69 %. Если сумма баллов оцениваемых параметров менее 50 % от максимально возможной суммарной оценки, состояние сорта «критическое».

Результаты оценки сортов используют для мониторинга состояния коллекции в целом. При «отличном» состоянии коллекции доля сортов с оценками «удовлетворительное» и «критическое» составляет менее 10 %, при «хорошем» – 11–20, при «удовлетворительном» – 21–30, при «плохом» – более 30 %.

Приведены результаты апробации методики на примере коллекции расщепленнокорончатых нарциссов.

Ключевые слова: сорта, коллекция, мониторинг, признаки, расщепленнокорончатые нарциссы, *Narcissus*, Amaryllidaceae

Для цитирования: Володько, И. К. Мониторинг состояния коллекций цветочно-декоративных луковичных растений / И. К. Володько, Л. В. Завадская, С. М. Кузьменкова // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 45–51.

I. K. Volodko, L. V. Zavadskaya, S. M. Kuzmenkova

*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***MONITORING OF ORNAMENTAL BULBOUS PLANTS COLLECTIONS**

Abstract. The description of monitoring a technique of a condition of flower-decorative collection bulbous plants is given. The methodology is based on a scoring system for evaluating information biological indicators that characterize the state of plants. As the evaluated indicators, 9 were determined: winter hardiness of plants, damage to spring frosts, plants damage by bacterial or fungal diseases, infection with viral infection, pest population, preservation of decorative parameters and reproductive capacity inherent in this variety, general physiological state, dynamics of the number of varieties. The general condition of a single variety is “estimated” by the totality of all indicators and is considered excellent for the sum of the estimated parameters of 85–100 %, of the maximum possible total score; “good” at 70–84 %, “satisfactory” at 55–69 %, “critical” at 50 %.

Results of the assessment of varieties are used to monitor the status of the collection as a whole. With the excellent status of the collection, the proportion of varieties with “satisfactory” and “critical” ratings is less than 10 %, with a “good” 11–20 %, with a “satisfactory” 21–30 %, with a “poor” 30 %.

The results of approval of a technique of monitoring on the example of a collection of split-daffodils are given.

Keywords: cultivars, collection, monitoring, integral features, split-corona daffodils, *Narcissus*, Amaryllidaceae

For citation: Volodko I. K., Zavadskaya L. V., Kuzmenkova S. M. Monitoring of ornamental bulbous plants collections. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 45–51 (in Russian).

Введение. Коллекции живых растений, собираемые ботаническими садами, имеют важное научное, познавательное и практическое значение. Они являются резерватом генофонда растительного мира, отражают его биоразнообразие, служат источником для отбора ценных форм и сортов, перспективных для селекции и непосредственного использования.

Растения коллекций постоянно испытывают воздействие разных, часто неблагоприятных факторов внешней среды, которые влияют на процессы их жизнедеятельности и физиологическое

состояние. Для обеспечения сохранности коллекционных образцов необходима отлаженная, постоянно действующая система контроля состояния растений, так называемый мониторинг. Мониторинг лесных экосистем, городских зеленых насаждений концептуально отработан и уже реализуется на практике [1–4]. Мониторинг состояния растений в ботанических коллекциях на сегодняшний день находится на стадии становления.

Цель данной работы – разработка и апробация методики оценки состояния коллекций цветочно-декоративных травянистых растений.

Объекты и методы исследования. Исследования по апробации методики проводились в лаборатории интродукции и селекции орнаментальных растений ЦБС НАН Беларуси в 2006–2014 гг. на разрезнокорончатых сортах коллекции нарциссов (*Narcissus × hybridus hort.*) [5, 6]. В основу методики мониторинга положена балльная система оценки наиболее информативных биологических показателей, характеризующих состояние растений [7]. В качестве оцениваемых показателей определены 9: зимостойкость растений; повреждаемость весенними заморозками; поражение бактериальными или грибными болезнями; поражение вирусной инфекцией; заселенность вредителями; сохранение декоративных параметров и репродуктивной способности, свойственных данному сорту; общефизиологическое состояние растений; динамика численности сортообразца.

Каждый показатель оценивается по 5-балльной шкале. Для каждого из них вводится коэффициент значимости.

Зимостойкость – важный показатель, определяющий возможность промышленного использования многолетних растений. Оценивается визуально в период весеннего отрастания: 5 баллов получают сорта без выпадов; 4 балла, если гибель растений сорта доходит до 10 %; 3 балла при потерях от 11 до 30 %; 2 балла при гибели от 31 до 50 % растений сорта; 1 балл, если выпало более 50 %. Коэффициент значимости признака – 1,5.

Степень повреждения растений заморозками определяется спустя несколько дней после того, как минует угроза возвращения заморозков. Образцы без видимых повреждений получают 5 баллов; 4 балла, если частично повреждено до 25 % растений коллекционного образца; 3 балла, если число поврежденных растений колеблется от 26 до 50 %; 2 балла при частичном повреждении 51–75 % растений; 1 балл, если все растения образца подмерзли. Коэффициент значимости признака – 1,1.

Поражение бактериальными или грибными болезнями оценивается в полевых условиях или в период хранения посадочного материала. Если признаки заболевания у растений отсутствуют, то сорт оценивается 5 баллами. При поражении до 10 % растений оценка составляет 4 балла. При доле 11–30 и 31–50 % инфицированных растений оценка снижается до 3 и 2 баллов соответственно. Состояние сорта, при котором поражено более 50 % растений, оценивается 1 баллом. Коэффициент значимости признака – 3,0.

Поражение вирусной инфекцией и вредителями оценивается визуально по внешнему виду растений в период вегетации. При необходимости подтверждения наличия вирусной инфекции проводится тестирование в лабораторных условиях с использованием существующих методик диагностики. У ряда культур, в том числе у нарциссов, потери от вредителей учитываются в период хранения посадочного материала. Если признаки вирусного заболевания или поражения вредителями отсутствуют, состояние растений оценивается 5 баллами. Инфицирование или заселение вредителями до 10 % растений снижает оценку до 4 баллов. Увеличение доли растений с признаками вирусной инфекции и присутствия вредителей до 30 и 50 % оценивается 3 и 2 баллами соответственно; 1 баллом оценивается состояние образца, более 50 % растений которого имеют симптомы болезни или заселены вредителями. Коэффициенты значимости признака поражаемости растений вирусной инфекцией – 3,0, вредителями – 2,0.

Оценка сохранения растениями декоративных параметров и репродуктивной способности, свойственных тому или иному сорту, осуществляется аналогично и позволяет судить об их адаптационных возможностях в местных условиях. Коллекционные образцы, которые полностью сохраняют декоративные и репродуктивные качества, заявленные оригинаторами (норма), получают 5 баллов. Сорта, у которых показатели отличаются от оригинальных на 10–20 %, оцениваются в 4 балла. Образцы, у которых соответствующие норме декоративные и репродуктивные

особенности выявлены лишь у 60–79 % растений, оценивают в 3 балла. При уменьшении доли растений, соответствующих норме до 40–59 %, оценочный балл снижают до 2. При наличии в образце не более 40 % растений, соответствующих эталону, оценка не превышает 1 балла. Коэффициенты значимости признаков для декоративных параметров – 1,5, для репродуктивности – 1,3.

Для оценки общезиологического состояния растений используется биофизический метод регистрации переменной флуоресценции, характеризующий фотосинтетическую активность ассимилирующего аппарата. Фиксируется потенциальный квантовый выход превращения фотохимической энергии в центрах фотосистемы у освещенного образца – Yield (Y) с помощью портативного флуометра PAM-2100 (Германия). Оценка проводится путем сравнения средних показателей из выборки в 11 измерений, сделанных в утренние часы (до попадания прямых солнечных лучей на растения) или в пасмурную погоду [8, 9]. Максимальные 5 баллов получают сорта, у которых $Y = 0,70-0,81$; 4 балла, если $Y = 0,60-0,69$; 3 балла в случае, если $Y = 0,50-0,59$; 2 балла, если $Y = 0,40-0,49$; 1 балл, если $Y < 0,40$. Коэффициент значимости признака – 2,0.

Динамика численности растений в сорте – важный интегральный показатель его отношения к абиотическим и биотическим факторам внешней среды. Соответствие количества растений первоначально высаженному оценивается 5 баллами. Снижение числа растений сорта до 75 % оценивают в 4 балла. Если число растений образца уменьшается по сравнению с первоначальным количеством до 50–74 и 25–49 % оценки не превышают 3 и 2 баллов соответственно; 1 баллом оценивается сорт, представленный единичными экземплярами от первоначального количества. Коэффициент значимости признака – 1,0.

Общее состояние отдельно взятого сорта в коллекции оценивается по совокупности всех показателей. Оно считается «отличным», если сумма баллов оцениваемых параметров составляет 85–100 % от максимально возможной суммарной оценки; «хорошим» – при 70–84 %, «удовлетворительным» – при 55–69 %. При сумме баллов оцениваемых параметров менее 50 % от максимально возможной суммарной оценки состояние сорта считается «критическим».

Результаты оценки сортов используются для мониторинга состояния коллекции в целом. При «отличном» состоянии коллекции доля сортов с оценками «удовлетворительное» и «критическое» занимает в ней менее 10 %. При «хорошем» состоянии коллекции таких сортов в ее составе от 11 до 20 %. Состояние коллекции можно считать «удовлетворительным», если число сортов с минимальными оценками составляет 21–30 % от ее состава. При «плохом» состоянии коллекции доля сортов с перечисленными выше оценками превышает 30 % коллекционного фонда.

Разработанная методика мониторинга состояния цветочно-декоративных травянистых растений апробирована на коллекции нарциссов. Объектом изучения служили 67 сортов культуры из группы расщепленнокорончатые.

Результаты и их обсуждение. Анализ результатов мониторинга состояния сортов расщепленнокорончатых нарциссов (см. таблицу) показал, что нарциссы оцениваемой группы при мульчировании посадок вполне зимостойки, выпадов в зимний период не отмечено ни у одного из сортов, поэтому все они получили максимально возможный балл – 7,5. Весенние заморозки, ежегодно имеющие место в последних числах апреля, не повлияли на декоративные качества растений. Все сорта по данному показателю оценены по максимуму (5,5 балла).

При изучении восприимчивости сортов расщепленнокорончатых нарциссов к грибным и бактериальным болезням установлено, что они чаще страдают от бактериальных гнилей. Проведенный мониторинг по данному признаку показал, что 25 (37,3 %) сортов из числа изученных устойчивы к этому виду инфекции. Их состояние оценено 15 баллами. У 29 (43,2 %) сортообразцов бактериальными гнилями поражено до 10 % растений, оценка их состояния – 12 баллов. Степень поражения 13 (17 %) сортов достигла 30 %, оценка их состояния по данному показателю – 9 баллов.

По устойчивости к вирусной инфекции сорта нарциссов распределились следующим образом: 49 (73,1 %) сортов оказались относительно устойчивыми, пораженных растений среди них не отмечено, с учетом значимости признака они получили оценку 15 баллов; 13 сортов расщепленнокорончатых нарциссов (19,4 % выборки) получили оценку 12 баллов, так как на листовых пластинках единичных растений каждого сортообразца отмечена штриховатость, указывающая на присутствие вируса; степень поражения растений 4 (6 %) сортов достигла 30 %, поэтому их оценка

Результаты мониторинга состояния сортов расщепленнокорончатых нарциссов
Results of monitoring the condition of varieties of split-root daffodils

Сорт	Максимальная оценка признака, балл										Сумма баллов от максимально возможной, %	Состояние сорта
	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82		
	Зимостойкость	Весенние заморозки	Грибные или бактериальные болезни	Вирусная инфекция	Вредители	Сохранение декоративных свойств	Сохранение репродуктивной способности	Общепедагогическое состояние	Численность сортообразца	Суммарная оценка		
All Round	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	8	5	80	97,6	Отличное
Arena	7,5	5,5	9	12	6	7,5	6,5	10	3	67	81,7	Хорошее
Articol	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
Baccarat	7,5	5,5	9	12	8	7,5	6,5	8	5	69	84,1	Хорошее
Belcanto	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Brandaris	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Broadway Star	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Burning Heart	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Canasta	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
Cassata	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Chanterelle	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Chevreuse	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Colblanc	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Colorama	7,5	5,5	9	12	6	7,5	6,5	10	3	67	81,7	Хорошее
Colorange	7,5	5,5	12	12	8	7,5	6,5	10	4	73	89	Отличное
Congress	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Egard	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Elisabeth Bas	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Elyse	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Estella de Mol	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Etincelante	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Firestreak	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
First Lady	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	8	5	80	97,6	Отличное
Fresco	7,5	5,5	15	12	10	7,5	6,5	8	5	77	93,9	Отличное
Frileuse	7,5	5,5	12	3	6	7,5	6,5	8	3	59	71,9	Хорошее
Gold Collar	7,5	5,5	9	12	6	7,5	6,5	10	3	67	81,7	Хорошее
Holliday Sun	7,5	5,5	12	15	10	7,5	6,5	10	5	79	96,3	Отличное
Jeanne d'Arc	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
Jester	7,5	5,5	9	12	8	7,5	6,5	10	5	71	86,6	Отличное
Jolly Coeur	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
King Size	7,5	5,5	9	15	6	7,5	6,5	10	2	69	84,1	Хорошее
La Argentina	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
Lemon Beauty	7,5	5,5	12	15	6	7,5	6,5	10	4	74	90,2	Отличное
Love Call	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Marie Jose	7,5	5,5	9	15	6	7,5	6,5	10	3	70	85,4	Отличное
Mistral	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
M-m Butterfly	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
Modesta	7,5	5,5	9	9	6	7,5	6,5	10	4	65	79,3	Хорошее
Molls Hobby	7,5	5,5	9	15	8	7,5	6,5	10	4	73	89	Отличное
Mondial	7,5	5,5	12	12	8	7,5	6,5	10	3	72	87,8	Отличное
Mondragon	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Хорошее
Moonbird	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	3	75	91,5	Отличное
Nippon	7,5	5,5	9	15	6	7,5	6,5	10	3	70	85,4	Отличное
Obelisk	7,5	5,5	9	12	6	7,5	6,5	8	3	65	79,3	Хорошее
Oecumene	7,5	5,5	9	12	6	7,5	6,5	10	4	68	82,9	Хорошее

Окончание таблицы

Сорт	Максимальная оценка признака, балл										Сумма баллов от максимально возможной, %	Состояние сорта
	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82		
	Зимостойкость	Весенние заморозки	Грибные или бактериальные болезни	Вирусная инфекция	Вредители	Сохранение декоративных свойств	Сохранение репродуктивной способности	Общезиологическое состояние	Численность сортообразца	Суммарная оценка		
Orangery	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Palmares	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Papillon Blanc	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	8	4	74	90,2	Отличное
Parisienne	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Peach Melba	7,5	5,5	12	15	6	7,5	6,5	10	4	74	90,2	Отличное
Pearl-Shell	7,5	5,5	12	12	8	4,5	6,5	10	3	69	84,1	Хорошее
Perlax	7,5	5,5	12	15	10	7,5	6,5	10	5	79	96,3	Отличное
Pick Up	7,5	5,5	12	15	10	7,5	6,5	10	5	79	96,3	Отличное
Pico-Bello	7,5	5,5	9	15	6	7,5	6,5	8	3	68	82,9	Хорошее
Pomeranza	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	5	77	93,9	Отличное
Printal	7,5	5,5	12	15	10	7,5	6,5	10	4	78	95,1	Отличное
Roussilon	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Royal Highness	7,5	5,5	15	15	8	7,5	6,5	10	5	80	97,6	Отличное
Rungis	7,5	5,5	15	15	10	7,5	6,5	10	5	82	100	Отличное
Sanserre	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	4	76	92,7	Отличное
Sorbet	7,5	5,5	12	15	8	7,5	6,5	10	3	75	91,5	Отличное
Split	7,5	5,5	12	12	6	7,5	6,5	10	4	71	86,6	Отличное
Sun Collar	7,5	5,5	12	9	6	7,5	6,5	10	3	67	81,7	Хорошее
Tiritomba	7,5	5,5	12	15	6	7,5	6,5	10	5	75	91,5	Отличное
Top Hit	7,5	5,5	12	9	10	7,5	6,5	10	5	73	89,0	Отличное
Travertine	7,5	5,5	12	12	8	7,5	6,5	10	5	74	90,2	Отличное
Vincennes	7,5	5,5	12	9	6	4,5	6,5	10	3	64	78,0	Хорошее

составила 9 баллов; 1 сорт получил минимально возможный балл – 3, поскольку все его растения имели признаки вирусной инфекции.

Учет поврежденного вредителями посадочного материала разрезнокорончатых нарциссов показал, что нарциссная муха повреждает не все сорта в одинаковой степени. Лишь 17 (25 %) сортов оказались для нее предпочтительней. Их состояние оценено 6 баллами. У 34 (50,7 %) сортов, оцененных 8 баллами, вредителями были поражены отдельные луковицы. Луковицы 16 сортов (23,9 % коллекции расщепленнокорончатых нарциссов) не имели признаков повреждения нарциссной мухой, поэтому их оценка была максимальной – 10 баллов.

Практически все сорта получили максимум баллов (7,5 и 6,5) по признакам «сохранение декоративных параметров и репродуктивной способности, свойственных данному сорту». Исключением стал сорт Vincennes, коэффициент размножения которого составил лишь 60 % от нормы.

Общезиологическое состояние у 87 % расщепленнокорончатых нарциссов (59 сортов) было оценено как «отличное» (10 баллов) и лишь у 8 сортов (13 % от общего числа изученных) оно было «хорошим» (8 баллов).

Количество растений у 42 сортов соответствовало норме, принятой для культуры (24 посадочные единицы), их оценка составила 5 баллов; 10 сортов оценены 4 баллами из-за меньшего, чем принято, количества растений в сорте. Оценка 14 сортов составила 3 балла, так как численность посадочного материала в сортообразце – 50 % от необходимого количества. На грани исчезновения находится сорт King Size (показатель оценен 2 баллами).

Суммируя оценки, полученные по каждому признаку, и сопоставляя с максимально возможной их суммарной оценкой, приходим к выводу, что 54 изученных сорта находятся в отличном состоянии. Сумма их интегральных показателей по сравнению с максимально возможной оценкой (82 балла)

составляет 86,6–100 %. Состояние 13 сортов хорошее, так как сумма баллов находится в пределах 71,9–84,1.

Проведенный мониторинг состояния сортов лег в основу оценки состояния коллекции расщепленнокорончатых нарциссов. Согласно предлагаемой методике, сортов с оценкой «удовлетворительно» в этой коллекции нет, поэтому ее состояние оценено как «отличное».

Заключение. Модифицированная нами методика оценки сортов декоративных растений может быть использована для мониторинга состояния коллекций цветочно-декоративных луковичных растений. Ввиду биологических особенностей различных цветочных растений предложенные для оценки коллекции нарциссов интегральные показатели не могут являться универсальными. При оценке состояния коллекций других культур должны конкретизироваться устанавливаемые коэффициенты значимости того или иного признака.

Список использованных источников

1. Якубов, Х. Г. Актуальные проблемы изучения фито- и микобиоты / Х. Г. Якубов // Сб. науч. ст. / Белорус. гос. ун-т; под ред. В. Д. Поликсеновой. – Минск, 2004. – С. 278–280.
2. Антанайтис, В. Предисловие / В. Антанайтис // Мониторинг лесных экосистем : тез. докл. науч. конф. (Каунас, 05–06.06.1986) / Акад. наук ЛитССР, Секция лес. хоз-ва ЗО ВАСХНИЛа, Литов. с.-х. акад.; [редкол.: Антанайтис В. В. (предс.) и др.]. – Каунас, 1986. – С. 3–6.
3. Демидов, А. С. Экология большого города / А. С. Демидов // Проблемы содержания зеленых насаждений и городских лесов в условиях Москвы : материалы общегород. конф., Москва, 10 сент. 2003 г. – М., 2004. – Вып. 9. – С. 39–42.
4. Кавеленова, Л. М. Ботанические исследования в азиатской России / Л. М. Кавеленова // Материалы XI съезда Рус. бот. о-ва (18–22 авг. 2003 г., Новосибирск–Барнаул). – Барнаул, 2003. – Т. 3. – С. 311–312.
5. Володько, И. К. Информационное сопровождение мониторинга состояния коллекций живых растений в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси / И. К. Володько, С. М. Кузьменкова, О. А. Носиловский // Теоретические и прикладные аспекты интродукции растений как перспективного направления развития науки и народного хозяйства : материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию со дня образования Центр. бот. сада НАН Беларуси, Минск, 12–15 июня 2007 г. : в 2 т. / Нац. акад. наук Беларуси, Центр. бот. сад; [редкол.: В. Н. Решетников (гл. ред.) и др.]. – Минск, 2007. – Т. 2. – С. 12–14.
6. Володько, И. К. Мониторинг состояния расщепленнокорончатых нарциссов коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси / И. К. Володько, Л. В. Завадская, С. М. Кузьменкова // Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. – Київ, 2009. – № 19/21. – С. 62–64.
7. Былов, В. Н. Основы сравнительной сортооценки декоративных растений / В. Н. Былов // Интродукция и селекция цветочно-декоративных растений : [сб. ст.] / АН СССР, Науч. совет по пробл. «Интродукция и акклиматизация растений», Гл. бот. сад. – М., 1978. – С. 7–32.
8. Веселовский, В. А. Люминесценция растений / В. А. Веселовский, Т. В. Веселова. – М. : Наука, 1990. – 112 с.
9. Измерение фотосинтеза и флуоресценции листьев пшеницы при поражении мучнистой росой / Караваев В. А. [и др.] // Вестн. МГУ. Сер. 16, Биология. – 1999. – № 3. – С. 34–37.

References

1. Iakubov Kh. G. *Actual problems of studying phyto- and mycobiota*. Belarusian State University, in Poliksenova V. D. (ed.). Minsk, 2004, pp. 278–280 (in Russian).
2. Antanaitis V. Foreword. *Monitoring lesnykh ekosistem: tezisy dokladov nauchnoi konferentsii* [Monitoring of forest ecosystems: abstracts of the scientific conference]. Kaunas, 1986, pp. 3–6 (in Russian).
3. Demidov A. S. Ecology of the big city. *Problemy soderzhanii zelenykh nasazhdenii i gorodskikh lesov v usloviakh Moskvy: materialy obshchegorodskoi konferentsii* [Problems of keeping green plantations and urban forests in Moscow: the materials of the citywide conference]. Moscow, 2004, iss. 9, pp. 39–42 (in Russian).
4. Kavelenova L. M. Botanical studies in Asian Russia. *Materialy XI s'ezda Russkogo botanicheskogo obshchestva* [Materials of the XI Congress of the Russian Botanical Society]. Barnaul, 2003, vol. 3, pp. 311–312 (in Russian).
5. Volodko I. K., Kuz'menkova S. M., Nosylovsky O. A. Information support for monitoring the state of collections of living plants in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Teoreticheskie i prikladnye aspekty introduksii rastenii kak perspektivnogo napravleniia razvitiia nauki i narodnogo khoziaistva: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, posviashchennoi 75-letiiu so dnia obrazovaniia Tsentral'nogo botanicheskogo sada NAN Belarusi* [Theoretical and applied aspects of introducing plants as a prospective direction development of science and national economy: materials of the International scientific conference dedicated to the 75th anniversary of the establishment of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus]. Minsk, 2007, pp. 12–14 (in Russian).
6. Volodko I. K., Zavadskaya L. V., Kuz'menkova S. M. Monitoring the condition of split-corona Daffodils of the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Bisnik Kiivs'kogo natsional'nogo*

universitetu imeni Tarasa Shevchenka [Bulletin of the Kyiv National University of Taras Shevchenko]. Kiev, 2009, no. 19/21, pp. 62–64 (in Russian).

7. Bylov V. N. Basics of comparative assessment of ornamental plants. *Introduktsiia i selektsiia tsvetochno-dekorativnykh rastenii* [Introduction and selection of flower-ornamental plants]. Moscow, 1978, pp. 7–32 (in Russian).

8. Veselovskii V. A., Veselova T. V. *Luminescence of plants*. Moscow, Nauka, 1990, 112 p. (in Russian).

9. Karavaev V. A., Solntsev M. K., Iurina E. V., Iurina T. P. Measurement of photosynthesis and fluorescence of wheat leaves in case of powdery mildew infection. *Vestnik MGU. Seriya 16, Biologiya* [Moscow University Biological Sciences Bulletin], 1999, no. 3, pp. 34–37 (in Russian).

Информация об авторах

Володько Иван Казимирович – канд. биол. наук, зам. директора по науке. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: I.Volodko@cbg.org.by.

Завадская Людмила Викторовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: msk-hortus@mail.ru.

Кузьменкова Светлана Михайловна – заведующий сектором. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: msk-hortus@mail.ru.

Information about the authors

Ivan K. Volodko – Ph. D. (Biol.), Deputy Director for Science. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: I.Volodko@cbg.org.by.

Ludmila V. Zavadskaya – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: msk-hortus@mail.ru.

Svetlana M. Kuzmenkova – Head of the Department. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: msk-hortus@mail.ru.

Н. В. Дудчик, С. И. Сычик, О. А. Емельянова

Научно-практический центр гигиены, Минск, Республика Беларусь

ТЕСТ-МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ, КОНТАМИНИРОВАННЫХ СОЛЯМИ ЦИНКА

Аннотация. Проведена оценка интегрального токсического воздействия нитратом цинка с использованием количественной популяционной тест-модели. Обосновано применение биомаркера и биоиндикатора для оценки биологического действия контаминанта. Показано, что применение солей цинка в изученном диапазоне концентраций ингибирует дегидрогеназную активность тест-культур, при этом отмечается сильная отрицательная корреляция. Токсическое воздействие нитратом цинка приводило к увеличению продолжительности лаг-фазы в развитии популяции тест-культур в системе периодического культивирования, при этом выявлена сильная положительная корреляция. Коэффициенты детерминации изученных параметров были наиболее высокими для тест-модели *Rhodococcus sp.* ЦГ 4, что подтверждает адекватность этой тест-модели и возможность ее использования для прогноза содержания цинка в почве по изменению биоиндикаторов и биомаркеров.

Ключевые слова: количественная популяционная модель, оценка токсических эффектов, биоиндикаторы, биомаркеры

Для цитирования: Дудчик, Н. В. Тест-модель оценки интегральной токсичности почв, контаминированных солями цинка / Н. В. Дудчик, С. И. Сычик, О. А. Емельянова // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 4. – С. 52–57.

N. V. Dudchik, S. I. Sychik, O. A. Emeljanova

Scientific and Practical Center of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus

TEST MODEL FOR THE ASSESSMENT OF CUMULATIVE TOXICITY OF SOIL CONTAMINATED WITH SALTS OF ZINC

Abstract. The integral toxic effect of zinc nitrate on the quantitative population-based test model was evaluated. In the model experiment, a biomarker and a bioindicator for evaluating the biological effect of the contaminant are substantiated. It was shown that zinc salts in the studied concentration range inhibited the dehydrogenase activity of test cultures, while the dependence was negative with a strong correlation. The toxic effect of zinc nitrate led to an increase in the lag-phase test cultures population duration in the periodic system, with a strong positive correlation. The coefficients of determination of these parameters were the highest for the test model of *Rhodococcus sp.* CG 4, which confirms the adequacy of the test model, which can be used to predict the content of zinc in the soil by changing bioindicators and biomarkers.

Keywords: quantitative population model, toxic effects evaluation, bioindicators, biomarkers

For citation: Dudchik N. V., Sychik S. I., Emeljanova O. A. Test model for the assessment of cumulative toxicity of soil contaminated with salts of zinc. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 52–57 (in Russian).

Введение. В настоящее время техногенное загрязнение почв тяжелыми металлами является одной из важнейших медико-биологических проблем. Системный анализ содержания тяжелых металлов в почвах Республики Беларусь в 2013–2014 гг. выявил, что в наибольшем количестве проб с превышением гигиенических нормативов выявлены цинк и свинец. Максимальное содержание цинка на уровне 2,8–3,0 ОДК выявлено в Минске и поселке Красносельский Гродненской области. Наибольшие площади загрязнения отмечены в Новолукомле, поселке Красносельский и Минске (22,2–32,3 % изученных территорий) [1, 2].

В почвах придорожных полос также обнаружено высокое валовое содержание цинка – от 8,86 до 41,05 мг/кг, при этом максимальное загрязнение почв валовыми и подвижными формами цинка установлено на расстоянии 5–25 м от полотна дороги. В этой зоне содержание подвижных форм цинка превышало величину ПДК, составив 23 мг/кг [3, 4]. Анализ степени загрязнения городских почв тяжелыми металлами показал, что среднее содержание цинка в почвах Беларуси составляет 35,0 мг/кг [5].

В работах ряда авторов установлено, что почва является своеобразной «ловушкой» для тяжелых металлов, попадающих из воздуха и отходов, что определяет ассоциированные токсические воздействия на почвенные флору, фауну и микробиоту. Ингибирование роста, индукция ферментов, продукция стрессовых белков весьма важны в качестве «конечных точек» для определения токсических воздействий [6–15].

Кинетика ингибирования химическими факторами развития и роста биологических популяций сложна и недостаточно разработана. Ранее нами показано, что импедиметрическое выявление особенностей развития популяции микроорганизмов в условиях периодической культуры, дополненное метаболическими и культурально-морфологическими маркерами, является перспективным для количественного определения зависимости «доза–эффект» в условиях токсического воздействия. Использование импедансной технологии дает возможность изучить параметры динамических моделей, в том числе детекцию степени ингибирования или стимулирования роста популяции тест-культуры химическими контаминантами в режиме реального времени [7–11].

Цель работы – разработать популяционную тест-модель для оценки токсического воздействия солей цинка.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования были образцы почв, экспериментально контаминированные нитратом цинка для разработки и валидации популяционной тест-модели оценки его токсического воздействия. Предварительный химический анализ почв подтвердил, что содержание тяжелых металлов, в том числе цинка, не превышало гигиенических нормативов.

В качестве тест-культур использовали чувствительные почвенные микроорганизмы *Azotobacter sp.* БИМ-74, *Arthrobacter sp.* ЦГ 1, *Rhodococcus sp.* ЦГ 4.

В работе использовали стандартные средства измерений и основное оборудование микробиологических лабораторий, которые были должным образом проверены и калиброваны. Импедиметрические исследования по определению длительности лаг-фазы проводили на микробиологическом анализаторе BacTrac 4300 (SY-LAB, Австрия), экзогенную дегидрогеназную активность тест-штаммов оценивали по методике, приведенной в работе [9].

Статистическую обработку результатов осуществляли в пакете статистических программ STATISTICA 10, SPSS13 for Windows. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Для количественной оценки направленности взаимосвязи между переменными проводили корреляционный анализ, а для количественного определения вида математической функции в причинно-следственной зависимости между переменными величинами – парный регрессионный анализ (метод наименьших квадратов). Для оценки силы связи корреляции r использовали шкалу Чеддока: слабая – от 0,1 до 0,3; умеренная – от 0,3 до 0,5; заметная – от 0,5 до 0,7; высокая – от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) – от 0,9 до 1,0. Степень соответствия трендовой модели исходным данным оценивали по коэффициенту достоверности аппроксимации R^2 (коэффициент детерминации), нормированному от 0 до 1.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что токсическое воздействие нитратом цинка приводит к увеличению продолжительности лаг-фазы от 4,2 до 45,0 ч для *Azotobacter sp.* БИМ-74, от 7,5 до 110,0 ч для *Rhodococcus spp.* ЦГ 4, от 6,7 до 22 ч для *Arthrobacter spp.* ЦГ 1.

Кроме того, кривая развития имела двухфазный характер с псевдолаг-периодом, который разделялся на две части экспоненциального роста. Известно, что двухфазный рост отражает изменение метаболизма культуры микроорганизмов при воздействии токсиканта. Изменения динамического биоиндикатора – продолжительности лаг-фазы – были статистически значимы при $p < 0,05$. Наиболее чувствительным при оценке токсических воздействий по динамическим показателям продолжительности лаг-фазы являлся штамм *Rhodococcus sp.* ЦГ 4. Проведенный корреляционно-регрессионный анализ зависимости биоиндикатора популяции *Rhodococcus sp.* ЦГ 4 в периодической культуре от концентрации токсиканта показал, что корреляции были положительными и высокими по шкале Чеддока ($r > 0,75$). Зависимости описывали с помощью линейной модели с коэффициентом детерминации $R^2 > 0,9$, что близко к функциональной зависимости (рис. 1).

Параллельно с определением динамического индикатора проводили микроскопический контроль культуры. Показано, что действие солей цинка выражалось в замедлении роста колоний,

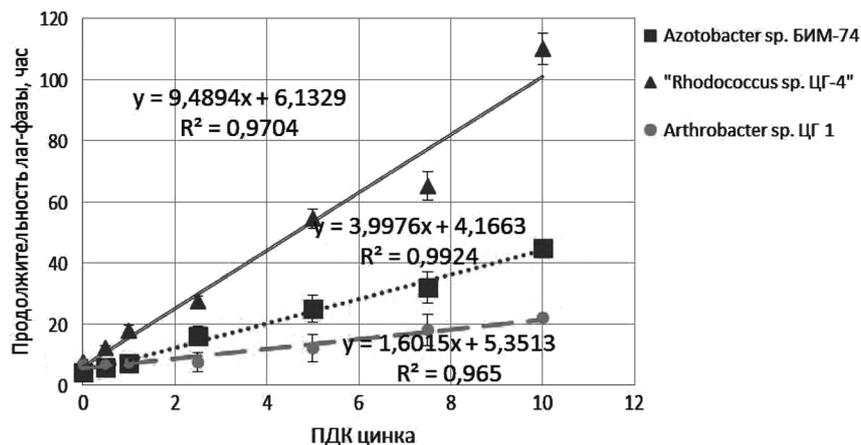


Рис. 1. Изменение продолжительности лаг-фазы развития популяции тест-штаммов в зависимости от концентрации нитрата цинка

Fig. 1. Change in the duration of the lag-phase of the development of a population of test strains depending on the concentration of zinc nitrate

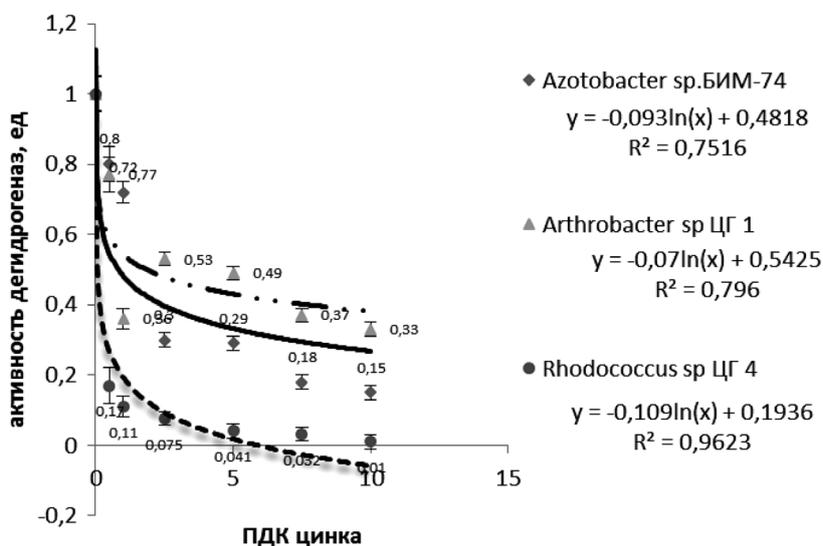


Рис. 2. Изменение активности дегидрогеназ тест-штаммов в зависимости от концентрации нитрата цинка

Fig. 2. Change in the activity of dehydrogenases of test strains as a function of the concentration of zinc nitrate

уменьшении их диаметра, изменении формы, цвета колоний, снижении способности к окрашиванию фиксированных и прижизненных препаратов тест-культур.

Данные о влиянии солей цинка в диапазоне концентраций от 0,5 до 10 ПДК цинка для почв на активность экзогенных дегидрогеназ приведены на рис. 2.

Установлено, что тест-культуры почвенных микроорганизмов имеют различную чувствительность к токсическому воздействию нитрата цинка. Регрессионно-корреляционный анализ позволил выявить, что воздействие солей цинка в указанном диапазоне концентраций ингибирует дегидрогеназную активность тест-культур, при этом зависимость носила отрицательный характер ($0,66 \leq r \leq 0,89$, что, в соответствии со шкалой Чеддока, является заметной/высокой корреляцией). Диапазон коэффициента детерминации R^2 составил 0,75–0,96, наиболее высокие значения получены для тест-модели с *Rhodococcus sp.* ЦГ 4, что подтверждает адекватность модели, которая может быть использована для прогноза содержания цинка в почве, основываясь на изменении дегидрогеназной активности тест-объекта. Высокие корреляционные связи были статистически значимы ($p < 0,05$). Наиболее чувствительным штаммом для оценки токсического действия солей тяжелых металлов по дегидрогеназной активности также являлся *Rhodococcus sp.* ЦГ 4.

В настоящее время общепризнано, что почва представляет собой структурно-экологическую нишу – единую систему с населяющими ее популяциями организмов различного систематического положения. Этот принцип положен в основу биоиндикации почв. Микробиологическая и биохимическая характеристика почв – наиболее сложные разделы почвенной биоиндикации. Почва характеризуется не только составом и численностью разных групп биоты, но и активностью биохимических процессов, обусловленных наличием определенного пула ферментов. При этом активность ферментов может служить показателем потенциальной биологической активности почвы [7]. Полученные нами данные коррелируют с результатами работ [12–15]. Показано, что химические контаминанты существенно влияют на параметры роста исследуемых штаммов микроорганизмов, приводя к сдвигам ростовых показателей, нарушениям клеточного деления, снижению накопления биомассы, появлению атипичных форм отдельных клеток и колоний. На метаболическом уровне токсическое воздействие проявлялось в нарушении энергетического обмена, изменении структуры и физико-химических свойств мембран, что приводило к необратимому разрушению ее архитектуры, вызывая диссоциацию липопротеидов и изменяя активные центры протеинов. Протяженность лаг-фазы роста при токсическом действии увеличивалась и имела выраженный двухфазный характер. Такую задержку объясняют нарушением фаз клеточного цикла, в частности задержкой фазы митоза, в результате чего наблюдается снижение митотической активности.

Изучение активности почвенных ферментов в образцах седиментов и почв из районов нескольких целлюлозоперерабатывающих производств Финляндии [12] показало увеличение активности ряда ферментов по отношению к контрольным пробам, коррелирующее также с изменением показателей микробной биомассы. Авторы предположили, что полученные в результате биосинтеза органические соединения углерода непосредственно увеличивают активность фосфоэстеразы в природных биопленках, что было подтверждено статистически значимыми результатами.

Ряд авторов связывают токсичное действие тяжелых металлов с молекулярными механизмами биотрансформации их как водорастворимых соединений, что приводит к нарушениям в механизмах дыхательной цепи, локализованных в митохондриях клеток (митохондриальные эффекты). Практически все металлы могут конкурировать за места связывания в фосфатных группах с катионами таких биологически значимых ионов, как Са и Mg. Следствием таких процессов могут быть значительные нарушения метаболизма, приводящие к необратимым последствиям и гибели клетки [13–15].

Заключение. Для оценки интегрального токсического действия цинка как одного из наиболее значимых антропогенных контаминантов почвы предложена тест-модель на основе чувствительного почвенного микроорганизма *Rhodococcus spp.* ЦГ 4 с использованием в качестве биомаркера активности экзогенных дегидрогеназ, а в качестве биоиндикатора – динамического показателя продолжительности лаг-фазы развития популяции в условиях контаминации.

Список использованных источников

1. Результаты мониторинга химического загрязнения земель (почв) населенных пунктов в 2014 году [Электронный ресурс] / Государственное учреждение «Республиканский центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения и мониторингу окружающей среды» Минприроды РБ. Радиационно-экологический мониторинг. – Режим доступа: <http://rad.org.by/articles/pochva/rezultaty-monitoringa-zagryazneniya-pochv-v-2014-godu.html>. – Дата доступа: 13.03.2017.
2. Состояние природной среды Беларуси : экол. бюл., 2013 г. [Электронный ресурс] / Нац. акад. наук Беларуси, М-во природ. ресурсов и охраны окружающей среды ; под общ. ред. В. Ф. Логинова. – Минск, 2014. – Режим доступа: http://www.minpriroda.gov.by/ru/new_url_349142309-ru. – Дата доступа: 13.03.2017.
3. Рудь, А. В. Загрязнение тяжелыми металлами почв и растительности придорожных полос автодорог Минской области / А. В. Рудь // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2007. – № 1. – С. 111–114.
4. Перечень предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно допустимых концентраций (ОДК) химических веществ в почв : гигиен. нормативы 2.1.7.12-1-2004 : утв. постановлением Гл. гос. санитар. врача Респ. Беларусь от 25 февр. 2004 г., № 28 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Введ. 2004-09-01. – Минск, 2014. – Режим доступа: <http://www.twirpx.com/file/1757308/>. – Дата доступа: 11.03.2017.

5. Позняк, С. С. Содержание тяжелых металлов Pb, Ni, Zn, Cu, Mn, Zr, Cr, Co и Sn в почвах Центральной зоны Республики Беларусь [Электронный ресурс] // Экономика и экологический менеджмент. – 2011. – № 1. – Режим доступа: <http://economics.open-mechanics.com/articles/307>. – Дата доступа: 28.04.2017.
6. Гигиенические критерии интегральной оценки опасности загрязнения почв населенных пунктов / А. И. Котеленец [и др.] // Воен. медицина. – 2008. – № 3. – С. 79–86.
7. Дудчик, Н. В. Использование микробиотестирования при оценке токсичности химических веществ в окружающей среде / Н. В. Дудчик // Гигиена и санитария. – 2009. – № 1. – С. 84–87.
8. Дудчик, Н. В. Кинетические и культурально-морфологические особенности чувствительных культур микроорганизмов при токсическом воздействии / Н. В. Дудчик, В. П. Филонов, И. П. Щербинская // Мед. журн. – 2010. – № 3. – С. 1431–1445.
9. Оценка цитотоксического действия солей свинца с использованием ферментных тест-систем / Н. В. Дудчик [и др.] // Здравоохранение. – 2010. – № 11. – С. 45–48.
10. Дудчик, Н. В. Альтернативные биологические тест-модели в оценке риска воздействия факторов среды обитания / Н. В. Дудчик, Е. В. Дроздова, С. И. Сычик. – Минск : Белорус. науч.-исслед. ин-т трансп. «Транстехника», 2015. – 194 с.
11. Дудчик, Н. В. Экспериментальная оценка интегральной токсичности объектов среды обитания с использованием количественной популяционной тест-модели / Н. В. Дудчик // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр гигиены. – Минск, 2015. – Т. 1, вып. 25. – С. 32–37.
12. Ahtiainen, J. Microbiological tests and measurements in the assessment of harmful substances and pollution [Electronic resources] / J. Ahtiainen. – Helsinki : Finn. Environment Inst., 2002. – Mode of access: <http://www.ymparisto.fi/eng/orginfo/publica/electro/mb22/mb22.htm>. – Date of access: 28.02.2017.
13. Bispo, A. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by poly-cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) / A. Bispo, M. J. Jourdain, M. Jauzein // Organic Geochemistry. – 1999. – Vol. 30, iss. 8, pt. 2. – P. 947–952.
14. Jo, I. S. Chemical changes in agricultural soils of Korea: data review and suggested countermeasures / I. S. Jo, M. H. Koh // Environmental Geochemistry and Health. – 2004. – Vol. 26, iss. 2/3. – P. 105–117.
15. Metal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating sub-cellular metal distributions to population-level responses / O. Perceval [et al.] // Aquatic Toxicology. – 2004. – Vol. 69, iss. 4. – P. 327–345.

References

1. Results of monitoring of chemical contamination of lands (soils) of settlements in 2014. *Gosudarstvennoe uchrezhdenie “Respublikanskii tsentr po gidrometeorologii, kontroliu radioaktivnogo zagryazneniia i monitoringu okruzhaiushchei sredy” Minprirody RB. Radiatsionno-ekologicheskii monitoring* [State institution “Republican Center for Hydrometeorology, Control of Radioactive Contamination and Environmental Monitoring” of the Ministry of Natural Resources of the Republic of Belarus. Radiation-ecological monitoring]. Available at: <http://rad.org.by/articles/pochva/rezultaty-monitoringa-zagryazneniya-pochva-2014-godu.html> (accessed 13.03.2017) (in Russian).
2. The state of the natural environment of Belarus: the environmental bulletin of 2013, The National Academy of Sciences of Belarus, the Ministry of Natural Resources and Environmental Protection, in V. F. Loginov (ed). http://www.minpriroda.gov.by/ru/new_url_349142309-ru (accessed 13.03.2017) (in Russian).
3. Rud’ A. V. Heavy metals pollution of soils and vegetation of roadsides of motor roads in Minsk region. *Vestnik BGU. Seriya 2, Khimiia. Biologiya. Geografiia* [Bulletin of BSU. Series 2, Chemistry. Biology. Geography], 2007, no. 1, pp. 111–114 (in Russian).
4. *The list of maximum permissible concentrations (MPC) and approximately permissible concentrations (ODC) of chemical substances in soils*: hygienic standards 2.1.7.12-1-2004: approved by the Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus of February 25, 2004, No. 28, Ministry of Health of the Republic Belarus. Minsk, 2004. Available at: <http://www.twirpx.com/file/1757308/> (accessed 11.05.2017) (in Russian).
5. Poznyak S. S. The content of heavy metals Pb, Ni, Zn, Cu, Mn, Zr, Cr, Co and Sn in the soils of the Central zone of the Republic of Belarus. *Ekonomika i ekologicheskii menedzhment* [Economics and environmental management], 2011, no. 1. Available at: <http://economics.open-mechanics.com/articles/307> (accessed 28.04.2017) (in Russian).
6. Kotelenets A. I., Zen’kevich V. V., Voitovich A. M., Dudchik N. V., Druzhinina E. S., Marusich N. I., Kremko L. A., Gomolko T. N. Hygienic criteria for an integrated assessment of the danger of soil contamination in settlements. *Voennaya medicina* [Military Medicine], 2008, no. 3, pp. 79–86 (in Russian).
7. Dudchik, N. V. Use of microbiotesting to evaluate the toxicity of chemical substances in the environment. *Gigiena i sanitariya* [Hygiene and sanitation], 2009, no. 1, pp. 84–87 (in Russian).
8. Dudchik N. V., Filonov V. P., Shcherbinskaya I. P. Kinetic and cultural-morphological features of sensitive cultures of microorganisms under toxic effects. *Meditinskii zhurnal* [Medical Journal], 2010, no. 3, pp. 1431–1445 (in Russian).
9. Dudchik N. V., Shcherbinskaia I. P., Treilib V. V., Ianetskaia S. A., Budkina E. A., Shedikova O. E. Evaluation of the cytotoxic effect of lead salts using enzyme test systems. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2010, no. 11, pp. 45–48 (in Russian).
10. Dudchik N. V., Drozdova E. V., Sychik S. I. *Alternative biological test-models in the risk assessment of environmental factors*. Minsk, Belarusian Research Institute of Transport “Transtehnika” Publ., 2015, 194 p. (in Russian).
11. Dudchik N. V. Experimental assessment of integrated toxicity of habitat objects using a quantitative population-based test model. *Zdorov’e i okruzhayushchaya sreda* [Health and Environment], 2015, vol. 1, no. 25, pp. 32–37 (in Russian).

12. Ahtiainen J. *Microbiological tests and measurements in the assessment of harmful substances and pollution*. Helsinki, Finn. Environment Inst., 2002. Available at: <http://www.ymparisto.fi/eng/orginfo/publica/electro/mb22/mb22.htm> (accessed 28.02.2017).

13. Bispo A., Jourdain M. J., Jauzein M. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by poly-cyclic aromatic hydrocarbons. *Organic Geochemistry*, 1999, vol. 30, iss. 8, pt. 2, pp. 947–952.

14. Jo I. S., Koh M. H. Chemical changes in agricultural soils of Korea: data review and suggested countermeasures. *Environmental Geochemistry and Health*, 2004, vol. 26, iss. 2/3, pp. 105–117.

15. Perceval O., Couillard Y., Pinel-Alloul B., Giguère A., Campbell P. G. Metal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating sub-cellular metal distributions to population-level responses. *Aquatic Toxicology*, 2004, vol. 69, iss. 4, pp. 327–345.

Информация об авторах

Дудчик Наталья Владимировна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: n_dudchik@mail.ru.

Сычик Сергей Иванович – канд. мед. наук, доцент, директор. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Емельянова Ольга Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lee616@ya.ru.

Information about the authors

Natalia V. Dudchik – D. Sc. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: n_dudchik@mail.ru.

Sergei I. Sychik – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Director. Scientific and Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

Olga A. Emeljanova – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Scientific and Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lee616@ya.ru.

В. В. Побойнев¹, В. В. Хрусталеv¹, Т. А. Хрусталева²¹*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*²*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ОСОБЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА
АЛЬФА-СПИРАЛЬНЫХ УЧАСТКОВ В ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЯХ
БЕЛКОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ КЛАССОВ**

Аннотация. В статье проанализированы особенности распределения аминокислотных остатков по альфа-спиральным фрагментам 3D-структур негомологичных белков четырех структурных классов. По результатам сравнения вероятностных шкал выяснено, что высокая вероятность включения в альфа-спирали лизина, аргинина и гистидина отмечается не во всех классах белков, в отличие от постоянно формирующих альфа-спирали аланина, лейцина, глутаминовой кислоты, глутамина и метионина. Для альфа-спиралей бета-структурных белков характерно обеднение лейцином на фоне повышения частоты использования глутамина, а также комбинаций гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков, стабилизирующих альфа-спираль, по сравнению с альфа-спиралями из белков альфа-спирального класса. Особенности аминокислотного состава альфа-спиральных участков, расположенных между двумя бета-тяжами в белках бета-структурного класса и в смешанных белках, указывают на то, что они в наибольшей степени защищены от перехода в бета-структурное состояние. Полученные сведения важны при отборе антигенных фрагментов белков, имеющих в своем составе альфа-спиральные участки, отличающиеся наибольшей стабильностью вторичной структуры, для дальнейшего дизайна вакцинных пептидов.

Ключевые слова: альфа-спираль, структурный класс белка, гидрофобный аминокислотный остаток, гидрофильный аминокислотный остаток, бета-тяж

Для цитирования: Побойнев, В. В. Особенности аминокислотного состава альфа-спиральных участков в полипептидных цепях белков различных структурных классов / В. В. Побойнев, В. В. Хрусталеv, Т. А. Хрусталева // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 4. – С. 58–66.

V. V. Poboinev, V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***THE CHARACTERISTIC PROPERTIES OF AMINO ACID CONTENT OF ALPHA HELICES FRAGMENTS
IN POLYPEPTIDE CHAINS OF DIFFERENT STRUCTURAL CLASSES OF PROTEINS**

Abstract. In this study we analyzed the amino acid content of alpha helices from proteins that belong to four structural classes in nonhomologous sets of 3D structures. Comparison of probability scales revealed that lysine, arginine and histidine show high probabilities to be included in alpha helices only in certain structural classes of proteins, unlike the constant formers of alpha helices: alanine, leucine, glutamic acid, glutamine and methionine. Alpha helices of beta structural proteins show lower usage of leucine and higher usage of glutamine, as well as the elevated usage of combinations of hydrophilic and hydrophobic amino acids that are characteristic to beta strands, relative to alpha helices from alpha helical proteins. The properties of amino acid content of alpha helices situated between two beta strands in beta structural and mixed proteins show that they are protected from the shift to beta strands. Obtained data are important in the process of the selection of antigenic fragments of proteins that contain alpha helices with highly stabilized secondary structure, with the aim to use them in vaccine design studies.

Keywords: alpha helix, structural class of a protein, hydrophobic amino acid residue, hydrophilic amino acid residue, beta strand

For citation: Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A. The characteristic properties of amino acid content of alpha helices fragments in polypeptide chains of different structural classes of proteins. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 58–66 (in Russian).

Введение. Альфа-спираль является одним из основных элементов вторичной структуры белков. Выяснение механизмов образования альфа-спиралей и поддержания их структуры является одним из наиболее интригующих вопросов в протеомике. Помимо развития теоретических представлений об архитектуре белка исследования в данной области имеют и важный практический

аспект. В частности, вакцинные антигены, представляющие собой не полноразмерные белки, а их фрагменты, должны обладать вторичной структурой, аналогичной таковой в полноразмерных молекулах. В обратном случае выработанные к ним антитела не будут распознавать антигены возбудителей.

Идея о том, что вторичная структура белка детерминирована его аминокислотной последовательностью (т. е. первичной структурой), нашла свое подтверждение в трудах Chou и Fasman [1]. Так, по вероятностным шкалам Chou и Fasman в альфа-спирали чаще включены такие аминокислотные остатки, как аланин, глутамин, глутаминовая кислота, аргинин, лейцин, метионин, лизин [1]. Из этих аминокислот четыре (глутамин, глутаминовая кислота, аргинин, лизин) являются гидрофильными, а три (аланин, лейцин, метионин) – гидрофобными. По мере увеличения международной базы данных, содержащей сведения о трехмерном строении биологических макромолекул, дальнейшие исследования предполагали изучение все большего количества белков [2]. В результате этих исследований предложены новые методы для предсказания вторичной структуры. Однако ни один из вероятностных методов предсказания вторичной структуры не мог перешагнуть за 70 % в эффективности определения границ альфа-спиралей и бета-тяжей по аминокислотной последовательности [3]. При дальнейшем увеличении количества трехмерных структур эффективность каждого ранее созданного метода закономерно падала до 50–60 % [4]. Помимо непосредственно аминокислотного состава в расчет принимался дипептидный состав [5], трипептидный состав [6, 7], комбинации аминокислотных остатков [8]. Методы предсказания значительно отличались по статистическим подходам к расчету вероятности включения данного аминокислотного остатка в соответствующий элемент вторичной структуры [9]. Элементы вторичной структуры классифицировали в зависимости от особенностей их строения и состава [10], уделяя особое внимание их концевым участкам (кэпам) [11], анализировали распределение гидрофильных и гидрофобных остатков по ним [12], но предсказать вторичную структуру с эффективностью свыше 70 % это не помогло.

Закономерный вопрос о том, почему не удается точно определить границы альфа-спиралей, требует своего решения. Согласно нашей гипотезе, некоторые альфа-спирали формируются индуцировано – под воздействием других альфа-спиралей, образующих контакты с соответствующим фрагментом белка. Протестировать эту гипотезу представляется возможным при сравнении строения альфа-спиралей из преимущественно альфа-спиральных белков с альфа-спиралями из белков других структурных классов. Если индуцированное образование альфа-спиралей широко распространено, то в альфа-спиралях из альфа-спиральных белков будут чаще встречаться фрагменты, не имеющие предрасположенности к формированию именно такой вторичной структуры. С другой стороны, те альфа-спирали, которые расположены между двумя бета-тяжами (в первичной последовательности белка), наоборот, должны отличаться наиболее характерными для альфа-спиралей комбинациями аминокислотных остатков.

Цель исследования – выявить особенности аминокислотного состава и частоту использования пентапептидов в альфа-спиралях белков, относящихся к четырем структурным классам, оценить влияние фланкирующих участков на частоту использования аминокислотных остатков в альфа-спиралях каждого класса белков.

Задачи: 1) сформировать выборки негомологичных белков четырех структурных классов; 2) создать вероятностные шкалы для каждой выборки; 3) сравнить аминокислотный состав и частоту использования пентапептидов в альфа-спиралях белков четырех структурных классов; 4) выявить особенности строения альфа-спиралей в зависимости от фланкирующих их участков белков четырех структурных классов.

Материалы и методы исследования. В ходе работы были использованы выборки 3D-структур белков человека и животных, относящиеся к четырем структурным классам: альфа-спиральным, бета-структурным, «альфа + бета» и «альфа/бета». Каждая выборка включала по 100 негомологичных аминокислотных последовательностей, полученных из международной базы данных PDB. Для исключения гомологии максимальный процент сходства аминокислотных последовательностей белков в каждой выборке друг с другом не превышал 25 % по алгоритму Decrease Redundancy (web.expasy.org/decrease_redundancy). Информация по границам альфа-спиралей и бета-тяжей

была получена из PDB файлов по результатам работы алгоритма DSSP [13]. Регионы белков, которые не содержали ни альфа-спиралей, ни бета-тяжей, были отнесены к неструктурированному состоянию (койлу). Вероятностные шкалы были построены для аминокислот и комбинаций гидрофобных (O) и гидрофильных (W) остатков в пентапептидах для белков из каждого структурного класса.

Согласно шкале гидрофобности Айзенберга [8], к гидрофильным аминокислотам относятся аргинин, лизин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аспарагин, глутамин, серин, треонин и гистидин, а к гидрофобным аминокислотам – глицин, пролин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, тирозин, фенилаланин, цистеин и триптофан. Так как в каждом пентапептиде может присутствовать только два вида аминокислотных остатков (гидрофобный или гидрофильный), то максимальное количество пентапептидов равно 32 (2⁵). Разделение элементов вторичной структуры на пентапептиды проводилось методом скольжения с шагом в одну аминокислоту [14]. Если элемент вторичной структуры включал менее пяти аминокислотных остатков, то он не попадал в выборку. Достоверность различий в аминокислотном составе определяли с помощью *t*-теста для относительных величин.

Результаты и их обсуждение. Сравнение вероятностных шкал для четырех структурных классов белков. В табл. 1 приведены результаты расчета предпочтительности включения аминокислотных остатков в альфа-спираль (H), бета-тяж (E) или в неструктурированный участок (C) для выборок белков четырех структурных классов. К аминокислотным остаткам, которые преимущественно образуют альфа-спирали во всех белках, относятся глутаминовая кислота, глутамин, аланин, метионин и лейцин.

Таблица 1. Сравнение вероятностных шкал включения аминокислотных остатков в альфа-спирали (H), бета-тяжи (E) и неструктурированные фрагменты (C) для четырех структурных классов белков

Table 1. Comparison of probabilistic scales of incorporating amino acid residues in alpha helices (H), beta-strands (E) and unstructured fragments (C) for four structural classes of proteins

Аминокислотный остаток	Структурный класс белка				Аминокислотный остаток	Структурный класс белка			
	Альфа	Бета	Альфа + бета	Альфа/бета		Альфа	Бета	Альфа + бета	Альфа/бета
Аспарагиновая кислота (D)	C	C	C	C	Глицин (G)	C	C	C	C
Глутаминовая кислота (E)	H	H	H	H	Пролин (P)	C	C	C	C
Лизин (K)	C	H	H	H	Фенилаланин (F)	E	E	E	E
Аргинин (R)	H	E	H	H	Тирозин (Y)	E	E	E	E
Гистидин (H)	E	H	C	C	Метионин (M)	H	H	H	H
Серин (S)	C	C	C	C	Изолейцин (I)	E	E	E	E
Треонин (T)	E	E	E	E	Лейцин (L)	H	H	H	H
Аспарагин (N)	C	C	C	C	Валин (V)	E	E	E	E
Глутамин (Q)	H	H	H	H	Цистеин (C)	E	E	E	E
Аланин (A)	H	H	H	H	Триптофан (W)	E	E	E	E

Лизин является аминокислотным остатком, предпочитающим включаться в альфа-спирали всех структурных классов белков, за исключением альфа-спиральных, в которых он чаще образует неструктурированные участки. Объяснить этот феномен можно тем, что остатки лизина часто стабилизируют С-конец альфа-спирали [11]. Так называемые кэпы альфа-спиралей поддерживают их структуру за счет образования водородных связей с помощью боковых цепей и за счет создания дипольного момента: на N-конце альфа-спирали часто несут отрицательный заряд, а на С-конце – положительный [11]. В случае наличия в белке бета-структуры лизиновые С-кэпы должны быть особенно востребованными – они могут предотвращать переход от альфа-спирали к бета-структуре. В альфа-спиральных белках вероятность такого индуцированного перехода значительно ниже, так как бета-тяжи в них встречаются редко. В результате важность кэпов может снижаться, так как вторичная структура будет воспроизводиться и без них.

Как правило, остатки аргинина включаются в состав альфа-спиралей всех классов белков, кроме бета-структурных. С одной стороны, аргинин обладает гидрофильным положительно заряженным боковым радикалом. С другой стороны, положительный заряд его сконцентрирован

только в гуанидиновой группе, а большая часть его боковой цепи является гидрофобной. В бета-структурных белках аргинин чаще вовлекается в состав бета-тяжей, играя роль аминокислоты, создающей гидрофильный интерфейс протеина. Гистидин же демонстрирует весьма изменчивые предпочтения по включению в элементы вторичной структуры: это альфа-спиральная аминокислота в бета-структурных белках и бета-структурная аминокислота – в альфа-спиральных. В смешанных белках гистидин находится преимущественно в неструктурированном состоянии.

Обращает на себя внимание симметричность строения пентапептидов, как правило, формирующих альфа-спирали во всех четырех классах белков. Такие пентапептиды (табл. 2) содержат в середине или один гидрофобный остаток (все остальные остатки – гидрофильные), или один гидрофильный остаток (все остальные – гидрофобные). Другой вариант альфа-спиральных комбинаций: два гидрофильных остатка подряд, а за ними два гидрофобных остатка подряд (в пентапептидах WWOOW, WOOWW, OOWWO и OWWOO).

Таблица 2. Сравнение вероятностных шкал включения пентапептидов, состоящих из гидрофильных (W) и гидрофобных (O) остатков, в альфа-спирали (H), бета-тяжи (E) и неструктурированные фрагменты (C) для четырех структурных классов белков

Table 2. Comparison of probabilistic scales of incorporating pentapeptides composed of hydrophilic (W) and hydrophobic (O) residues in alpha helices (H), beta-strands (E) and unstructured fragments (C) for four structural classes of proteins

Пентапептид	Структурный класс белка				Пентапептид	Структурный класс белка			
	Альфа	Бета	Альфа + бета	Альфа/бета		Альфа	Бета	Альфа + бета	Альфа/бета
WWWWW	C	C	C	C	WOOOO	H	H	C	C
OWWWW	C	C	C	C	OWWOO	H	H	H	H
WOWWW	C	C	C	C	OOWWO	H	H	H	H
WWOWW	H	H	H	H	OOOWW	H	E	E	C
WWWOW	C	C	C	C	WOWOO	E	E	E	E
WWWOO	C	C	C	C	OWOWO	E	E	E	E
OOWWW	C	C	C	C	OOWOW	E	E	E	C
WOOWW	H	H	H	H	WOOWO	E	H	H	H
WOOOW	H	H	H	H	OWOOW	E	H	H	H
WWOOO	C	C	C	C	WOOOW	H	E	E	E
OWOOO	E	C	C	C	WOOOO	E	E	E	E
WOWOO	E	E	E	C	OWOOO	E	E	E	E
WWOVO	C	C	C	C	OOWOO	H	H	H	H
OWWOO	C	C	C	H	OOOWO	H	E	E	E
WOWWO	C	C	C	C	OOOOW	E	E	E	E
OWWOO	C	C	C	C	OOWOO	E	E	E	E

Некоторые пентапептиды, содержащие три подряд гидрофобных остатка (WOOOO, OOWWW, WOOOW и OOWWO) становятся альфа-спиральными в белках альфа-спирального класса. В белках других классов они чаще образуют бета-тяжи или неструктурированные фрагменты полипептидной цепи – в белках класса «альфа/бета» (табл. 2). Общая тенденция для белков всех классов заключается в том, что кластеры гидрофильных аминокислотных остатков не образуют ни альфа-спиралей, ни бета-тяжей, а кластеры гидрофобных остатков формируют преимущественно бета-тяжи [14]. Чередование гидрофильных и гидрофобных остатков через один в большей степени характерно для бета-структуры [14].

Сравнение частоты использования аминокислотных остатков в альфа-спиралях четырех классов белков. При рассмотрении аминокислотного состава альфа-спиралей белков четырех структурных классов обнаружены некоторые достоверные различия. По сравнению с альфа-спиралями альфа-спиральных белков альфа-спирали бета-структурных белков обеднены лейцином и метионином, но обогащены глутамином, триптофаном и аспарагиновой кислотой. Для лейцина вероятность включения в бета-тяж выше, чем для глутамина (хотя оба они преимущественно образуют альфа-спирали) [14]. Вполне вероятно, что наличие в альфа-спиралях глутамина делает их более устойчивыми к альфа-бета переходам. Присутствие лейцина, наоборот, несколько по-

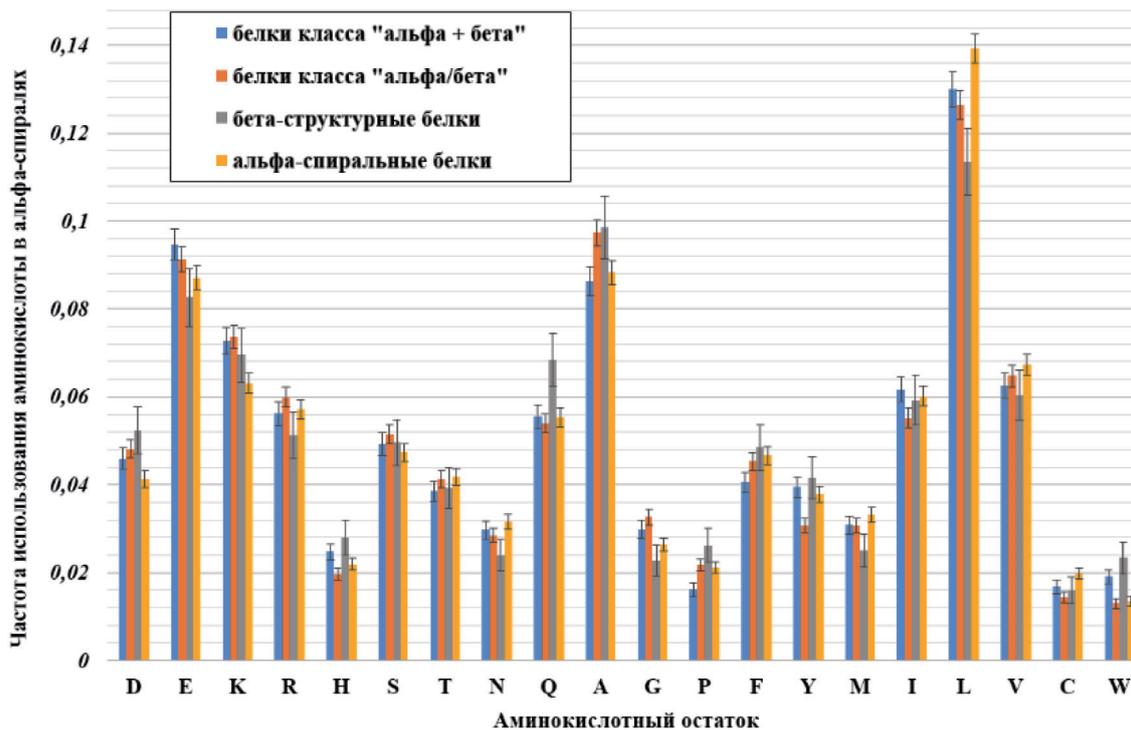


Рис. 1. Аминокислотный состав альфа-спиральных участков белков четырех структурных классов

Fig. 1. Amino acid composition of alpha-helical fragments of four structural classes of proteins

вышает такую вероятность. В результате в немногочисленных (но устойчивых) альфа-спиралях бета-структурных белков частота использования глутамина находится на более высоком уровне, а частота использования лейцина – на более низком. Аспарагиновая кислота – наиболее «популярная» аминокислота для начала альфа-спирали [11]. Наличие кэпа на N-конце становится менее важным для альфа-спиральных белков, когда многочисленные взаимодействующие альфа-спирали и так стабилизируют друг друга. В результате ослабления отрицательного естественного отбора замена аспарагиновой кислоты на другие остатки зачастую фиксируется в альфа-спиралях именно альфа-спиральных белков. Еще один общий тренд – достоверное снижение частоты использования пролина в альфа-спиралях белков класса «альфа + бета» по сравнению с белками всех остальных классов. Альфа-спирали белков класса «альфа/бета» имеют несколько отличительных черт по сравнению со спиралями из белков класса «альфа + бета»: в них достоверно чаще используется аланин, а аминокислотные остатки гистидина, тирозина и триптофана используются реже. Аланин отличается наибольшей частотой включения в состав альфа-спиралей во всех структурных классах белков, в отличие от тирозина и триптофана, которые преимущественно входят в состав бета-тяжей, и гистидина, предпочитающего койл в классах «альфа + бета» и «альфа/бета». Действительно, при чередовании альфа-спиралей и бета-тяжей по ходу первичной последовательности белка особенно важна стабилизация каждой альфа-спирали специфическими комбинациями аминокислот. В целом же аминокислотный состав альфа-спиралей отличается высокой степенью сходства для белков всех структурных классов (рис. 1).

Если рассматривать частоту использования каждого пентапептида отдельно (рис. 2), то число достоверных отличий между альфа-спиралями белков четырех классов будет не столь велико. Такие гидрофобные бета-структурные пентапептиды, как WOOOO, OWOOO и OOOOWO, а также амфифильный бета-структурный пентапептид OWOWO, достоверно чаще встречаются в альфа-спиралях альфа-спиральных белков, чем в альфа-спиралях бета-структурных белков. Два бета-структурных пентапептида (WOOOO и OOOOO) реже встречаются в альфа-спиралях белков класса «альфа + бета», чем в альфа-спиралях альфа-спиральных белков. В то же время альфа-спиральный пентапептид WWOOW в альфа-спиралях белков класса «альфа + бета» встречается чаще, чем в альфа-спиралях альфа-спиральных белков. Эти особенности объясняются тем, что

WWWW, WWWO, OOWWW, WWWO, WWOW, WOWWO и OWWWO) в этих элементах вторичной структуры по сравнению со смешанными белками.

Влияние фланкирующих элементов вторичной структуры на аминокислотный состав альфа-спиралей четырех структурных классов белков. Наиболее выраженные изменения в аминокислотном составе альфа-спиралей в зависимости от того, какие элементы вторичной структуры находятся по направлению к N- и C-концу от них, найдены в бета-структурных белках (рис. 3). Частота использования глутамина в альфа-спиралях, расположенных между двумя бета-тяжами, достоверно превосходит таковые в альфа-спиралях, расположенных между альфа-спиралью и бета-тяжем и между бета-тяжем и альфа-спиралью. Лейцина достоверно меньше в альфа-спиралях, расположенных между двумя бета-тяжами, чем в альфа-спиралях между двумя альфа-спиралями и между альфа-спиралью и бета-тяжем. Пролин гораздо реже присутствует в альфа-спиралях между двумя бета-тяжами и между бета-тяжем и альфа-спиралью, чем в спиралях между двумя спиральями и между альфа-спиралью и бета-тяжем. Аспарагиновой кислоты, наоборот, достоверно больше в альфа-спиралях между двумя бета-тяжами и между бета-тяжем и альфа-спиралью, чем в альфа-спиралях между двумя альфа-спиралями и между альфа-спиралью и бета-тяжем.

Такие особенности альфа-спиралей в бета-структурных белках свидетельствуют о том, что альфа-спирали между двумя бета-тяжами особенно часто стабилизируются за счет включения в них (в N-концы) глутамина и аспарагиновой кислоты, а также за счет избегания частого использования пролина и лейцина. Похожие сдвиги в меньшей степени выражены для альфа-спиралей, расположенных между бета-тяжем и альфа-спиралью. По всей видимости, для фолдинга белка непосредственно по мере его синтеза на рибосоме имеет значение, какой элемент вторичной структуры уже сформировался на N-конце полипептидной цепи. Если на N-конце имеется бета-тяж, то вероятность индуцированного образования бета-структуры вновь синтезированным фрагментом цепи резко возрастает. Некоторые особенности аминокислотного состава, описанные выше, должны препятствовать превращению альфа-спирали в бета-структуру в процессе синтеза белка.

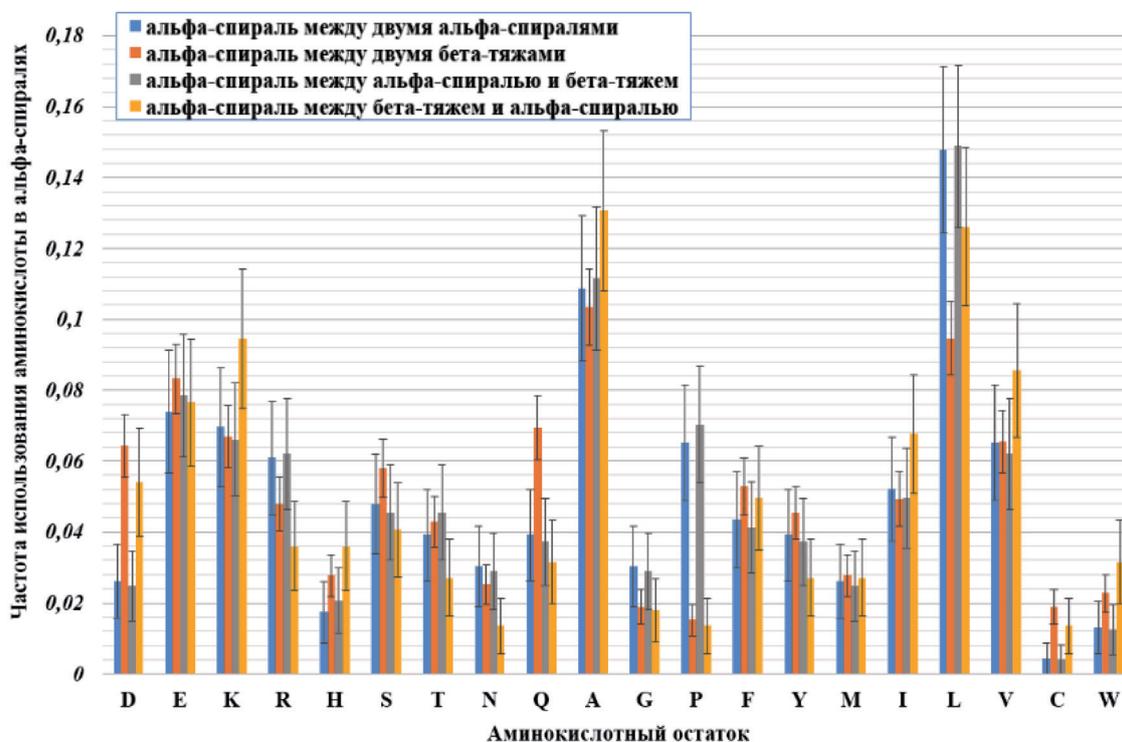


Рис. 3. Аминокислотный состав альфа-спиралей бета-структурных белков в зависимости от фланкирующих элементов вторичной структуры

Fig. 3. Amino acid composition of alpha helices of beta structural proteins depending on flanking secondary structure elements

В белках класса «альфа + бета» также существуют некоторые механизмы стабилизации альфа-спиралей, расположенных между двумя бета-тяжами. В таких альфа-спиралях достоверно чаще используется аланин – аминокислота, с наиболее высокой вероятностью формирующая альфа-спираль [14]. Кроме того, в альфа-спиралях между двумя бета-тяжами достоверно реже используется лейцин, чем в альфа-спиралях между двумя альфа-спиралями. В последних также чаще, чем в спиралах между спиралью и бета-тяжем, между бета-тяжем и спиралью, используется пролин. Похожие сдвиги в аминокислотном составе обнаружены и в альфа-спиралях белков класса «альфа/бета»: аланин чаще используется в спиралах между двумя бета-тяжами, чем в спиралах между двумя спиральями и между альфа-спиралью и бета-тяжем; пролин и лейцин чаще сохраняются в альфа-спиралях между спиральями, чем в спиралах между бета-тяжами и альфа-спиралью и бета-тяжем соответственно. Следует отметить, что в альфа-спиральных белках такие закономерности почти не прослеживаются. В частности, аланин и глутамин в них чаще встречаются в альфа-спиралях между двумя альфа-спиралями, чем в спиралах между двумя бета-тяжами и между альфа-спиралью и бета-тяжем соответственно.

Выводы

1. Созданы вероятностные шкалы для включения аминокислот и пентапептидов, состоящих из гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков, в элементы вторичной структуры в каждом из четырех структурных классов белков. Определены те аминокислоты и пентапептиды, в которых образование элементов вторичной структуры меняется в зависимости от структурного класса белка.

2. Установлен факт повышения частоты использования пентапептидов, свойственных для бета-тяжей, в альфа-спиралях белков альфа-спирального класса на фоне снижения в них частоты использования пентапептидов, стабилизирующих альфа-спирали. Эти факты свидетельствуют о значительном вкладе дальних взаимодействий в формирование альфа-спиралей в альфа-спиральных белках.

3. Альфа-спирали, расположенные между двумя бета-тяжами, в большей степени стабилизированы характерными аминокислотными остатками, чем альфа-спирали, расположенные между двумя альфа-спиралями. Данная закономерность особенно выражена в бета-структурных белках, менее четко – в белках классов «альфа + бета» и «альфа/бета», практически не прослеживается в белках альфа-спирального класса.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № Б16М-083.

Acknowledgements. This work was financially supported by the grant of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research no. B16M-083.

Список использованных источников

1. Chou, P. Y. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence / P. Y. Chou, G. D. Fasman // *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* – 1978. – Vol. 47. – P. 45–48.
2. Munoz, V. Intrinsic secondary structure propensities of the amino acids, using statistical phi-psi matrices: comparison with experimental scales / V. Munoz, L. Serrano // *Proteins.* – 1994. – Vol. 20. – P. 301–311.
3. Pirovano, W. Protein secondary structure prediction / W. Pirovano, J. Heringa // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 609. – P. 327–348.
4. Predicting protein secondary structure using consensus data mining (CDM) based on empirical statistics and evolutionary information / G. Kandoi [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1484. – P. 35–44.
5. Барковский, Е. В. Карты преимущественного конформационного состояния дипептидов в структурированных участках глобулярных белков / Е. В. Барковский, Д. В. Кириленко // *Биофизика.* – 1985. – Т. 30, вып. 5. – С. 786–790.
6. Anishetty, S. Tripeptide analysis of protein structures / S. Anishetty, G. Pennathur, R. Anishetty // *BMC Struct. Biol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 9.
7. Costantini, S. PreSSAPro: a software for the prediction of secondary structure by amino acid properties / S. Costantini, G. Colonna, A. M. Facchiano // *Comput. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 31. – P. 389–392.
8. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot / D. Eisenberg [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1984. – Vol. 179. – P. 125–142.
9. NPS@: network protein sequence analysis / C. Combet [et al.] // *Trends Biochem. Sci.* – 2000. – Vol. 25. – P. 147–150.

10. Tendulkar, A. V. Characterization and sequence prediction of structural variations in α -helix / A. V. Tendulkar, P. P. Wangikar // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 12, suppl. 1. – P. S20.
11. Aurora, R. Helix capping / R. Aurora, G. D. Rose // *Protein Sci.* – 1998. – Vol. 7, N 1. – P. 21–38.
12. Лим, В. И. Стереохимическая теория вторичной структуры глобулярных белков. II. Методы локализации α -спиральных и β -спиральных участков // *Биофизика*. – 1974. – Т. 19, вып. 3. – P. 562–575.
13. Kabsch, W. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features / W. Kabsch, C. Sander // *Biopolymers*. – 1983. – Vol. 22. – P. 2577–2637.
14. Khrustalev, V. V. Stabilization of secondary structure elements by specific combinations of hydrophilic and hydrophobic amino acid residues is more important for proteins encoded by GC-poor genes / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky // *Biochimie*. – 2012. – Vol. 94, N 12. – P. 2706–2715.

References

1. Chou P. Y., Fasman G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1978, vol. 47, pp. 45–48.
2. Munoz V., Serrano L. Intrinsic secondary structure propensities of the amino acids, using statistical phi-psi matrices: comparison with experimental scales. *Proteins*, 1994, vol. 20, pp. 301–311.
3. Pirovano W., Heringa J. Protein secondary structure prediction. *Methods in Molecular Biology*, 2010, vol. 609, pp. 327–348.
4. Kandoi G., Leelananda S. P., Jernigan R. L., Sen T. Z. Predicting protein secondary structure using consensus data mining (CDM) based on empirical statistics and evolutionary information. *Methods in Molecular Biology*, 2017, vol. 1484, pp. 35–44. DOI:10.1007/978-1-4939-6406-2_4
5. Barkovskii E. V., Kirilenko D. V. Maps of the preferential conformational state of dipeptides in structured regions of globular proteins. *Biofizika* [Biophysics], 1985, vol. 30, iss. 5, pp. 786–790 (in Russian).
6. Anishetty S., Pennathur G., Anishetty R. Tripeptide analysis of protein structures. *BMC Structural Biology*, 2002, vol. 2, p. 9. DOI: 10.1186/1472-6807-2-9
7. Costantini S., Colonna G., Facchiano A. M. PreSSAPro: a software for the prediction of secondary structure by amino acid properties. *Computational Biology and Chemistry*, 2007, vol. 31, pp. 389–392. DOI:10.1016/j.compbiolchem.2007.08.010
8. Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M., Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology*, 1984, vol. 179, pp. 125–142. DOI: 10.1016/0022-2836(84)90309-7
9. Combet C., Blanchet C., Geourjon C., Deleage G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, vol. 25, pp. 147–150. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01540-6
10. Tendulkar A. V., Wangikar P. P. Characterization and sequence prediction of structural variations in α -helix. *BMC Bioinformatics*, 2011, vol. 12, suppl. 1, p. S20. DOI: 10.1186/1471-2105-12-S1-S20
11. Aurora R., Rose G. D. Helix capping. *Protein Science*, 1998, vol. 7, no. 1, pp. 21–38. DOI: 10.1002/pro.5560070103.
12. Lim V. I. Stereochemical theory of the secondary structure of globular proteins. II. Methods of localization of α -helical and β -helical sites. *Biofizika* [Biophysics], 1974, vol. 19, iss. 3, pp. 562–575 (in Russian).
13. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 1983, vol. 22, no. 12, pp. 2577–2637. DOI: 10.1002/bip.360221211
14. Khrustalev V. V., Barkovsky E. V. Stabilization of secondary structure elements by specific combinations of hydrophilic and hydrophobic amino acid residues is more important for proteins encoded by GC-poor genes. *Biochimie*, 2012, vol. 94, no. 12, pp. 2706–2715. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.08.008

Сведения об авторах

Побойнев Виктор Витольдович – магистрант. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dremozzev@mail.ru.

Хрусталеv Владислав Викторович – доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru.

Хрусталева Татьяна Александровна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanissia.lir@gmail.com.

Information about the authors

Victor V. Poboinev – Undergraduate. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dremozzev@mail.ru.

Vladislav V. Khrustalev – Assistant Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru.

Tatyana A. Khrustaleva – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanissia.lir@gmail.com.

ISSN 1029-8940 (print)
УДК 759.873.088.5:661.185

Поступила в редакцию 27.12.2016
Received 27.12.2016

Т. П. Пирог^{1,2}, Т. А. Шевчук², И. В. Савенко¹, Д. А. Луцай¹

¹Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ НА АКТИВНОСТЬ НАДФ⁺-ЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ У БАКТЕРИЙ РОДОВ *ACINETOBACTER*, *RHODOCOCCUS* И *NOCARDIA* – ПРОДУЦЕНТОВ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Аннотация. Биологические свойства микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) обуславливают их возможное практическое использование в качестве антимикробных агентов. По химической природе ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 являются комплексом нейтральных, глико-, фосфо- и аминокислот. Согласно данным литературы, аминокислоты характеризуются наиболее высокой антимикробной активностью. Ключевым ферментом биосинтеза аминокислот у штаммов IMB B-7241, IMB B-7405 и IMB Ac-5017 является НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа. Предполагается, что выявление возможных активаторов и/или ингибиторов этого фермента с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды позволит регулировать состав комплекса ПАВ и его свойства.

Целью работы было исследование влияния одно- и двухвалентных катионов на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405.

Культивирование штаммов IMB B-7241, IMB Ac-5017 и IMB B-7405 осуществляли в жидкой минеральной среде, содержащей этанол и глицерин в качестве источника углерода. Активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.4) в бесклеточном экстракте анализировали по образованию глутамата в процессе окисления НАДФН при 340 нм.

Установлено, что активаторами НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 являются катионы кальция (5 мМ), магния (10 мМ) и цинка (0,001–0,01 мМ), у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 – катионы кальция (5 мМ), у *N. vaccinii* IMB B-7405 – катионы кальция (5 и 10 мМ), натрия (25–100 мМ) и калия (50 и 100 мМ). Дополнительное внесение активаторов фермента или увеличение их содержания в среде культивирования исследуемых штаммов сопровождалось повышением активности НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы в 1,5–3 раза по сравнению с таковой на базовой среде.

Полученные данные предполагают возможность регуляции свойств микробных ПАВ в процессе культивирования продуцента, что в перспективе позволит получать препараты со стабильными заданными свойствами в зависимости от сферы их практического применения.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхностно-активные вещества, активаторы НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы

Для цитирования: Влияние катионов на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у бактерий родов *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и *Nocardia* – продуцентов поверхностно-активных веществ / Т. П. Пирог [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 67–74.

T. P. Pirog^{1,2}, T. A. Shevchuk², I. V. Savenko¹, D. A. Lutsai¹

¹National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF CATIONS ON NADP⁺-DEPENDENT GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BACTERIA OF GENERA *ACINETOBACTER*, *RHODOCOCCUS* AND *NOCARDIA* – PRODUCERS OF SURFACTANTS

Abstract. Surfactants of microbial origin are widely used in different industries. The application of microbial surfactants is promising in biology and medicine as an alternative to synthetic disinfectants or drugs due to their antimicrobial and anti-adhesive properties. The key enzyme biosynthesis of surface active aminolipids (effective antimicrobials preparations) in *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 is NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase.

Aim – to study the effect of mono- and divalent cations on the activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405.

The activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4) in the cell-free extract was analyzed for the formation of glutamate in the oxidation of NADPH at 340 nm.

It was found that activators of this enzyme in *A. calcoaceticus* IMV B-7241 were calcium cations (5 mM), magnesium (10 mM) and zinc (0.001–0.01 mM), *R. erythropolis* IMV Ac-5017 – calcium (5 mM), *N. vaccinii* IMV B-7405 – calcium (5 and 10 mM), sodium (25–100 mM), potassium (50 and 100 mM). Additional introduction or increase the content of enzyme activators in cultivation medium of studied strains was accompanied by increasing activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase in 1.5–3 times compared with that in the base medium.

The possibility of regulating biological properties of final product during cultivation of surfactants producer are discussed. The obtained results suppose modification of microbial surfactants characteristics with the change in cultivation medium of cations content – activators and/or inhibitors of key enzymes biosynthesis of component surfactants responsible for specific biological properties.

Keywords: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, surfactants, activators of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase

For citation: Pirog T. P., Shevchuk T. A., Savenko I. V., Lutsai D. A. Influence of cations on NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase activity in bacteria of genera *Acinetobacter*, *Rhodococcus* and *Nocardia* – producers of surfactants. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 67–74 (in Russian).

Введение. Интерес исследователей к нетоксичным биodeградебельным микробным поверхностно-активным веществам (ПАВ) обусловлен широким спектром их возможного практического использования, в том числе в медицине [1]. Повышение резистентности микроорганизмов к антибиотикам и другим биоцидам способствовало поиску новых эффективных антимикробных средств [2]. На сегодняшний день используются альтернативные антибиотикам препараты биологического происхождения (пробиотики, бактериофаги, ферменты) и активно исследуются новые потенциальные биоциды (микробные ПАВ, пептиды, бактериоцины, лектины и др.) [3, 4]. Несмотря на большое количество публикаций, касающихся антимикробной активности микробных ПАВ, применение этих продуктов микробного синтеза в медицине остается весьма ограниченным [4]. Коммерческим аминолипидом является даптомицин, производимый Cubist Pharmaceuticals под названием Cubicin® [5]. Этот препарат был одобрен в 2003 г. для лечения кожных инфекций, вызванных метициллин-резистентным золотистым стафилококком и другими грамположительными патогенными микроорганизмами.

Ранее нами показано [6], что штаммы *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 способны синтезировать ПАВ, обладающие антимикробной активностью.

В работах [7, 8] установлена зависимость антимикробных свойств ПАВ *N. vaccinii* IMV B-7405 и *A. calcoaceticus* IMV B-7241 от условий культивирования продуцентов. Это может быть обусловлено тем, что микробные ПАВ являются вторичными метаболитами и, как правило, синтезируются в виде комплекса подобных соединений [1], соотношение которых может изменяться в различных условиях культивирования продуцентов, что сопровождается изменением биологических свойств целевого продукта.

По химической природе ПАВ *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV B-7405 и *R. erythropolis* IMV Ac-5017 являются комплексом нейтральных, глико-, фосфо- и аминолипидов [9]. Согласно литературным данным [4, 10], аминолипиды являются более эффективными антимикробными агентами, чем гликолипиды, а нейтральные и фосфолипиды характеризуются очень слабой антимикробной активностью. Следовательно, повышенное содержание в составе комплекса аминолипидов может сопровождаться усилением антимикробной активности ПАВ. Однако на сегодняшний день влияние условий культивирования продуцента на биологические свойства ПАВ и возможность их регуляции остается вне внимания исследователей, хотя первые работы, в которых представлены данные о взаимосвязи химического состава микробных ПАВ и их свойств, были опубликованы около 15 лет назад [11]. Тем не менее, в работе [12] отмечается, что биосинтез аминолипидов с заранее заданными свойствами невозможен, а достичь этого можно только в результате постферментационной химической модификации синтезированных ПАВ.

По нашему мнению, выявление возможных активаторов и/или ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза компонентов ПАВ с последующей соответствующей модификацией состава питательной среды позволит регулировать состав комплекса ПАВ, а следовательно, и свойства целевого продукта. Ранее установлено [13–15], что ключевым ферментом биосинтеза аминоли-

пидов у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 является НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа.

Цель данной работы – исследовать влияние одно- и двухвалентных катионов на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405.

Объекты и методы исследования. Объекты исследования – штаммы *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Nocardia vaccinii* К-8, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного Национальной академии наук Украины под номерами IMB Ac-5017, IMB B-7241 и IMB B-7405 соответственно.

R. erythropolis IMB Ac-5017 выращивали в жидкой минеральной среде (г/л): NaNO₃ – 1,3, MgSO₄·7H₂O – 0,1; NaCl – 1,0; Na₂HPO₄ – 0,6; KН₂PO₄ – 0,14; FeSO₄·7H₂O – 0,01; pH 6,8–7,0 (базовая среда). В одном из вариантов в среду дополнительно вносили CaCl₂ в концентрации 0,1 г/л. В качестве субстрата использовали этанол в концентрации 1 % (по объему).

Для культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 использовали питательную среду следующего состава (г/л): (NH₂)₂CO – 0,35; MgSO₄·7H₂O – 0,1; NaCl – 1,0; Na₂HPO₄ – 0,6; KН₂PO₄ – 0,14; Cu²⁺ (0,16 мкМ) в виде раствора CuSO₄·5H₂O с концентрацией 4 мг/100 мл и Fe²⁺ (3,6 мкМ) в виде 1 %-ного раствора FeSO₄·7H₂O; pH 6,8–7,0 (базовая среда). В одном из вариантов в среду дополнительно вносили CaCl₂ в концентрации 0,1 и 0,2 г/л, а также Zn²⁺ (38 мкМ) в виде раствора ZnSO₄·7H₂O с концентрацией 1,1 г/100 мл. Источник углерода – этанол в концентрации 1 % (по объему).

Штамм *N. vaccinii* IMB B-7405 выращивали в синтетической питательной среде (г/л): NaNO₃ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,1; CaCl₂ – 0,1; KН₂PO₄ – 0,1; FeSO₄·7H₂O – 0,1; дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) (базовая среда). В одном из вариантов содержание CaCl₂ в среде повышали до 0,2 и 0,4 г/л. Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 1,0 % (по объему).

В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на соответствующих базовых средах, содержащих 0,5 % (по объему) субстрата. Количество посеваемого материала (10⁴–10⁵ кл/мл) составляло 5–10 % 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 24–48 ч.

Для получения бесклеточных экстрактов культуральную жидкость после культивирования исследуемых штаммов центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М К⁺-фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °С). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М К⁺-фосфатном буфере (pH 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграт центрифугировали (12 000 g, 30 мин, 4 °С), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.4) анализировали по образованию глутамата при окислении НАДФН при 340 нм [16]. При исследовании влияния катионов на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы в реакционную смесь вносили 0,001–0,01 мМ Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ в виде растворов солей MnSO₄·H₂O, CoSO₄·7H₂O и ZnSO₄·7H₂O, а также 0,01–10 мМ Ca²⁺, Mg²⁺ и 25–100 мМ Na⁺, K⁺ в виде растворов солей CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, NaCl и KCl соответственно.

Активность ферментов выражали в нмоль полученного за 1 мин продукта реакции (НАДФ) в пересчете на 1 мг белка. Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли по Bradford. Активность ферментов анализировали при 28–30 °С – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [13–15]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены данные по зависимости активности НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Таблица 1. Влияние катионов на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017Table 1. Influence of cations on the activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV B-7405 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017

Катион	Концентрация в реакционной смеси, мМ	Активность в клетках штаммов, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		
		IMB B-7241	IMB B-7405	IMB Ac-5017
Без катионов	0	345 ± 17	476 ± 23	236 ± 11
Ca ²⁺	0,01	Н. о.	794 ± 39	Н. о.
	5	431 ± 21	635 ± 32	353 ± 17
	10	517 ± 25	794 ± 39	117 ± 5
Mg ²⁺	0,01	310 ± 15	450 ± 22	Н. о.
	5	345 ± 17	464 ± 23	118 ± 6
	10	517 ± 25	476 ± 23	59 ± 3
Mn ²⁺	0,001	340 ± 17	159 ± 8	59 ± 3
	0,005	344 ± 17	140 ± 7	236 ± 11
	0,01	310 ± 15	240 ± 12	118 ± 6
Zn ²⁺	0,001	580 ± 29	238 ± 11	59 ± 3
	0,005	580 ± 29	238 ± 11	59 ± 3
	0,01	397 ± 19	159 ± 8	59 ± 3
Co ²⁺	0,001	340 ± 17	238 ± 11	59 ± 3
	0,005	344 ± 17	238 ± 11	59 ± 3
	0,01	345 ± 17	159 ± 8	59 ± 3
Na ⁺	25	305 ± 15	635 ± 31	174 ± 8
	50	290 ± 14	635 ± 31	174 ± 8
	100	189 ± 9	1111 ± 55	194 ± 9
K ⁺	25	345 ± 17	Н. о.	209 ± 10
	50	289 ± 14	794 ± 39	236 ± 11
	100	245 ± 12	1111 ± 55	236 ± 11

Примечание. Активность ферментов определяли в клетках бактерий, выращенных до середины экспоненциальной фазы. Н. о. – не определяли.

и *N. vaccinii* IMB B-7405 от концентрации различных одно- и двухвалентных катионов в реакционной смеси. Выбор катионов обусловлен тем, что, согласно литературным данным [17–22], они (в исследуемом нами диапазоне концентраций) являются ингибиторами или активаторами НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у различных микроорганизмов.

Так, у архей *Thermococcus* sp. активность этого фермента повышалась на 135, 104 и 250 % в присутствии 5 мМ CaCl₂, MgCl₂ и MnCl₂ соответственно [17]. Позже [18] было установлено, что катионы кальция и магния являются активаторами НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы и у архей *Thermococcus waiotapuensis*: при наличии 10 мМ CaCl₂ и 10 мМ MgSO₄ наблюдали увеличение активности в 1,3 раза по сравнению с таковой без катионов металлов. У аэробных гипертермофильных архей *Aeropyrum pernix* K1 активаторами фермента являются катионы калия и натрия в концентрации 50–200 мМ [19].

Данные о влиянии катионов цинка на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у микроорганизмов появились в 1980 г. [20], однако до настоящего времени в литературе имеются лишь отдельные такие сообщения. В работе [20] отмечается, что в зависимости от концентрации Zn²⁺ может быть либо активатором, либо ингибитором этого фермента: при концентрации менее 0,1 мМ активность глутаматдегидрогеназы у *Mycobacterium smegmatis* повышалась, а при концентрации катионов цинка более 0,1 мМ наблюдали ингибирование активности фермента. В присутствии 1 мМ Zn²⁺ активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *Escherichia coli* снижалась на 40 % [21], повышение концентрации ZnCl₂ до 5 мМ сопровождалось ингибированием активности этого фермента у *Aspergillus terreus* [22].

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что катионы кальция в концентрации 5 мМ являются активатором НАДФ⁺-глутаматдегидрогеназы у всех исследуемых штаммов (увеличение активности в 1,3–1,5 раза). Повышение концентрации Ca²⁺ до 10 мМ в реакционной смеси со-

провождалось увеличением в 1,2–1,3 раза активности фермента у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и у *N. vaccinii* IMB B-7405 и ее снижением в 3 раза у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (по сравнению с его активностью в присутствии 5 мМ Ca^{2+}). Отметим, что активирующее влияние катионов кальция на глутаматдегидрогеназу *N. vaccinii* IMB B-7405 проявлялось в широком диапазоне концентраций (0,01–10 мМ).

В отличие от катионов кальция, в присутствии Mg^{2+} (10 мМ) и Zn^{2+} (0,001–0,01 мМ) увеличение глутаматдегидрогеназной активности наблюдали только у штамма *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Активаторами фермента, функционирующего у *N. vaccinii* IMB B-7405, оказались катионы калия и натрия. Активность НАДФ⁺-глутаматдегидрогеназы у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 ингибировали катионы марганца, цинка и кобальта (табл. 1).

На основании полученных данных предположили, что глутаматдегидрогеназную активность в клетках бактерий можно повысить путем внесения в среду культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 катионов цинка и кальция, повышения концентрации катионов магния, а также добавления в среду для выращивания *R. erythropolis* IMB Ac-5017 Ca^{2+} и увеличения концентрации этих катионов в среде культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405.

Дальнейшие эксперименты подтвердили наше предположение (табл. 2, см. рисунок). Так, при наличии в среде Zn^{2+} (38 мкМ), Mg^{2+} (0,2 и 0,4 г/л), Ca^{2+} (0,1 и 0,2 г/л) активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы в клетках *A. calcoaceticus* IMB B-7241 повышалась в 2–3 раза по сравнению с активностью на базовой среде без катионов цинка и кальция и с более низкой концентрацией катионов магния (табл. 2). Повышение в среде культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405 содержания Ca^{2+} до 0,4 г/л сопровождалось увеличением глутаматдегидрогеназной активности в 1,5 раза (см. рисунок). При дополнительном внесении Ca^{2+} (0,1 г/л) в среду для выращивания *R. erythropolis* IMB Ac-5017 наблюдали повышение активности фермента почти в 2 раза.

Таблица 2. Активность НАДФ⁺-глутаматдегидрогеназы у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в зависимости от концентрации катионов цинка, магния и кальция в среде культивирования

Table 2. The activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase *A. calcoaceticus* IMB B-7241 depending on the concentration of the cations of zinc, magnesium and calcium in cultivation medium

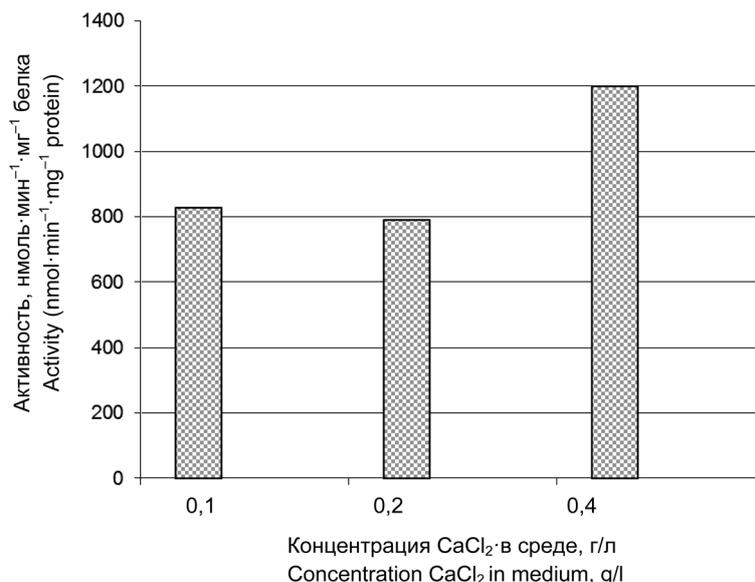
Концентрация катионов в среде культивирования, г/л			Активность, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂	
0*	0,1*	0*	380 ± 19
0	0,2	0	1140 ± 57
0	0,4	0	956 ± 47
0	0,1	0,1	920 ± 46
0	0,1	0,2	734 ± 36
38 мкМ	0,1	0	897 ± 45

Примечание. * – контроль (базовая среда).

Отметим, что реальное содержание катионов в клетках бактерий отличается от их концентрации в среде культивирования, а величина ферментативной активности в бесклеточном экстракте не всегда соответствует скорости реального процесса в интактных клетках, которая зависит не только от содержания фермента, но и от пула субстратов, регуляции фермента и т. д. Тем не менее, внесение в питательную среду активаторов или повышение их концентрации позволило увеличить активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у исследуемых штаммов.

Аналогичный прием был использован нами ранее для интенсификации синтеза микробного полисахарида этаполана на этаноле и ПАВ *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на *n*-гексадекане [13].

Так, исследование особенностей C₂-метаболизма у *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 (продуцент этаполана) показало, что ацетил-КоА-синтетазная реакция является скоростью-лимитирующей. Исключение Na⁺ (ингибитор фермента) из состава среды культивирования штамма IMB B-7005 и повышение содержания катионов калия (активатор) позволили устранить лимитирование C₂-метаболизма и повысить активность ацетил-КоА-синтетазы в 3 раза, а также запустить процесс синтеза этаполана на незабуференной среде, содержание солей в которой снижено в 4 раза (до 2,95 г/л).



Активность НАДФ⁺-глутаматдегидрогеназы *N. vaccinii* IMB B-7405 в зависимости от концентрации катионов кальция в среде культивирования

The activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase *N. vaccinii* IMV B-7405 depending on the concentration of calcium cations in cultivation medium

Изучение метаболизма *n*-гексадекана у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 позволило определить условия культивирования бактерий, обеспечивающие повышение синтеза ПАВ в 4 раза. Установлено, что у штамма IMB Ac-5017 катионы калия являются ингибиторами алкангидроксилазы и НАДФ⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы, а катионы натрия – активаторами этих ферментов. Снижение в среде с *n*-гексадеканом концентрации K⁺ до 1 мМ, повышение содержания Na⁺ до 35 мМ, внесение 36 мкМ Fe²⁺, необходимого для функционирования алкангидроксилазы, сопровождалось увеличением активности ключевых ферментов метаболизма *n*-гексадекана, а также повышением количества синтезированных ПАВ.

Заключение. Результаты, представленные в настоящей работе, подтверждают полученные ранее данные о возможности повышения активности ключевых ферментов биосинтеза целевого продукта в результате модификации состава питательной среды путем изменения в ней содержания активаторов (ингибиторов) этих ферментов. Вполне вероятно, что результатом такой активации ключевых ферментов может быть не только интенсификация синтеза целевого продукта (как установлено нами ранее [13]), но и регуляция его биологических свойств, что в перспективе позволит получать продукты со стабильными, заранее заданными, в зависимости от сферы их практического использования, свойствами.

Кроме того, полученные результаты указывают на необходимость проведения исследований по влиянию условий культивирования продуцентов на биологические свойства синтезированных целевых продуктов микробного синтеза.

Список использованных источников

1. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century / D. K. Santos [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17.
2. Fair, R. J. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century / R. J. Fair, Y. Tor // Perspect. Med. Chem. – 2014. – Vol. 6. – P. 25–64.
3. Demain, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery / A. L. Demain // J. Ind. Microbiol. Biotech. – 2014. – Vol. 41, N 2. – P. 185–201.
4. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds / L. Fracchi [et al.] // Bioengineering. – 2015. – Vol. 2, N 3. – P. 144–162.
5. Robbel, L. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery / L. Robbel, M. A. Marahiel // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, N 36. – P. 27501–27508.
6. Пирог, Т. П. Использование микробных поверхностно-активных веществ в биологии и медицине / Т. П. Пирог, А. Д. Конон, А. Б. Скочко // Биотехнология. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 24–38.

7. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants / T. P. Pirog [et al.] // *Biotechnologia acta*. – 2016. – Vol. 9, N 1. – P. 38–47.
8. Антимикробные свойства поверхностно-активных веществ, синтезированных в различных условиях культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 / Т. П. Пирог [и др.] // *Микробиол. журн.* – 2016. – Т. 78, № 3. – С. 2–12.
9. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium / T. Pirog [et al.] // *Food Bioprod. Proces.* – 2013. – Vol. 91, N 2. – P. 149–157.
10. Gageostatins A–C, antimicrobial linear lipopeptides from a marine *Bacillus subtilis* / F. S. Tareq [et al.] // *Mar. Drugs*. – 2014. – Vol. 12, N 2. – P. 871–885.
11. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes / A. Abalos [et al.] // *Langmuir*. – 2001. – Vol. 17, N 5. – P. 1367–1371.
12. Mandal, S. M. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry / S. M. Mandal, A. E. Barbosa, O. L. Franco // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – Vol. 31, N 5. – P. 338–345.
13. Подгорский, В. С. Интенсификация технологий микробного синтеза / В. С. Подгорский, Г. О. Иутинская, Т. П. Пирог. – Киев : Наук. думка, 2010. – 327 с.
14. Влияние факторов роста и некоторых микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 / Т. П. Пирог [и др.] // *Микробиол. журн.* – 2013. – Т. 75, № 5. – С. 19–27.
15. Особенности метаболизма глюкозы и глицерола у *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – продуцента поверхностно-активных веществ / Т. П. Пирог [и др.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – Vol. 87, N 2. – P. 66–75.
16. Sakamoto, N. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties / N. Sakamoto, A. M. Kotre, M. A. Savageau // *J. Bacteriol.* – 1975. – Vol. 124, N 2. – P. 775–783.
17. Hudson, R. C. Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1 / R. C. Hudson, L. D. Ruttersmith, R. M. Daniel // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1993. – Vol. 1202, N 2. – P. 244–250.
18. Lee, M. K. Extremely thermostable glutamate dehydrogenase (GDH) from the freshwater archaeon *Thermococcus waiotapuensis*: cloning and comparison with two marine hyperthermophilic GDHs / M. K. Lee, J. M. González, F. T. Robb // *Extremophiles*. – 2002. – Vol. 6, N 2. – P. 151–159.
19. Glutamate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1: enzymatic characterization, identification of the encoding gene, and phylogenetic implications / M. W. Bhuiya [et al.] // *Extremophiles*. – 2000. – Vol. 4, N 6. – P. 333–341.
20. Sarada, K. V. Isolation and characterisation of glutamate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* CDC 46 / K. V. Sarada, N. A. Rao, T. A. Venkatasubramanian // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1980. – Vol. 615, N 2. – P. 299–308.
21. Lin, H. P. Purification and characterization of NADP⁺-specific glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* / H. P. P. Lin, H. C. Reeves // *Curr. Microbiol.* – 1991. – Vol. 22, N 6. – P. 371–376.
22. Choudhury, R. *Aspergillus terreus* NADP-glutamate dehydrogenase is kinetically distinct from the allosteric enzyme of other *Aspergilli* / R. Choudhury, N. S. Puneekar // *Mycol. Res.* – 2009. – Vol. 113, N 10. – P. 1121–1126.

References

1. Santos D. K., Rufino R. D., Luna J. M., Santos V. A., Sarubbo L. A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 3. DOI: 10.3390/ijms17030401
2. Fair R. J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 2014, vol. 6, pp. 25–64. DOI: 10.4137/PMC.S14459
3. Demain A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, vol. 41, no. 2, pp. 185–201. DOI: 10.1007/s10295-013-1325-z
4. Fracchia L., Banat J. J., Cavallo M., Ceresa C., Banat I. M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. *AIMS Bioengineering*, 2015, vol. 2, no. 3, pp. 144–162. DOI: 10.3934/bioeng.2015.3.144
5. Robbel L., Marahiel M. A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, no. 36, pp. 27501–27508. DOI: 10.1074/jbc.R110.128181. Epub. 2010
6. Pirog T. P., Konon A. D., Skochko A. B. Microbial surface active substances use in biology and medicine. *Biotechnologia acta* [Biotechnology], 2011, vol. 4, no. 2, pp. 24–38 (in Russian).
7. Pirog T. P., Panasyuk E. V., Nikityuk L. V., Iutynska G. O. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Biotechnologia acta*, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 38–47. DOI: 10.15407/biotech9.01.038
8. Pirog T. P., Savenko I. V., Shevchuk T. A., Krutous N. V., Iutynska G. O. Antimicrobial properties surfactants synthesized under different cultivation conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Microbiologichny Zhurnal* [Microbiology Journal], 2016, vol. 78, no. 3, pp. 2–12 (in Russian).
9. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, vol. 91, no. 2, pp. 149–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.001>.
10. Tareq F. S., Lee M. A., Lee H. S., Lee J. S., Lee Y. J., Shin H. J. Gageostatins A–C, antimicrobial linear lipopeptides from a marine *Bacillus subtilis*. *Marine Drugs*, 2014, vol. 12, no. 2, pp. 871–885. DOI: 10.3390/md12020871
11. Abalos A., Pinazo A., Infante M. R., Casals M., Garcia F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, 2001, vol. 17, no. 5, pp. 1367–1371.

12. Mandal S. M., Barbosa A. E., Franco O. L. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnology Advances*, 2013, vol. 31, no. 5, pp. 338–345. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004
13. Podgorskiy V. S., Iutinskaya G. O., Pirog T. P. *Intensification of microbial synthesis technologies*. Kyiv, *Naykova Dumka* [Scientific Thought], 2010. 327 p. (in Russian).
14. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Mashchenko O. Yu., Parfenyuk S. A., Iutinskaya G. A. Effect of growth factors and some microelements on biosurfactant synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Microbiologichny Zhurnal* [Microbiology Journal], 2013, vol. 75, no. 5, pp. 19–27 (in Russian).
15. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Beregova K. A., Kudrya N. V. Peculiarities of glucose and glycerol metabolism in *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2015, vol. 87, no. 2, pp. 66–75 (in Russian).
16. Sakamoto N., Kotre A. M., Savageau M. A. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology*, 1975, vol. 124, no. 2, pp. 775–783.
17. Hudson R. C., Ruttersmith L. D., Daniel R. M. Glutamate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterial isolate AN1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1202, no. 2, pp. 244–250.
18. Lee M. K., González J. M., Robb F. T. Extremely thermostable glutamate dehydrogenase (GDH) from the freshwater archaeon *Thermococcus waiotapuensis*: cloning and comparison with two marine hyperthermophilic GDHs. *Extremophiles*, 2002, vol. 6, no. 2, pp. 151–159.
19. Bhuiya M. W., Sakuraba H., Kujo C., Nunoura-Kominato N., Kawarabayasi Y., Kikuchi H., Ohshima T. Glutamate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1: enzymatic characterization, identification of the encoding gene, and phylogenetic implications. *Extremophiles*, 2000, vol. 4, no. 6, pp. 333–341.
20. Sarada K. V., Rao N. A., Venkatasubramanian T. A. Isolation and characterisation of glutamate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* CDC 46. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, vol. 615, no. 2, pp. 299–308.
21. Lin H. P. P., Reeves H. C. Purification and characterization of NADP⁺-specific glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 1991, vol. 22, no. 6, pp. 371–376.
22. Choudhury R., Puneekar N. S. *Aspergillus terreus* NADP-glutamate dehydrogenase is kinetically distinct from the allosteric enzyme of other *Aspergilli*. *Mycological Research*, 2009, vol. 113, no. 10, pp. 1121–1126. DOI: 10.1016/j.mycres.2009.07.009

Информация об авторах

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

Шевчук Татьяна Андреевна – вед. инженер. Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины (ул. Академика Заболотного, 154, 03143, г. Киев, Украина).

Савенко Инга Владимирована – аспирант. Национальный университет пищевых технологий (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: inga92@ukr.net.

Луцай Дарья Андреевна – студент. Национальный университет пищевых технологий (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Киев, Украина). E-mail: lutayda0@ukr.net.

Information about the authors

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

Tatiana A. Shevchuk – Leading Engineer. Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine (154, Academician Zabolotny Str., 03143, Kiev, Ukraine).

Inga V. Savenko – Postgraduate student. National University of Food Technologies (68, Vladimirskaya Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: inga92@ukr.net.

Dar'ya A. Lutsai – Student. National University of Food Technologies (68, Vladimirskaya Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: lutayda0@ukr.net.

ISSN 1029-8940 (print)

УДК 634.11:631.541.11]:581.143.6:547.587.11

Поступила в редакцию 15.02.2017

Received 15.02.2017

В. А. Шапорева¹, А. А. Змушко², Е. В. Колбанова²¹Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка, Минск, Республика Беларусь²Институт плодородия, пос. Самохваловичи, Республика Беларусь**ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА РИЗОГЕНЕЗ
РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Аннотация. В ходе исследований выявлено ингибирующее влияние салициловой кислоты на выход укорененных растений-регенерантов подвоя 54-118, которое усиливалось с увеличением ее концентрации. При использовании салициловой кислоты в высокой концентрации 2,0 и 3,0 мг/л данный показатель составил $9,71 \pm 2,29$ и $4,17 \pm 2,08$ % соответственно. Отмечено негативное влияние высоких концентраций салициловой кислоты на закладку, рост корней, коэффициент развития корневой системы у подвоя 54-118 на протяжении первых 3 недель субкультивирования.

На выход укорененных растений-регенерантов подвоя 106-13 аналогичного ингибирующего влияния не наблюдалось. Выход укорененных растений варьировался от $78,21 \pm 3,81$ % (без салициловой кислоты) до $90,47 \pm 4,76$ % (1,5 мг/л салициловой кислоты). Салициловая кислота ни в одной из изученных концентраций не оказала влияние на количество корней, коэффициент развития корневой системы у подвоя 106-13 в условиях *in vitro*, но в высокой концентрации (3,0 мг/л) ингибировала рост корней на протяжении всего времени субкультивирования.

Ключевые слова: яблоня, подвои 106-13 и 54-118, ризогенез, культура *in vitro*, салициловая кислота

Для цитирования: Шапорева, В. А. Влияние салициловой кислоты на ризогенез растений-регенерантов подвоев яблони в культуре *in vitro* / В. А. Шапорева, А. А. Змушко, Е. В. Колбанова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 75–80.

V. A. Shaporeva¹, A. A. Zmushko², E. V. Kolbanova²¹Belarusian State Pedagogical University named after Maxim Tank, Minsk, Republic of Belarus²Institute for Fruit Growing, Samokhvalovichy, Republic of Belarus**EFFECT OF SALICYLIC ACID ON RHYZOGENESIS OF APPLE ROOTSTOCK MICROPLANTS
IN *IN VITRO* CONDITIONS**

Abstract. The inhibiting influence of salicylic acid on percentage of rooted microplants of rootstock 54-118 was revealed (negative effect increase with increase of salicylic acid concentration). When using salicylic acid in concentration 2.0 and 3.0 mg/l, percentage of rooted microplants was 9.71 ± 2.29 and 4.17 ± 2.08 % respectively. Negative effect of high dose of salicylic acid on root number, root growth and root system development coefficient for 54-118 was found out after first 3 week of cultivation.

There was no similar inhibiting influence on percentage of rooted microplants of 106-13. Percentage of rooted microplants varied from 78.21 ± 3.81 (without salicylic acid) to 90.47 ± 4.76 % (1.5 mg/l of salicylic acid). In all studied concentrations salicylic acid didn't influence on number of roots, on root system development coefficient of 106-13 microplants. In high concentration (3.0 mg/l) salicylic acid inhibited root growth of 106-13 microplants.

Keywords: apple rootstock 106-13 and 54-118, rhizogenesis, *in vitro* culture, salicylic acid

For citation: Shaporeva V. A., Zmushko A. A., Kolbanova E. V. Effect of salicylic acid on rhizogenesis of apple rootstock microplants in *in vitro* conditions. *Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 75–80 (in Russian).

Введение. В структуре плодовых насаждений Республики Беларусь яблоня занимает более 90 % площадей и является одной из приоритетных для страны культур [1].

Выращивание здорового посадочного материала и ускоренное размножение высококачественных подвоев плодовых культур является перспективным направлением в интенсификации плодородия во всем мире, в том числе и в Беларуси [2, 3].

Культура *in vitro* позволяет освободить растения от значительного числа фитовирусов [4–7]. Другие преимущества этого метода по сравнению с традиционным вегетативным размножением: возможность получения необходимого числа растений из небольшого количества исходного материала, экономия площадей и рабочей силы, уменьшение расходов, возможность обмена растительным материалом без риска переноса патогенов как внутри страны, так и в международном масштабе [8].

Ризогенез – важный этап размножения растений *in vitro* [9]. Усилить ризогенез пробирочных растений можно культивируя их на питательных средах, содержащих вещества с иммуностимулирующей активностью, например фенолкарбоновые кислоты [10]. Одной из самых распространенных и доступных фенолкарбоновых кислот является салициловая, которую причисляют к стрессовым фитогормонам [11]. М. Т. Упадышев, А. В. Гуськов, А. Д. Петрова предлагают использовать салициловую кислоту в качестве регулятора ризогенеза у плодовых и ягодных культур [10, 12].

Цель исследования – выявить влияние салициловой кислоты на процесс ризогенеза *in vitro* подвоев яблони 106-13 и 54-118.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в 2015–2016 гг.

Объект исследований: подвой яблони 106-13 и 54-118, районированные в Беларуси. Для ризогенеза *in vitro* использовали растения-регенеранты данных подвоев после 7-го субкультивирования в культуре *in vitro* и агаризованную среду: 1/2 макро- и микросолей, 1/2 хелата железа по Мурасиге и Скуга (MS), дополненную витаминами В₁, В₆, РР (по 0,5 мг/л), витамином С (1 мг/л), глицином (2 мг/л), с исключением мезоинозита, с пониженным содержанием сахарозы (20 г/л) и различным содержанием салициловой кислоты (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 мг/л) в сочетании с β-индолмасляной кислотой (ИМК) в концентрации 1,0 мг/л. Питательная среда без добавления салициловой кислоты, но с ИМК в концентрации 1,0 мг/л являлась контролем.

Длительность субкультивирования составляла 6 недель. Условия культивирования растений-регенерантов *in vitro*: освещение (лампы NARVA LT, 36 W) 2,5–3 тыс. лк, температура 20–22 °С и фотопериод 16/8 ч.

Влияние концентрации салициловой кислоты оценивали через 3 и 6 недель культивирования, учитывая долю укоренившихся растений-регенерантов (%), среднее количество корней (шт.), среднюю длину корней (см), коэффициент развития корневой системы. Показатель коэффициент развития корневой системы вычисляли по формуле $N_{\text{корней}} \cdot L_{\text{корней}} / 10$, где $N_{\text{корней}}$ – число корней на растение-регенерант; $L_{\text{корней}}$ – средняя длина корней [13].

Опыт был заложен в 3-кратной повторности, по 20 растений-регенерантов в каждой.

Статистическую обработку проводили, используя ANOVA, однофакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана при $p < 0,05$ для сравнения средних величин ($n = 3$) в программе Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. Ризогенез подвоя 106-13. В результате проведения однофакторного дисперсионного анализа после 3 недель субкультивирования выявлено влияние ($p < 0,01$) салициловой кислоты на количество укоренившихся растений-регенерантов и среднюю длину их корней. Однако в конце субкультивирования достоверного влияния салициловой кислоты на изучаемые показатели не наблюдалось.

Как видно из табл. 1, выход укорененных растений-регенерантов в контрольном варианте без добавления салициловой кислоты был высоким ($75,83 \pm 4,39$ %) уже через 3 недели субкультивирования и в конце пассажа составил $78,21 \pm 3,81$ %. Использование салициловой кислоты в концентрации 1,5 мг/л позволило увеличить долю укоренившихся растений в конце субкультивирования до $90,47 \pm 4,76$ %, что достоверно отличалось от контрольного варианта. Использование салициловой кислоты в других

Таблица 1. Влияние салициловой кислоты на процесс корнеобразования у подвоя 106-13 в условиях *in vitro*

Table 1. Effect of salicylic acid on rooting process at the 106-13 rootstock *in vitro*

Концентрация салициловой кислоты, мг/л	Доля укоренившихся растений-регенерантов, %		Среднее к-во корней, шт.		Средняя длина корней, см	
	через 3 недели	через 6 недель	через 3 недели	через 6 недель	через 3 недели	через 6 недель
0 (контроль)	$75,83 \pm 4,39^{ab}$	$78,21 \pm 3,81^b$	$4,17 \pm 0,56^a$	$6,27 \pm 0,66^a$	$1,23 \pm 0,18^a$	$3,68 \pm 0,09^b$
0,5	$70,28 \pm 1,53^{ac}$	$89,44 \pm 1,94^a$	$4,66 \pm 0,74^a$	$6,21 \pm 1,00^a$	$1,45 \pm 0,05^a$	$3,04 \pm 0,05^a$
1,0	$64,29 \pm 0,00^c$	$83,33 \pm 2,38^{ab}$	$5,26 \pm 0,24^a$	$6,38 \pm 0,29^a$	$1,47 \pm 0,07^a$	$2,97 \pm 0,35^a$
1,5	$78,02 \pm 0,55^b$	$90,47 \pm 4,76^a$	$4,07 \pm 0,55^a$	$6,72 \pm 0,15^a$	$1,34 \pm 0,06^a$	$3,34 \pm 0,07^{ab}$
2,0	$76,67 \pm 1,67^{ab}$	$85,00 \pm 0,00^{ab}$	$4,83 \pm 0,19^a$	$6,96 \pm 0,36^a$	$1,30 \pm 0,11^a$	$3,23 \pm 0,06^{ab}$
3,0	$72,22 \pm 0,00^{ab}$	$87,04 \pm 1,85^{ab}$	$3,95 \pm 0,25^a$	$7,96 \pm 0,29^a$	$0,76 \pm 0,17^b$	$3,07 \pm 0,18^a$

Примечание. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана). В табл. 1–4 приведены средние значения ± стандартная ошибка.

концентрациях (1,0; 2,0 и 3,0 мг/л) привело к укоренению от 83,33 до 87,04 % растений-регенерантов, но достоверных отличий как между собой, так и по сравнению с контролем не выявлено.

Салициловая кислота ни в одной из изученных концентраций не оказала влияние на количество корней у подвоя 106-13 в условиях *in vitro*, но в высокой концентрации (3,0 мг/л) ингибировала рост корней на протяжении всего времени субкультивирования. Средняя длина корней через 3 недели на среде с добавлением салициловой кислоты в концентрации 3,0 мг/л составила $0,76 \pm 0,17$ см, что в 1,6 раза меньше, чем на среде без ее добавления. Данное ингибирующее влияние сохранилось и к концу культивирования растений (табл. 1).

В целом салициловая кислота не оказала влияния на коэффициент развития корневой системы у подвоя 106-13, и в конце субкультивирования данный показатель варьировался от $2,02 \pm 0,32$ до $2,50 \pm 0,20$ в зависимости от варианта опыта (табл. 2).

Таблица 2. Влияние салициловой кислоты на коэффициент развития корневой системы подвоя яблони 106-13 в условиях *in vitro*

Table 2. Effect of salicylic acid on rooting process of Apple rootstock 106-13 *in vitro*

Концентрация салициловой кислоты, мг/л	Коэффициент развития корневой системы	
	через 3 недели	через 6 недель
0 (контроль)	$0,74 \pm 0,16$	$2,41 \pm 0,25$
0,5	$0,60 \pm 0,18$	$2,02 \pm 0,32$
1,0	$0,83 \pm 0,07$	$2,18 \pm 0,13$
1,5	$0,64 \pm 0,11$	$2,28 \pm 0,06$
2,0	$0,72 \pm 0,08$	$2,30 \pm 0,13$
3,0	$1,00 \pm 0,66$	$2,50 \pm 0,20$

Примечание. Приведенные в столбцах данные статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Ризогенез подвоя 54-118. В ходе исследования установлено достоверное влияние ($p < 0,001$) салициловой кислоты на количество укоренившихся растений-регенерантов через 3 и 6 недель субкультивирования и достоверное влияние ($p < 0,001$) на среднее количество, длину корней и коэффициент развития корневой системы только через 3 недели субкультивирования.

Установлено негативное влияние салициловой кислоты на ризогенез подвоя 54-118. Во всех изученных концентрациях (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 мг/л) она достоверно снижала долю укоренившихся растений-регенерантов. Минимальной она была во все сроки укоренения на среде с содержанием салициловой кислоты в максимальной концентрации 2,0 и 3,0 мг/л – $9,71 \pm 2,29$ и $4,17 \pm 2,08$ % соответственно (табл. 3).

Отмечено негативное влияние высоких концентраций салициловой кислоты на закладку, рост корней, коэффициент развития корневой системы у подвоя 54-118 на протяжении 3 недель субкультивирования. Среднее количество корней на растение на средах с 2,0 и 3,0 мг/л салициловой кислоты составило $1,17 \pm 0,17$ и $1,67 \pm 0,88$ шт., что достоверно отличалось от контроля ($8,39 \pm 1,19$ шт.).

Таблица 3. Влияние салициловой кислоты на процесс корнеобразования у подвоя 54-118 в условиях *in vitro*

Table 3. Effect of salicylic acid on rooting process at the 54-118 rootstock *in vitro*

Концентрация салициловой кислоты, мг/л	Доля укоренившихся растений-регенерантов, %		Среднее к-во корней, шт.		Средняя длина корней, см	
	через 3 недели	через 6 недель	через 3 недели	через 6 недель	через 3 недели	через 6 недель
0 (контроль)	$70,37 \pm 1,85^c$	$77,77 \pm 0,00^c$	$8,39 \pm 1,19^a$	$9,05 \pm 1,11^a$	$1,56 \pm 0,14^d$	$3,11 \pm 0,17^{ab}$
0,5	$26,67 \pm 1,67^a$	$31,67 \pm 1,67^a$	$7,56 \pm 0,95^a$	$7,40 \pm 0,55^a$	$0,70 \pm 0,09^b$	$2,13 \pm 0,19^{ab}$
1,0	$52,63 \pm 0,00^d$	$52,63 \pm 0,00^d$	$9,40 \pm 0,75^a$	$10,67 \pm 1,05^a$	$1,21 \pm 0,04^{cd}$	$3,58 \pm 0,12^b$
1,5	$25,88 \pm 0,44^a$	$31,05 \pm 0,53^a$	$7,53 \pm 2,05^a$	$8,06 \pm 0,89^a$	$0,95 \pm 0,16^{bc}$	$2,70 \pm 0,38^{ab}$
2,0	$9,71 \pm 2,29^c$	$9,71 \pm 2,29^c$	$1,17 \pm 0,17^b$	$3,83 \pm 2,59^a$	$0,33 \pm 0,12^a$	$1,73 \pm 0,79^a$
3,0	$4,17 \pm 2,08^b$	$4,17 \pm 2,08^b$	$1,67 \pm 0,88^b$	$8,33 \pm 4,26^a$	$0,17 \pm 0,12^a$	$1,87 \pm 0,93^{ab}$

Примечание. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Средняя длина корней на этих же средах была в 4,7 и 9,2 раза меньше, чем в контроле без салициловой кислоты (табл. 3). В результате коэффициент развития корневой системы составил $0,04 \pm 0,01$ и $0,05 \pm 0,01$, что было достоверно ниже, чем в контрольном варианте ($1,32 \pm 0,13$) (табл. 4). Однако к концу субкультивирования данное негативное влияние сгладилось и достоверных различий по всем этим показателям не наблюдалось.

Таблица 4. Влияние салициловой кислоты на коэффициент развития корневой системы подвоя яблони 54-118 в условиях *in vitro*

Table 4. Effect of salicylic acid on rooting process of Apple rootstock 54-118 *in vitro*

Концентрация салициловой кислоты, мг/л	Коэффициент развития корневой системы	
	через 3 недели	через 6 недель
0 (контроль)	$1,32 \pm 0,13^{ab}$	$2,93 \pm 0,37^{ab}$
0,5	$0,83 \pm 0,11^a$	$2,04 \pm 0,32^{ab}$
1,0	$1,37 \pm 0,19^b$	$4,06 \pm 0,40^b$
1,5	$0,91 \pm 0,28^{ab}$	$2,58 \pm 0,56^{ab}$
2,0	$0,04 \pm 0,01^c$	$1,07 \pm 0,91^a$
3,0	$0,05 \pm 0,01^c$	$2,33 \pm 1,19^{ab}$

Примечание. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Таким образом, нецелесообразно использовать салициловую кислоту в изученных концентрациях для увеличения коэффициента развития корневой системы как подвоя 54-118, так и подвоя 106-13. Сходные результаты получены Т. А. Красинской при изучении влияния салициловой кислоты на морфологическое и физиолого-биохимическое развитие подвоя вишни и черешни GiSelA 5. Ею показано, что применение фенолкарбоновых кислот совместно с ИМК на развитие корневой системы в целом не оказывает стимулирующего влияния [14–16].

Следует отметить, что салициловая кислота уменьшала длину корней у обоих изученных нами подвоев – 106-13 и 54-118. Кроме того, результаты исследований Н. П. Дорошенко показали, что использование салициловой кислоты стимулирует закладку корней у винограда в культуре *in vitro*, но отрицательно влияет на их рост в длину [17].

В литературе не имеется однозначных данных по влиянию салициловой кислоты на процесс укоренения растений в культуре *in vitro*. А. Д. Петрова и М. Т. Упадышев [18] в своих исследованиях отмечают, что салициловая кислота в ряде случаев проявляет ингибирующие свойства. По данным О. В. Поротикова и соавт. [19], салициловая кислота в концентрации до 2 мг/л при добавлении в безгормональную среду индуцирует процесс ризогенеза, но повышенное ее содержание (20,7 мг/л) служит ингибирующим фактором у эксплантов ежевики *Whitford Thornless*. М. Т. Упадышев и А. В. Гуськов [10, 20] отмечали, что салициловая кислота, добавленная в питательную среду вместе с ИМК, стимулирует корнеобразование у побегов ряда плодовых и ягодных культур. Как правило, повышение укореняемости побегов отмечается в диапазоне концентраций салициловой кислоты от 1,0 до 5,0 мг/л, тогда как для оптимального роста корней предел допустимых концентраций ниже – от 0,7 до 2 мг/л.

А. Д. Петрова и М. Т. Упадышев [18] отмечают, что реакция растений на фенолкарбоновые кислоты зависит от сортовых и видовых особенностей культуры. Полученные нами данные также позволяют утверждать, что изученные подвои по-разному отреагировали на добавление в питательную среду салициловой кислоты.

Закключение. Выявлено ингибирующее влияние салициловой кислоты на выход укорененных растений-регенерантов подвоя 54-118, которое усиливалось с увеличением ее концентрации. При использовании салициловой кислоты в высокой концентрации (2,0 и 3,0 мг/л) данный показатель составил $9,71 \pm 2,29$ и $4,17 \pm 2,08$ % соответственно. Отмечено негативное влияние высоких концентраций салициловой кислоты на закладку, рост корней, коэффициент развития корневой системы у подвоя 54-118 на протяжении первых 3 недель субкультивирования.

На выход укорененных растений-регенерантов подвоя 106-13 аналогичного ингибирующего влияния не наблюдалось. Выход укорененных растений варьировался от $78,21 \pm 3,81$ (без салици-

ловой кислоты) до $90,47 \pm 4,76$ % (1,5 мг/л салициловой кислоты). Салициловая кислота ни в одной из изученных концентраций не оказала влияние на количество корней, коэффициент развития корневой системы у подвоя 106-13 в условиях *in vitro*, но в высокой концентрации (3,0 мг/л) ингибировала рост корней на протяжении всего времени субкультивирования.

Список использованных источников

1. Козловская, З. А. Совершенствование сортимента яблони в Беларуси / З. А. Козловская. – Минск : [б. и.], 2003. – 167 с.
2. Самусь, В. А. Развитие плодородства в Беларуси в современных условиях / В. А. Самусь // Актуальные проблемы освоения достижений науки в промышленном плодородстве : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Самохваловичи, 21–22 авг. 2002 г. / Беларус. науч.-исслед. ин-т плодородства ; ред. В. А. Самусь [и др.]. – Минск, 2002. – С. 3–5.
3. Самусь, В. А. Состояние и пути развития белорусского плодородства / В. А. Самусь // Плодородство : науч. тр. / Беларус. науч.-исслед. ин-т плодородства ; редкол. : В. А. Самусь (глав. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2000. – Т. 13. – С. 19–25.
4. Angiboust, A. La multiplication vegetative “in vitro”, une nouvelle technique de pointe au service de l’arboriculture / A. Angiboust // Arboriculture Fruitiere. – 1980. – Vol. 27 (321), N 11. – P. 39–46.
5. Hogue, E. J. Rapid production methods for Ottawa-3 rootstock and branched apple nursery stock / E. J. Hogue, D. Neilsen // HortScience. – 1991. – Vol. 26, N 11. – P. 1416–1419.
6. Высоцкий, В. А. Клональное микроразмножение плодовых растений и декоративных кустарников / В. А. Высоцкий // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодородстве и цветоводстве : сб. науч. тр. – Мичуринск, 1989. – С. 3–8.
7. Spiegel, S. Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm / S. Spiegel, R. H. Converse, E. A. Frison // Plant Disease. – 1993. – Vol. 77, N 12. – P. 1176–1180.
8. Высоцкий, В. А. О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур / В. А. Высоцкий // С.-х. биология. Сер. Биология растений. – 1995. – № 5. – С. 57–63.
9. Деменко, В. И. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* / В. И. Деменко, К. А. Шестибратов, В. Г. Лебедев // Изв. ТСХА. – 2010. – Вып. 1. – С. 73–85.
10. Упадышев, М. Т. Салициловая кислота как регулятор ризогенеза у плодовых и ягодных культур *in vitro* / М. Т. Упадышев, А. В. Гуськов // С.-х. биология. – 1998. – № 5. – С. 63–68.
11. Дубровина, А. С. Влияние трансформации клеточной культуры винограда *Vitis amurensis* Rupr. геном *rolB* из *Agrobacterium rhizogenes* на биосинтез резвератрола : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / А. С. Дубровина ; Биол.-почв. ин-т ДВО РАН. – Владивосток, 2010. – 22 с.
12. Петрова, А. Д. Фенольные соединения при оздоровлении и размножении садовых культур : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.07 / А. Д. Петрова ; Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. – М., 2001. – 19 с.
13. Hujun, J. The study of meristem-tip culture of peach (*Prunus persica* L.) / J. Hujun, P. Jishu, M. Xinfu // Acta Agr. Univ. Pekin. – 1993. – Vol. 19, N 1. – P. 49–52.
14. Красинская, Т. А. Морфофизиологические характеристики развития растений-регенерантов клоновых подвоев и сортов рода *Cerasus* Mill. в культуре *in vitro* и при адаптации *ex vitro* : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / Т. А. Красинская ; Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2009. – 22 с.
15. Красинская, Т. А. Ризогенез подвоев рода *Cerasus* Mill. в условиях *in vitro* / Т. А. Красинская // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2006. – № 5. – С. 98–101.
16. Красинская, Т. А. Укоренение *in vitro* и *ex vitro* подвоя вишни и черешни / Т. А. Красинская // Наука и инновации. – 2008. – № 6 (64). – С. 42–45.
17. Дорошенко, Н. П. Применение салициловой кислоты при клональном микроразмножении винограда / Н. П. Дорошенко // Повышение конкурентоспособности продукции виноградарства и виноделия на основе создания новых сортов и технологий : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию Н. И. Вавилова, г. Новочеркасск, 20 июня 2012 г. / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т виноградарства и виноделия им. Я. И. Потапенко Рос. акад. с.-х. наук. – Новочеркасск, 2012. – С. 103–108.
18. Петрова, А. Д. Фенолкарбоновые кислоты как регуляторы роста ягодных и плодовых культур / А. Д. Петрова, М. Т. Упадышев // Плодородство и ягодоводство России : сб. науч. работ / Всерос. селекцион.-технол. ин-т садоводства и питомниководства ; редкол. : В. И. Кашин [и др.]. – М., 1999. – Т. 6. – С. 69–75.
19. Поротикова, О. В. Действие салициловой кислоты и ИМК на этапе укоренения ежевики *Whitford Thornless in vitro* / О. В. Поротикова, М. Б. Янковская, М. В. Романов // Вестн. МичГАУ. – 2013. – № 5. – С. 19–21.
20. Упадышев, М. Т. Ауксины и фенолкарбоновые кислоты как регуляторы ризогенеза растений рода *Rubus in vitro* / М. Т. Упадышев, А. В. Гуськов // С.-х. биология. – 1996. – № 1. – С. 92–98.

References

1. Kozlovskaja Z. A. *Improvement of apple assortment in Belarus*. Minsk, 2003. 167 p. (in Russian).
2. Samus' V. A. Development of fruit growing in Belarus in modern conditions. *Aktual'nye problemy osvoeniya dostizheniy nauki v promyshlennom plodovodstve: materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf.* [Actual problems of development of science achievements in industrial fruit growing: materials of the international scientific and practical conference], Belarusskii nauchno-issledovatel'skii institut plodovodstva [Belarusian Research Institute of Horticulture]. Minsk, 2002, pp. 2–5 (in Russian).

3. Samus' V. A. State and ways of development of the Belarusian fruit growing. *Plodovodstvo : nauchnye trudy* [Fruit growing: scientific works]. *Belorusskii nauchno-issledovatel'skii institut plodovodstva* [Belarusian Research Institute of Horticulture]. Samokhvalovich, 2000, vol. 13, pp. 19–25 (in Russian).
4. Angiboust A. La multiplication vegetative “in vitro”, une nouvelle technique de pointe au service de l'arboriculture. *Arboriculture Fruitiere*, 1980, vol. 27 (321), no. 11, pp. 39–46.
5. Hogue E. J., Neilsen D. Rapid production methods for Ottawa-3 rootstock and branched apple nursery stock. *HortScience*, 1991, vol. 26, no. 11, pp. 1416–1419.
6. Vysotskii, V. A. Clonal micropropagation of fruit plants and ornamental shrubs. *Mikrorazmnozhenie i ozdorovlenie rastenii v promyshlennom plodovodstve i tsvetovodstve : sbornik nauchnykh trudov* [Micropropagation and improvement of plants in industrial horticulture and floriculture: proceedings]. Michurinsk, 1989, pp. 3–8 (in Russian).
7. Spiegel S., Converse R. H., Frison E. A. Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germplasm. *Plant Disease*, 1993, vol. 77, no. 12, pp. 1176–1180.
8. Vysotskii V. A. About genetic stability during micropropagation of fruit and berry crops. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya. Seriya Biologiya rastenii* [Agricultural Biology. Series Plant Biology], 1995, no. 5, pp. 57–63 (in Russian).
9. Demenko V. I., Shestibratov K. A., Lebedev V. G. Rooting is a key stage of *in vitro* plant propagation. *Izvestiia TSHA* [Bulletin of the TSHA], 2010, iss. 1, pp. 73–85 (in Russian).
10. Upadyshev M. T., Gus'kov A. V. Salicylic acid as regulator of rhizogenesis in fruit and berry crops in *in vitro* conditions. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya*. [Agricultural Biology], 1998, no. 5, pp. 63–68 (in Russian).
11. Dubrovina A. S. Influence of transformation of cellular culture of *Vitis amurensis* Rupr by gene rolB from *Agrobacterium rhizogenes* on biosynthesis of rezveratrol, Abstract of Ph. D. dissertation, Biotechnology (including bionanotechnology), The Institute of Biology and Soil Science of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. Vladivostok, 2010. 22 p. (in Russian).
12. Petrova A. D. Phenolic compounds in improvement and propagation of fruit crops, Abstract of Ph. D. dissertation. Molecular genetics, All-Russian Selection and Technology Institute of Horticulture and Nursery. Moscow, 2001. 19 p. (in Russian).
13. Hujun J., Jishu P., Xinfu M. The study of meristem-tip culture of peach (*Prunus persica* L.). *Acta Agricultural University of Pekin*, 1993, vol. 19, no. 1, pp. 49–52.
14. Krasinskaja T. A. Morphophysiological characteristics of microplants of clonal rootstocks and cultivars of *Cerasus* Mill. in *in vitro* culture and at *ex vitro* adaptation stage, Abstract of Ph. D. dissertation, Biological Sciences. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus. Minsk, 2009. 210 p. (in Russian).
15. Krasinskaja, T. A. Rhizogenesis of rootstocks of genus *Cerasus* Mill. in *in vitro* conditions. *Vestsi Natsyional'nai akademii navuk Belarusi, Seriya biialagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2006, no. 5, pp. 98–101 (in Russian).
16. Krasinskaja T. A. *In vitro* and *ex vitro* rooting of cherry and sweet cherry rootstock. *Nauka i innovacii* [Science and Innovation], 2008, no. 6 (64), pp. 42–45 (in Russian).
17. Doroshenko N. P. Use of salicylic acid in micropropagation of grapevine. Increase in product competitiveness of wine growing and winemaking on the basis of creation of new cultivars and technologies. *Povyshenie konkurentosposobnosti produkcii vinogradarstva i vinodelija na osnove sozdaniya novykh sortov i tehnologij : materialy Mezhdunarnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, posvjashhennoj 125-letiju N. I. Vavilova* [Increase the competitiveness of products of viticulture and winemaking through the creation of new varieties and technologies: materials Mezhdunarnoj scientific-practical conference dedicated to the 125th anniversary of N. I. Vavilov], Rossijskaja akademija sel'skhozajstvennykh nauk, Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut vinogradarstva i vinodelija im. Ja. I. Potapenko Rossijskoj akademii sel'skhozajstvennykh nauk [Russian Academy of Sciences selskagospadarchyh, All-Russian Scientific Research Institute of Viticulture and Winemaking them. EI Potapenko Russian Academy of Sciences selskagospadarchyh]. Novocherkassk, 2012, pp. 103–108 (in Russian).
18. Petrova A. D., Upadyshev M. T. Phenol carboxylic acids as growth regulators of berry and fruit crops. *Plodovodstvo i jagodovodstvo Rossii : sbornik nauchnykh rabot* [Pomiculture and small fruits culture in Russia: the collection of scientific works], Vserossiiskii selekcionno-tekhnologicheskii institut sadovodstva i pitomkovodstva [All-Russian Selection and Technology Institute of Horticulture and Nursery]. Moscow, 1999, vol. 6, pp. 69–75 (in Russian).
19. Porotikova O. V., Jankovskaja M. B., Romanov M. V. Effect of salicylic acid and IBA at *in vitro* rooting stage of blackberry Whitford Thornless. *Vestnik MichGAU* [Bulletin MichGAU], 2013, no. 5, pp. 19–21 (in Russian).
20. Upadyshev M. T., Gus'kov A. V. Auxins and phenol carboxylic acids as rhizogenesis regulators of plants in genus *Rubus in vitro*. *Sel'skhozajstvennaja biologija* [Agricultural Biology], 1996, no. 1, pp. 92–98 (in Russian).

Информация об авторах

Шапорева Виктория Александровна – студент. Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка (ул. Советская, 18, 220050, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: viktorija_shaporeva@mail.ru.

Змушко Александр Александрович – канд. с/х наук, науч. сотрудник. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, пос. Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь). E-mail: temlein2015@yandex.ru.

Колбанова Елена Вячеславовна – канд. биол. наук, ведущий лабораторией. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, пос. Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь). E-mail: kolbanova@tut.by.

Information about the authors

Viktoria A. Shaporeva – Student. Belarusian State Pedagogical University named after Maxim Tank (18, Sovetskaya Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: viktorija_shaporeva@mail.ru.

Aleksandr A. Zmushko – Ph. D. (Agric.), Researcher. Institute for Fruit Growing (2, Kovalyov St., 223013, Samokhvalovichy, Republic of Belarus). E-mail: temlein2015@yandex.ru.

Elena V. Kolbanova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute for Fruit Growing (2, Kovalyov St., 223013, Samokhvalovichy, Republic of Belarus). E-mail: kolbanova@tut.by.

ISSN 1029-8940 (print)
УДК 635.24:581.192(476)

Поступила в редакцию 28.07.2017
Received 28.07.2017

Д. А. Дубарь

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) ПРИ ИНТРОДУКЦИИ В БЕЛАРУСИ

Аннотация. Исследованы сезонные изменения содержания сухих веществ, свободных органических и аскорбиновой кислот, растворимых сахаров, пектиновых веществ, инулина, биофлавоноидов и показателя сахарокислотного индекса в подземных органах 5 модельных сортов топинамбура из коллекции ЦБС НАН Беларуси. Установлено, что интегральный уровень их питательной и витаминной ценности по совокупности 8 признаков у большинства таксонов в осенний период года в 1,1–4,9 раза выше, чем в весенний, при этом наиболее выраженные различия отмечались у сорта *Скороспелка*, а у остальных сортов размер данного превышения отставал в 3,1–5,3 раза. Полученные данные однозначно свидетельствуют о большей целесообразности осеннего срока заготовки клубней по сравнению с весенним.

Ключевые слова: топинамбур, клубни, биохимический состав, питательная ценность, сортовые особенности, сезонные изменения

Для цитирования: Дубарь, Д. А. Сезонная динамика биохимического состава клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) при интродукции в Беларуси / Д. А. Дубарь // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 81–87.

D. A. Dubar

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

SEASONAL DYNAMICS OF THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF JERUSALEM ARTICHOKE (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) TUBERS AFTER INTRODUCTION IN BELARUS

Abstract. A comparative study of the biochemical composition of the tubers of 5 varieties of Jerusalem artichoke from the collection of Central botanical garden in the autumn and spring was conducted. The content of dry substances, free organic and ascorbic acids, soluble sugars, pectin substances, inulin, bioflavonoids and the index of the sugar-acid index were measured. It has been established that the integral level of nutritional and vitamin values by totality of eight determined characteristics was 1.1-4.9 times higher in the autumn than in spring with the most essential differences in the variety *Skorospelka*. The study unequivocally attests the greater expediency of the autumn term of harvesting of tubers, in comparison with spring.

Keywords: Jerusalem artichoke, tubers, biochemical composition, nutritional value, varietal features, seasonal changes

For citation: Dubar D. A. Seasonal dynamics of the biochemical composition of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers after introduction in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 81–87 (in Russian).

Введение. В настоящее время в растениеводстве расширяется использование топинамбура в качестве кормовой, пищевой, лекарственной и биоэнергетической культуры [1, 2]. Подземные органы данного растения являются ценным природным сырьем для производства продуктов лечебно-профилактического питания благодаря высокому содержанию в них широкого спектра действующих веществ и в первую очередь фруктозанов. Важнейшим компонентом углеводного пула клубней топинамбура является инулин, используемый в профилактике и лечении сахарного диабета [3, 4]. Вместе с тем результаты исследований Д. А. Гусевой и Л. И. Горшковой [5] убедительно показали, что качественный и количественный состав углеводного комплекса клубней топинамбура зависит от сроков их заготовки. В связи с этим весьма актуальным являлось сравнительное исследование параметров накопления в них ряда действующих веществ в весенний и осенний периоды года.

Логично предположить, что процесс перезимовки клубней топинамбура в почве может сопровождаться значительным расходом органических соединений на поддержание метаболизма в холодное время года, тогда как в период вегетации в подземных органах растений, напротив, происходит активное их накопление. Можно также предположить, что темпы биосинтеза

действующих веществ у разных сортов топинамбура будут заметно различаться, что и обусловит к концу сезона определенные генотипические различия в их биохимическом составе.

С целью выявления профилирующих тенденций в изменении содержания действующих веществ разной химической природы в подземных органах топинамбура на протяжении сезона проведено сравнительное исследование наиболее продуктивных сортов данного вида из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси в начале и в конце вегетационного периода 2014 г.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования были взяты весенние (перезимовавшие) и осенние клубни одного вегетационного периода 5 модельных сортов топинамбура – *Скороспелка*, *Михайловский*, *Интерес-21*, *Сиреники-1* и *Десертный*.

При оценке биохимического состава клубней обозначенных таксонов в свежих усредненных пробах определяли содержание: сухих веществ – по ГОСТ 28561-90 [6], аскорбиновой кислоты (витамина С) – стандартным индофенольным методом [7], титруемых кислот (общей кислотности) – объемным методом [7]. В высушенных при температуре 50–60 °С усредненных пробах определяли содержание растворимых сахаров – ускоренным полумикрометодом [8], инулина – спектрофотометрическим методом [9], суммы пектиновых веществ – кальций-пектатным методом [10], суммы фенольных соединений – модифицированным колориметрическим методом Фолина–Чокалтеу [11]. Все аналитические определения выполнены в трехкратной биологической повторности. Для статистической обработки данных использовали программу Excel.

Результаты и их обсуждение. Сравнительное исследование биохимического состава подземных органов топинамбура в начале и в конце вегетационного периода 2014 г. выявило сходные и вместе с тем сравнительно широкие диапазоны варьирования его отдельных характеристик в сортовом ряду, соответствовавшие данным, приведенным в отечественной и зарубежной литературе [12–17]. По нашим оценкам, содержание сухих веществ в клубнях исследуемых сортов топинамбура в весенний период года варьировалось в таксономическом ряду в диапазоне значений от 20,7 до 26,5 %, в осенний – в диапазоне от 21,5 до 28,5 %.

Общеизвестно, что подземные органы топинамбура не отличаются повышенным накоплением свободных органических кислот, представленных в основном лимонной, яблочной, малоновой, янтарной и фумаровой [14]. Их содержание в сухой массе клубней после перезимовки не превышало 0,97–1,22 %, в осенний – 1,36–1,63 %. При этом содержание аскорбиновой кислоты было также незначительным и составляло соответственно 33,3–52,6 и 39,9–67,1 мг%, что свидетельствовало о невысокой способности клубней топинамбура к биосинтезу витамина С.

Отличительной чертой данного вида является богатый углеводный состав его клубней, что отмечают все исследователи [14, 18]. В связи с предполагаемым расходом растворимых сахаров на поддержание метаболизма подземных органов в зимнее время года следовало ожидать значительного истощения к весне запасов этих углеводов в клубнях. Однако, по нашим оценкам, их содержание оказалось весьма высоким и вполне сопоставимым с данными других авторов даже для осенних клубней [3–5, 14]. При этом диапазон варьирования содержания растворимых сахаров в таксономическом ряду был в пределах от 52,3 до 66,0 % сухой массы, что свидетельствовало о слабой выраженности генотипических различий. В осенний период года содержание данных углеводов в подземных органах топинамбура оказалось заметно меньшим, нежели в весенний, и варьировалось в таксономическом ряду в диапазоне более низких значений – от 39 до 54,3 %. В отличие от растворимых сахаров, для показателя сахарокислотного индекса, характеризуемого соотношением содержания последних и свободных органических кислот и указывающего на органолептические свойства клубней топинамбура, в начале сезона установлен весьма широкий диапазон изменения в таксономическом ряду – от 46,9 до 63,3 %, тогда как значения данного показателя в осенний период также заметно уступали таковым в весенний период, варьируясь в диапазоне от 24,4 до 38,6 %, что обусловлено не только более низким уровнем накопления в них растворимых сахаров, но и повышенным содержанием свободных органических кислот. При этом общее содержание пектиновых веществ в сухой массе клубней и в начале, и в конце вегетационного периода варьировалось в таксономическом ряду в сходных диапазонах значений – от 9,2 до 17,7 % и от 11,2 до 15,9 % соответственно.

Уникальность углеводного комплекса клубней топинамбура состоит в значительном содержании в них фруктозы и ее полимеров, высшим гомологом которых является инулин [14].

Его молекула представляет собой полифруктозан, содержащий обычно до 27–35 остатков фруктозы в фуранозной форме и один остаток глюкозы [19]. В сравнении с низкомолекулярным инулином из агавы и цикория, продаваемым на российском и европейском рынках, инулин, получаемый из клубней топинамбура, имеет более высокую степень полимеризации и активнее снижает уровень холестерина в крови больных сахарным диабетом [1], что делает его незаменимым лечебно-профилактическим средством. По оценкам разных авторов, в зависимости от почвенно-климатических условий района культивирования, технологии возделывания и сортовой принадлежности растений содержание инулина в клубнях топинамбура варьируется в довольно широком диапазоне значений – в пределах 38–70 % сухой массы [3, 4, 13, 16, 19]. Как показали результаты наших исследований, содержание инулина в сухой массе перезимовавших клубней топинамбура в начале сезона изменялось в таксономическом ряду в диапазоне значений от 49,0 до 58,2 %, что свидетельствовало о весьма заметных генотипических различиях в его накоплении. В конце вегетационного периода отмечены более высокие показатели накопления в клубнях данного полифруктозана – 51,7–75,9 %, что было сопоставимо с информацией других авторов [4, 16, 19, 20] и указывало на предпочтительность заготовки клубней топинамбура в Беларуси по данному признаку в осенний период года. Следует отметить, что меньшее содержание в них растворимых сахаров в конце сезона служит косвенным доказательством их расходования на биосинтез инулина в замещающих и дочерних клубнях.

Общеизвестно, что в растительном организме существует обратная взаимосвязь между синтезом белка и биофлавоноидов, использующих для построения своих молекул аминокислоту фенилаланин, а в ряде случаев и тирозин, и направляющих течение внутриклеточных процессов либо в сторону образования белка, либо в сторону образования фенольных соединений [21]. Как отмечают многие исследователи, если усиленно формируются молекулы белковых веществ, то ослабляется биосинтез биофлавоноидов, и наоборот. Поэтому высокобелковым культурам, к которым относится и топинамбур, не свойственно накопление значительных количеств полифенолов, чем и объясняется отсутствие особого интереса у исследователей к этому вопросу. Тем не менее в научной литературе встречаются отдельные сведения о содержании биофлавоноидов в клубнях топинамбура. По данным Б. Г. Цугкиева и соавт. [22], содержание в них этих биологически активных соединений не превышает 240 мг% сухой массы. Близкое к этому значение данного показателя (230 мг%) приведено в работе В. Ю. Бархатова и Э. И. Мамедовой [12]. По нашим оценкам, суммарное содержание биофлавоноидов в сухой массе клубней топинамбура в начале и в конце вегетационного периода варьировалось в таксономическом ряду в сходных диапазонах значений – от 129,8 до 375,0 мг% и от 162,0 до 310,5 мг% соответственно.

Сопоставление исследуемых характеристик биохимического состава клубней топинамбура в начале и в конце вегетационного периода позволило выявить отчетливые внутрисезонные различия, о выраженности которых можно судить по данным табл. 1. Согласно этим данным, клубни осеннего отбора характеризовались более высоким по сравнению с перезимовавшими содержанием сухих веществ (на 8–22 %), свободных органических кислот (на 25–48 %) и аскорбиновой кислоты (на 9–65 %) при наибольшей степени различий данных показателей соответственно

Таблица 1. Биохимический состав клубней тестируемых сортов топинамбура в осенний и весенний периоды года, % (2014 г.)

Table 1. Biochemical composition of studied tubers of Jerusalem artichoke cultivars in autumn and spring, % (2014)

Показатель	<i>Скороспелка</i>	<i>Михайловский</i>	<i>Интерес-21</i>	<i>Сиреники-1</i>	<i>Десертный</i>
Сухие вещества	+22,4	+12,8	+11,6	+7,5	+16,4
Свободные орган. кислоты	+24,6	+47,7	+31,5	+41,2	+45,9
Аскорбиновая кислота	+36,1	+9,4	+65,2	+18,8	+12,7
Растворимые сахара	-8,4	-19,7	-31,7	-36,4	-15,7
Сахарокислотный индекс	-26,2	-45,2	-47,9	-55,0	-42,5
Пектиновые вещества	+23,8	+9,7	+34,7	-5,1	-15,6
Инулин	+38,5	+3,3	-2,6	-	+37,1
Биофлавоноиды	+24,8	+5,0	-7,8	+21,5	-27,3

Примечание. Прочерк означает отсутствие достоверных различий.

у сортов *Скороспелка*, *Михайловский* и *Интерес-21*, наименьшей – у сортов *Сиреники-1* и *Десертный*.

Показатели накопления растворимых сахаров в клубнях топинамбура и значения их сахарокислотного индекса в осенний период года были ниже, чем в весенний, соответственно на 8–36 и 26–55 %. На наш взгляд, это может быть обусловлено расходом значительной части растворимых сахаров в период активной вегетации на биосинтез других компонентов углеводного пула подземных органов, а также ряда вторичных метаболитов, тогда как более высокое содержание сахаров в них в начале сезона связано, скорее всего, с высвобождением их из молекул органических полимеров в процессе дыхания в холодное время года. Вместе с тем характер различий в содержании пектиновых веществ в клубнях модельных сортов топинамбура указывал на наличие неоднозначных тенденций (табл. 1). Так, для сортов *Скороспелка*, *Михайловский* и *Интерес-21* в осенний период было показано на 10–35 % более высокое содержание пектиновых веществ, чем в весенний период, в то время как для сортов *Сиреники-1* и *Десертный*, напротив, их содержание было на 5–16 % ниже. Внутрисезонные различия в содержании инулина в клубнях топинамбура проявились в разной степени, в зависимости от сортовой принадлежности растений. Так, лишь у двух сортов – *Скороспелка* и *Десертный* – содержание полифруктозана в осенний период оказалось на 37–39 % выше, чем в весенний, тогда как у остальных таксонов достоверных различий по данному признаку не выявлено, что однозначно свидетельствует о сортоспецифичности данного эффекта.

Сравнение же показателей накопления биофлавоноидов в клубнях топинамбура в начале и в конце вегетационного периода (табл. 1) не выявило достоверных различий. Лишь у сортов *Скороспелка* и *Сиреники-1* осенние клубни оказались на 22–25 % богаче, а у сорта *Десертный*, напротив, на 27 % беднее весенних биофлавоноидами, при менее выраженных различиях у сортов *Михайловский* и *Интерес-21*. Это косвенно указывает на то, что более низкое в осенний период, нежели в весенний, содержание в них растворимых сахаров не может быть связано с их расходом на биосинтез биофлавоноидов, содержащихся в столь незначительных количествах.

С целью определения оптимального срока заготовки клубней топинамбура, характеризуемого наибольшим интегральным уровнем их питательной и витаминной ценности, нами использован разработанный Ж. А. Рупасовой и защищенный патентом методический прием [23], основанный на сопоставлении в сортовом ряду относительных размеров, амплитуд и соотношений статистически достоверных положительных и отрицательных различий исследуемых характеристик биохимического состава клубней в осенний и весенний периоды года. По величине суммарной амплитуды выявленных различий, независимо от знака, можно было судить о выраженности внутрисезонных различий по совокупности анализируемых признаков, что позволяло провести ранжирование сортов в порядке снижения степени данных различий. Соотношение же относительных значений совокупности положительных и отрицательных значений внутрисезонных различий являлось оценочным критерием интегрального уровня питательной и витаминной ценности клубней каждого сорта, если исходить из посыла, что все анализируемые признаки одинаково важны для оценки качества их сырья. При этом за 1 принимался интегральный уровень данного показателя в начале сезона. В этом случае на основании табл. 1 были определены суммарные значения разнонаправленных относительных внутрисезонных различий характеристик биохимического состава клубней топинамбура, представленные в табл. 2. Они характеризовали направленность и степень выраженности сдвигов в биохимическом составе клубней тестируемых сортов топинамбура в осенний период года по сравнению с весенним, что может быть обусловлено генотипическими различиями в направленности и величине указанных выше сдвигов.

При амплитуде внутрисезонных различий в сортовом ряду от 152,8 до 233,0 % наименее выраженными они оказались у сорта *Михайловский*, характеризовавшегося наименьшей суммарной величиной их положительных и отрицательных значений, тогда как наиболее отчетливо данные различия проявились у сорта *Интерес-21*, отмеченного максимальными внутрисезонными различиями биохимического состава клубней. Вместе с тем относительные значения положительных различий качественных характеристик клубней в большинстве случаев превышали таковые отрицательных, причем максимальными они оказались у сорта *Скороспелка*, минимальными – у сортов *Михайловский* и *Сиреники-1*.

Таблица 2. Относительные значения, амплитуда и соотношение разноориентированных различий характеристик биохимического состава клубней тестируемых сортов топинамбура в осенний и весенний периоды года (2014 г.)

Table 2. Relative sizes, amplitudes and ratio of differently oriented differences of characteristics of biochemical composition of studied tubers of Jerusalem artichoke cultivars in autumn and spring (2014)

Сорт	Относительные значения различий, %			Соотношение положит. и отриц. различий
	положительных	отрицательных	амплитуда	
<i>Скороспелка</i>	170,2	34,6	204,8	4,92
<i>Михайловский</i>	87,9	64,9	152,8	1,36
<i>Интерес-21</i>	143,0	90,0	233,0	1,59
<i>Сиреники-1</i>	89,0	96,5	185,5	0,92
<i>Десертный</i>	112,1	101,1	213,2	1,11

Для объективного суждения о различиях интегрального уровня питательной и витаминной ценности осенних и перезимовавших (весенних) клубней каждого сорта мы ориентировались на кратный размер соотношения относительных величин положительных и отрицательных различий между сроками по совокупности анализируемых признаков. Следует обратить внимание на то обстоятельство, что у всех таксонов топинамбура, за исключением сорта *Сиреники-1*, соотношение превышало 1,0, что свидетельствовало о более высоком качестве сырья их подземных органов в осенний период, нежели в весенний, и указывало на предпочтительность заготовки клубней в конце вегетационного периода. При этом в порядке снижения степени преимуществ осенних клубней относительно весенних по совокупности анализируемых признаков обозначена следующая последовательность тестируемых сортов: *Скороспелка* > *Интерес-21* > *Михайловский* > *Десертный* > *Сиреники-1*.

Лидирующее положение в приведенном ряду, при значительном отрыве от остальных таксонов топинамбура, принадлежало сорту *Скороспелка*, тогда как наименее ценным по биохимическому составу осенних клубней представлялся замыкавший этот ряд сорт *Сиреники-1*. На основании сопоставления величины рассматриваемого соотношения в приведенном ряду дана количественная оценка внутрисезонных различий интегрального уровня питательной и витаминной ценности клубней топинамбура на фоне погодных условий вегетационного периода 2014 г. Наибольшей она была у сорта *Скороспелка*. Подобные различия у остальных тестируемых таксонов топинамбура в этом плане оказались значительно меньшими и уступали лидирующему сорту в 3,1–5,3 раза.

Заключение. В результате сравнительного исследования сезонной динамики биохимического состава подземных органов 5 модельных сортов топинамбура (*Скороспелка*, *Михайловский*, *Интерес-21*, *Сиреники-1* и *Десертный*) из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси на фоне погодных условий вегетационного периода 2014 г. установлено, что интегральный уровень их питательной и витаминной ценности по совокупности 8 показателей в значительной степени определяется временем их отбора и сортовой принадлежностью растений.

Показано, что при содержании сухих веществ в пределах 20,7–28,5 %, свободных органических кислот в количестве 0,97–1,63 % сухой массы, аскорбиновой кислоты – 33,3–67,1 мг%, растворимых сахаров – 39,0–66,0 %, пектиновых веществ – 9,2–17,7 %, инулина – 49,0–75,9 %, биофлавоноидов (Р-витаминов) – 129,8–375,0 мг% и значениях сахарокислотного индекса 24,4–63,3 в осенний период года клубни характеризовались более высоким, нежели в весенний, накоплением сухих веществ (на 8–22 %), свободных органических кислот (на 25–48 %), аскорбиновой кислоты (на 9–65 %), но меньшим количеством растворимых сахаров (на 8–36 %) при более низких (на 26–55 %) значениях сахарокислотного индекса на фоне выраженной сортоспецифичности в содержании пектиновых веществ, инулина и биофлавоноидов.

Показано, что интегральный уровень питательной и витаминной ценности подземных органов большинства сортов топинамбура в осенний период года в 1,1–4,9 раза выше, чем в весенний. Наиболее существенны различия биохимического состава в зависимости от сроков уборки у сорта *Скороспелка*. Полученные результаты однозначно свидетельствуют о большей целесообразности осеннего срока заготовки клубней по сравнению с весенним.

Список использованных источников

1. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), a medicinal salt-resistant plant has high adaptability and multiple-use values / Y. M. Xiao [et al.] // *J. Med. Plant Res.* – 2011. – Vol. 5, N 8. – P. 1272–1279.
2. Ярошевич, М. И. Народнохозяйственная ценность и перспективы многоцелевого использования топинамбура / М. И. Ярошевич // *Земляробства і ахова раслін.* – 2011. – № 6. – С. 81–84.
3. Исследования углеводного комплекса нескольких сортов топинамбура, районированных в Краснодарском крае и республике Адыгея / Р. И. Екутеч [и др.] // *Олимпиада 2014: технологические и экологические аспекты производства продуктов здорового питания : материалы междунар. науч.-практ. конф., 1–3 июня 2009 г. – Краснодар, 2009.* – С. 98–100.
4. Зеленков, В. Н. Топинамбур: агробиологический портрет и перспективы инновационного применения / В. Н. Зеленков, Н. Г. Романова. – М. : Изд-во РГАУ–МСХА, 2012. – 161 с.
5. Гусева, Д. А. Исследование углеводно-амилазного комплекса топинамбура / Д. А. Гусева, Л. И. Горшкова // *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования : материалы IX Междунар. симп., 14–18 июня 2011 г. – Пушкино, 2011.* – Т. 2. – С. 177–180.
6. ГОСТ 28561-90. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения сухих веществ или влаги : межгос. стандарт // *Овощи сушеные: технические условия, методы анализа.* – М. : Стандартинформ, 2001. – С. 75–84.
7. Ермаков, А. И. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош ; под ред. А. И. Ермакова. – 3-е изд. – М. : Агропромиздат, 1987. – 430 с.
8. Плешков, Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – М. : Колос, 1985. – 256 с.
9. Ананьина, Н. А. Стандартизация инулина, полученного из клубней георгины простой. Изучение некоторых физико-химических свойств инулина / Н. А. Ананьина // *Хим.-фармацевт. журн.* – 2009. – Т. 43, № 3. – С. 35–37.
10. Марх, А. Т. Технохимический контроль консервного производства / А. Т. Марх, Т. Ф. Зыкина, В. Н. Голубев. – М. : Агропромиздат, 1989. – 304 с.
11. Методы технохимического контроля в виноделии / под ред. В. Г. Гержиковой. – Симферополь : Таврида, 2002. – С. 91–92.
12. Бархатов, В. Ю. Полифенольный состав топинамбура и продуктов его переработки / В. Ю. Бархатов, Э. И. Мамедова // *Изв. высш. учеб. заведений. Пищевая технология.* – 1998. – № 2/3. – С. 81.
13. Гасанова, Е. С. Влияние агротехнических приемов при выращивании топинамбура на содержание и свойства в нем инулина / Е. С. Гасанова, А. С. Сорокин, В. В. Котов // *Вестн. МичГАУ.* – 2011. – № 1, ч. 1. – С. 93–96.
14. Голубев, В. Н. Топинамбур (состав, свойства, способы переработки, области применения) / В. Н. Голубев, И. В. Волкова, Х. М. Кушалаков. – М., 1995. – 81 с.
15. Марченко, О. А. Биохимический состав топинамбура и его применение / О. А. Марченко, П. А. Буйко // *Химико-экологические аспекты научно-исследовательской работы студентов и магистрантов : материалы Междунар. науч.-практ. конф. студентов и магистрантов.* – Горки, 2013. – С. 145–148.
16. Цгоева, Т. Э. Химический анализ топинамбура сортов Скороспелка и Интерес / Т. Э. Цгоева // *Изв. Гор. гос. аграр. ун-та.* – 2011. – Т. 48, № 2. – С. 280–281.
17. Zaldariene, S. The quality comparison of different Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) cultivars tubers / S. Zaldariene, J. Kulaitiene, J. Cerniauskiene // *Zemes Ukio Mokslai.* – 2012. – Vol. 19, iss. 4. – P. 268–272.
18. Аникиенко, Т. И. Химический состав и кормовая ценность топинамбура в условиях Красноярского края / Т. И. Аникиенко, А. И. Хохлова, М. А. Янова // *Аграрная наука на рубеже веков : материалы регион. науч.-практ. конф. / М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2007.* – Ч. 1 : (Секции 1–7) / [отв. за вып. Е. О. Доряло ; ред. Н. А. Семенкова]. – С. 288–290.
19. Топинамбур: биология, агротехника выращивания, место в экосистеме, технологии переработки (вчера, сегодня, завтра) / Р. И. Шаizzo [и др.] ; Рос. акад. с.-х. наук, Краснодар. науч.-исслед. ин-т хранения и перераб. с.-х. продукции Россельхозакад., М-во сельского хоз-ва Рос. Федерации, Кубан. гос. аграр. ун-т. – Краснодар, 2013. – 181 с.
20. Inulin Syrup from Dried Jerusalem Artichoke Inulina syrups no kalteta topinambura / M. Bekers [et al.] // *LLU Raksti.* – 2008 – Vol. 21, N 315. – P. 116–121.
21. Карабанов, И. А. Флавоноиды в мире растений / И. А. Карабанов. – Минск : Ураджай, 1981. – 80 с.
22. Интродукция нетрадиционных кормовых культур – топинамбура и батата в Республику Северная Осетия-Алания / Б. Г. Цугкиев [и др.]. – Владикавказ : Гор. госагроуниверситет, 2009. – 104 с.
23. Способ ранжирования таксонов растения : пат. 17648 Респ. Беларусь, МПК А 01 Н 1/04, А 01 G 1/00 / Ж. А. Рупасова, В. Н. Решетников, А. П. Яковлев ; заявитель ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». – № а 20101502 ; заявл. 20.01.2010, опубл. 08.07.2013 // *Афіц. бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці.* – 2013. – № 5. – С. 61–62.

References

1. Xiao Y. M., Li H. Z., Hong B. S., Gang X., Feng Z., Fu T. N., Brestic M. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), a medicinal salt-resistant plant has high adaptability and multiple-use values. *Journal of Medicinal Plant Research*, 2011, vol. 5, no. 8, pp. 1272–1279.
2. Jaroshevich M. I. National economic value and possibility of multi-purpose use of Jerusalem artichoke. *Zemliarobstva i akhova raslin* [Agriculture and plants protection], 2011, vol. 6, pp. 81–84 (in Russian).
3. Ekutech R. I. Studies of the carbohydrate complex of several varieties of Jerusalem artichoke, zoned in the Krasnodar Krai and the Republic of Adygea. *Olimpiada 2014: tekhnologicheskie i ekologicheskie aspekty proizvodstva produktov zdravogo*

pitaniia : materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii [Olympics 2014: technological and ecological aspects of the production of healthy foods: materials of the international scientific-practical conference]. Krasnodar, 2009, pp. 98–100 (in Russian).

4. Zelenkov V. N., Romanova N. G. *Jerusalem artichoke: agrobiological portrait and perspectives of innovative application*. Moscow, RSAU-MTAA Publ., 2012, 161 p. (in Russian).

5. Guseva D. A., Gorshkova L. I. Investigation of carbohydrate-amylase complex of Jerusalem artichoke. *Novye i netraditsionnye rasteniia i perspektivy ikh ispol'zovaniia: materialy IX Mezhdunarodnogo simpoziuma* [New and non-traditional plants and the prospects for their use: materials IX International symposium]. Pushino, 2011, vol. 2, pp. 177–180 (in Russian).

6. *State Standard 28561-90. Products processing fruits and vegetables. Methods for determining dry matter or moisture*. Moscow, Standartinform Publ., 2001, pp. 75–84 (in Russian).

7. Ermakov A. I., Arasimovich V. V., Jarosh N. P. *Methods of biochemical research of plants*. 3rd ed. Moscow, Agropromizdat Publ., 1987. 430 p. (in Russian).

8. Pleshkov B. P. *Workshop on plant biochemistry*. Moscow, Kolos Publ., 1985. 256 p. (in Russian).

9. Anan'ina N. A. The standardization of inulin, obtained from the dahlia tubers. Study of some physical and chemical properties of inulin. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* [Chemico-Pharmaceutical Journal], 2009, vol. 43, no. 3, pp. 35–37 (in Russian).

10. Marh A. T., Zikina T. F., Golubev V. N. *Technochemical control of canning production*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1989. 304 p. (in Russian).

11. Gerghikova V. G. *Methods of technological control in wine-making*. Simferopol, Tavrida Publ., 2002, pp. 91–92 (in Russian).

12. Barhatov V. Iu., Mamedova E. I. Polyphenol composition of Jerusalem artichoke and products of its processing. *Izvestiia vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaia tekhnologiya* [Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Food technology], 1998, no. 2/3, p. 81 (in Russian).

13. Gasanova E. S., Sorokin A. S., Kotov V. V. The influence of agrotechnical methods in the cultivation of Jerusalem artichoke on the content and properties of inulin. *Vestnik MichGAU* [Herald of MichSAU], 2011, no. 1, pt. 1, pp. 93–96 (in Russian).

14. Golubev V. N., Volkova I. V., Kushalakov H. M. *Topinambour (composition, properties, methods of processing, applications)*. Moscow, 1995. 81 p. (in Russian).

15. Marchenko O. A., Bujko P. A. Biochemical composition of Jerusalem artichoke and its application. *Himiko-jekologicheskie aspekty nauchno-issledovatel'skoj raboty studentov i magistrantov : materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoi konferencii studentov i magistrantov* [Chemico-ecological aspects of the research work of students and undergraduates: materials of the international scientific-practical conference of students and undergraduates]. Gorki, 2013, pp. 145–148 (in Russian).

16. Gcgoeva T. Je. Chemical analysis of varieties Skorospelka and Interes of Jerusalem artichoke. *Izvestija Gorskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [News of Gorsky State Agriculture University], 2011, vol. 48, no. 2, pp. 280–281. (in Russian).

17. Zaldariene, S., Kulaitiene J., Cerniauskiene J. The quality comparison of different Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) cultivars tubers. *Zemes Ukio Mokslai*, 2012, vol. 19, iss. 4, pp. 268–272. DOI: 10.6001/zemesukiomokslai.v19i4.2588

18. Anikienko T. I., Hohlova A. I., Janova M. A. Chemical composition and fodder value of Jerusalem artichoke in conditions of the Krasnoyarsk Kraj. *Agrarnaja nauka na rubezhe vekov: materialy regional'noj nauchno-prakticheskoi konferencii* [Agrarian science at the turn of the century: materials of the regional scientific and practical conference]. Krasnoyarsk, 2007, part 1, pp. 288–290 (in Russian).

19. Shazzo R. I., Gish R. A., Ekutech R. I., Kornena E. P., Kajshev V. G., Krivorotov S. B. *Jerusalem artichoke: biology, agricultural cultivation, place in the ecosystem, processing technologies (yesterday, today, tomorrow)*. Russian Academy of Agricultural Sciences, Krasnodar Scientific Research Institute of Storage and Processing of Agricultural Products of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Kuban State Agrarian University. Krasnodar, KSAU, 2013. 181 p. (in Russian).

20. Bekers M., Grube M., Upite D., Kaminska E., Danilevich A., Viesturs U. Inulin Syrup from Dried Jerusalem Artichoke Inulina syrups no kalteta topinambura. *LLU Raksti*, 2008, vol. 21, no. 315, pp. 116–121.

21. Karabanov I. A. *Flavonoids in the world of plants*. Minsk, Uradzhaj Publ., 1981. 80 p. (in Russian).

22. Tsugkiev B. G., Temenov I. D., Tsugkieva V. B., Dzantieva L. B. *Introduction of non-traditional fodder crops – Jerusalem artichoke and sweet potato to the Republic of North Ossetia-Alania*. Vladikavkaz, Gorskij gosagrouniversitet Publ., 2009. 104 p. (in Russian).

23. Rupasova J. A., Reshetnikov V. N., Jakovlev A. P. *Method of ranking plant taxa*. Patent RB, no. 17648, 2013 (in Russian).

Информация об авторе

Дубарь Даниил Александрович – науч. сотрудник.
Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: D.Dubar@tut.by.

Information about the author

Daniil A. Dubar – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: D.Dubar@tut.by.

Е. С. Зубей, В. Г. Реуцкий

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

**ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА НА ПАРАМЕТРЫ ВОДООБМЕНА
МЕЗОФИЛЛА ЛИСТЬЕВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО ГЕНАМ PIP АКВАПОРИНОВ
РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.**

Аннотация. Исследованы особенности водообмена листьев растений *Arabidopsis thaliana*, генетически модифицированных по PIP аквапоринам, при разном водном потенциале субстрата. Показано, что аквапорины PIP1 подгруппы оказывают существенное влияние на скорость устьичной водоотдачи, а вклад аквапоринов подгруппы PIP2 в поступление воды в клетки мезофилла более значим.

Показано, что модифицированные растения менее устойчивы к водному стрессу, чем растения дикого типа. Повышенная экспрессия PIP аквапоринов приводит к увеличению гигроморфности структуры листа, наименее устойчив к водному стрессу сверхэкспрессор pip2;2-23. В условиях водного стресса у растений knockout pip2;1-2 повышается устойчивость ткани мезофилла к обезвоживанию.

Ключевые слова: водообмен, PIP аквапорины, водный стресс, генетически модифицированные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Для цитирования: Зубей, Е. С. Влияние водного дефицита на параметры водообмена мезофилла листьев модифицированных по генам PIP аквапоринов растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. / Е. С. Зубей, В. Г. Реуцкий // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 4. – С. 88–96.

Е. S. Zubei, V. G. Reutskiy

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

**IMPACT OF WATER DEFICIT ON THE PARAMETERS OF THE WATER EXCHANGE
OF LEAVE MESOPHYLL OF MODIFIED ON THE PIP AQUAPORINS GENES
ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH. PLANTS**

Abstract. The characteristics of water exchange of leaves of *Arabidopsis thaliana* plants, genetically modified on PIP aquaporins, at different substrate water potential. It is assumed that aquaporins PIP1 subgroup have a significant impact on the rate of stomatal water loss, the contribution of PIP2 aquaporins subgroup in a more significant flow of water into the mesophyll cells.

It is shown that the modified plants are less resistant to water stress than the wild-type plant. Increased expression of PIP aquaporins increases hygromorphic leaf structure, less resistant to water stress were overexpressor pip2; 2-23. Under the conditions of water stress in plants knockout pip2; 1-2 increases resistance to mesophyll tissue dehydration.

Keywords: water exchange, PIP aquaporins, water stress, genetically modified plants *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

For citation: Zubei E. S., Reutskiy V. G. Impact of water deficit on the parameters of the water exchange of leave mesophyll of modified on the PIP aquaporins genes *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. plants. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 88–96.

Введение. Трансклеточный путь движения воды в растениях контролируется деятельностью водных каналов – аквапоринов, что позволяет растениям быстро и обратимо регулировать водную проницаемость. Это осуществляется путем изменения количества аквапоринов и их активности в мембране за счет посттрансляционных модификаций, регуляции открытия и закрытия каналов [1].

Растения с измененной экспрессией аквапоринов являются удобным инструментом для определения вклада этих структур в эффективность водного обмена ткани или органа растения.

У растений *Arabidopsis thaliana* известно 35 гомологов аквапоринов. В группу аквапоринов плазматической мембраны (the plasma membrane intrinsic proteins, PIPs) входит 5 белков PIP1 и 8 PIP2 [2].

Исследование генномодифицированных растений *Arabidopsis* показало участие аквапорина PIP2b в водопроницаемости клеточных мембран растения [3]. При помощи knockout-растений *A. thaliana* установлено, что три изоформы аквапоринов, экспрессируемые в сосудах листьев (PIP1;2, PIP2;1 и PIP2;6) способствуют транспорту воды в розетке листьев, а PIP2;1 отвечает за регуляцию транспорта воды в условиях темноты [4]. Установлено, что нокаут AtPIP1;2 снижает водную проводимость розетки листьев примерно на 30 %, а осмотическую водную проницаемость протопластов мезофилла – почти на 50 % [5].

Данные о стрессоустойчивости растений с генетически измененной экспрессией аквапоринов неоднозначны. Сообщается, что сверхэкспрессия аквапорина PIP2;5 снижает негативный эффект низкой температуры на гидравлическую проводимость клеток корня и рост растений *Arabidopsis* [6]. Сверхэкспрессия AtPIP1;2 (PIP1b) из *Arabidopsis* в трансгенных растениях табака увеличивала темпы роста растений в контрольных условиях, но в условиях водного стресса трансгенные растения табака теряли тургор быстрее, чем дикий тип [7]. Другие исследователи сообщают, что трансгенные растения табака с выключенным геном аквапорина NtAQP1 показали более высокую чувствительность к водному стрессу [8].

Цель данной работы – охарактеризовать параметры водообмена мезофилла листьев растений *Arabidopsis thaliana* с генетически модифицированной экспрессией PIP аквапоринов в условиях нормального водообеспечения и при воздействии водного стресса.

Материалы и методы исследования. Объектами служили растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (резуховидка Таля):

дикого типа (Wt);

knockout PIP1 (аллель *pip1;4-2* и *pip1;2-2*) и PIP2 (аллель *pip2;2-4* и *pip2;1-2*);

сверхэкспрессоры PIP1 (аллель *pip1;1-1* и *pip1;1-4*) и PIP2 (аллель *pip2;2-23* и *pip2;2-33*).

Семена *Arabidopsis* были любезно предоставлены Ботаническим институтом университета г. Кельна (Botanical Institute University of Cologne). Для исследования параметров водообмена мезофилла листьев растения всех линий выращивали в почвогрунте на основе торфа при фотопериоде 16 ч, температуре 22–24°C, освещенности 150 мкмоль/м²·с.

Для создания мягкого водного стресса семена дикого типа и 4 модифицированных линий высеивали на субстратах с пониженным водным потенциалом (ВП). В почвогрунт на основе торфа добавляли слабощитый полиэлектролитный гидрогель Гисинар. Это осмотически активное вещество обладает высокой водопоглощающей способностью, нерастворимо в воде и устойчиво к вымыванию [9].

Почвогрунт влажностью около 55 % смешивали с водными растворами гидрогеля с концентрацией 6, 8, 10 % в соотношении 3:1 по массе. Влажность полученных субстратов составляла около 65 %, ВП – –16, –20, –30 кПа. Контролем служили растения, выращенные в почвогрунте без гидрогеля с величиной ВП около –4 кПа и аналогичной влажностью. Полив осуществляли водой в тарированных емкостях с целью сохранения уровня влажности. Величину ВП измеряли при помощи почвенного влагомера DM-8 производства компании Nieuwkoop Aalsmeer (Нидерланды).

Водный обмен листьев оценивали по методике мониторинга водообмена в системе апопласт-протопласт клеток мезофилла листа, разработанной в лаборатории водного обмена и фотосинтеза растений Института экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси [10, 11].

Для исследований использовали растения 6-й недели вегетации в стадии розетки из 10–11 листьев. Высечки из листьев диаметром 9 мм под небольшим давлением насыщали водой с целью придания ткани максимального тургора и заполнения межклетников водой, затем помещали в электронно-измерительную компьютеризированную установку. Фиксировали динамику изменений толщины и массы исследуемого образца в процессе его дегидратации (при температуре 25 °C и влажности воздуха 70 %).

По кривым дегидратации вычисляли следующие параметры: толщину и влагосодержание ткани мезофилла при максимальном тургоре; объем воды в ткани листа, связанный и не связанный с изменением тургора клеток мезофилла; показатели эластичности и жесткости ткани листа; объем межклетников; относительное содержание сухого вещества в ткани листа; время сохранения максимального тургора клеток; скорость изменения массы образца в период сохранения максимального

тургора мезофилла (скорость устьичной водоотдачи); скорости изменения массы и объема образца в диапазоне от максимального тургора до начала циторриза.

Измерения проводили в 6–9-кратной повторности, данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента [12].

Результаты и их обсуждение. Генетически модифицированные растения *Arabidopsis thaliana* не отличались от дикого типа по количеству листьев и размеру розетки, что согласуется с данными литературы [1, 13]. Сверхэкспрессоры PIP характеризовались более низкими темпами роста в начале вегетации, но к 5-й неделе вегетации по развитию не уступали контролю.

Согласно полученным данным, время сохранения максимального тургора мезофилла у всех модифицированных растений отличалось от дикого типа (табл. 1). У растений-сверхэкспрессоров этот параметр превышал контрольный на 12–78 %, максимальное его значение ($10,7 \pm 0,33$ мин) наблюдалось у растений с повышенной экспрессией *pip2;2-23*. У knockout растений время сохранения максимального тургора было ниже, чем у растений дикого типа, на 28–55 %, минимальное его значение ($2,7 \pm 0,33$ мин) отмечалось у knockout *pip2;1-2*.

Т а б л и ц а 1. Параметры дегидратации мезофилла листьев растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с модифицированной экспрессией генов PIP аквапоринов

Table 1. Parameters of dehydration of leaf mesophyll *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. plants with modified expression of PIP aquaporin genes

Объект	Название линии	Время сохранения максимального тургора мезофилла, мин	Скорость устьичной водоотдачи, мкг/мин	Скорость водоотдачи в диапазоне от макс. тургора до начала циторриза, мкг/мин	Скорость изменения объема мезофилла в диапазоне от макс. тургора до начала циторриза, $\times 10^{-3}$ мм ³ /мин
Дикий тип	Wt	$6,0 \pm 0,37$	$117,2 \pm 6,60$	$55,1 \pm 5,65$	$91,2 \pm 3,31$
Сверхэкспрессоры	<i>pip1;1-1</i>	$6,7 \pm 0,33$	$88,6 \pm 5,95^*$	$54,6 \pm 0,72$	$104,8 \pm 8,26$
	<i>pip1;1-4</i>	$8,0 \pm 0,58^*$	$65,7 \pm 3,30^*$	$47,0 \pm 4,53$	$92,3 \pm 7,58$
	<i>pip2;2-33</i>	$9,1 \pm 0,99^*$	$108,3 \pm 4,81$	$59,0 \pm 5,89$	$90,5 \pm 2,94$
	<i>pip2;2-23</i>	$10,7 \pm 0,33^*$	$128,8 \pm 5,05$	$53,6 \pm 2,80$	$85,4 \pm 8,07$
Нокауты (knockout)	<i>pip1;4-2</i>	$3,3 \pm 0,33^*$	$87,5 \pm 8,02^*$	$49,7 \pm 1,60$	$85,7 \pm 2,45$
	<i>pip1;2-2</i>	$4,3 \pm 0,46^*$	$114,2 \pm 11,50$	$69,4 \pm 4,57^{**}$	$105,2 \pm 6,53^{**}$
	<i>pip2;1-2</i>	$2,7 \pm 0,33^*$	$105,6 \pm 8,22$	$53,4 \pm 4,99$	$70,7 \pm 2,15^*$
	<i>pip2;2-4</i>	$4,3 \pm 0,33^*$	$90,0 \pm 5,77^*$	$56,1 \pm 1,02$	$74,2 \pm 6,15^*$

П р и м е ч а н и е. Достоверность отличий параметра от контроля (Wt): * – при $\alpha = 0,05$; ** – при $\alpha = 0,1$. То же в табл. 2.

Время сохранения максимального тургора мезофилла листа в процессе дегидратации характеризует период, в течение которого потоки воды из клеток и внутрь клеток из насыщенного водой апопласта равны, а объем мезофилла стабилен. Следовательно, чем дольше поддерживается период стабильного тургора, тем выше активность аквапоринов, осуществляющих поступление воды из апопласта в клетки. Согласно полученным данным, вклад аквапоринов подгруппы PIP2 в поступление воды в клетки мезофилла более значимый, чем вклад аквапоринов подгруппы PIP1.

Скорость устьичной водоотдачи у растений со сверхэкспрессией PIP1 была ниже, чем у дикого типа, на 24 и 44 %, наименьшей ($65,7 \pm 3,30$ мкг/мин) она была у растений с повышенной экспрессией *pip1;1-4*. Для растений, сверхэкспрессирующих PIP2, отличия от дикого типа были статистически не достоверны. Также более низкой скоростью устьичной водоотдачи обладали knockout-растения *pip1;4-2* и *pip2;2-4*.

Можно предположить, что активность PIP1 аквапоринов вносит наибольший вклад в регуляцию тургора замыкающих клеток устьиц, причем разные изоформы регулируют поступление либо выход воды. Согласно данным литературы, в листьях фасоли обыкновенной повышение количества белка PIP1 коррелировало со снижением скорости транспирации в условиях засухи [14].

Скорость водоотдачи в диапазоне от максимального тургора мезофилла до начала циторриза у растений-сверхэкспрессоров и knockout PIP2 отличалась несущественно от таковой у растений

дикого типа. У knockout-растений по PIP1 аквапоринам этот параметр изменился разнонаправленно, у knockout *pip1;2-2* он статистически значимо превышал значение у дикого типа на 26 %. Можно предположить участие аквапорина *pip1;2-2* в удержании воды в ткани при увядании (дегидратации).

Скорость изменения объема мезофилла в диапазоне от максимального тургора до начала циторриза у мутантов с выключенной экспрессией PIP2 аквапоринов была достоверно ниже, чем у дикого типа: на 22 % у knockout *pip2;1-2* и на 19 % у knockout *pip2;2-4*. У растений с выключенной экспрессией *pip1;2-2* этот параметр возрастал на 15 % относительно дикого типа, однако сверхэкспрессия другого гена, *pip1;1-1*, привела к аналогичному результату.

Для второй серии экспериментов было отобрано по одному knockout-мутанту и сверхэкспрессору PIP1 и PIP2 аквапоринов, наиболее отличающихся от дикого типа по параметрам дегидратации мезофилла. Параметры морфоструктуры и водообмена листа этих растений, выращенных в условиях нормального водообеспечения (при ВП субстрата –4 кПа), приведены в табл. 2.

Таблица 2. Параметры морфоструктуры и водообмена мезофилла листьев растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с модифицированной экспрессией генов PIP аквапоринов

Table 2. Parameters of morphostructure and water exchange of leaf mesophyll *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. plants with modified expression of PIP aquaporin genes

Параметр	Wt (дикий тип)	Knockout <i>pip1;4-2</i>	Knockout <i>pip2;1-2</i>	Сверхэкспрессор <i>pip1;1-4</i>	Сверхэкспрессор <i>pip2;2-23</i>
Влажность ткани мезофилла при максимальном тургоре, мг/мм ³	0,76 ± 0,068	0,70 ± 0,045	0,73 ± 0,043	0,80 ± 0,051	0,87 ± 0,055
Содержание сухого вещества в ткани листа, мг/см ²	1,2 ± 0,07	1,8 ± 0,10*	1,2 ± 0,07	1,2 ± 0,01	1,4 ± 0,08**
Эластичность ткани листа, %	75 ± 3,3	78 ± 1,8	78 ± 2,0	81 ± 3,6	83 ± 3,1
Объем воды, контролируемый тургором, мг/мм ³	0,56 ± 0,037	0,58 ± 0,041	0,56 ± 0,049	0,78 ± 0,052*	0,85 ± 0,050*
Объем воды, не контролируемый тургором, мг/мм ³	0,21 ± 0,015	0,13 ± 0,010**	0,17 ± 0,012	0,02 ± 0,001*	0,02 ± 0,001*
Объем межклетников, %	18,0 ± 1,45	14,2 ± 1,39**	14,3 ± 1,39**	17,6 ± 1,12	17,8 ± 1,81
Показатель жесткости ткани листа, отн. ед.	3,6 ± 0,33	2,9 ± 0,17**	3,1 ± 0,50	3,0 ± 0,27	2,6 ± 0,28**
Толщина листа при максимальном тургоре, мкм	221 ± 11,0	235 ± 16,4	223 ± 7,1	248 ± 11,6	232 ± 15,6

Растения-сверхэкспрессоры *pip2;2-23* характеризовались самым высоким показателем влажности ткани листа при максимальном тургоре – 0,87 ± 0,055 мг/мм³, что на 14 % выше, чем у дикого типа. У сверхэкспрессора *pip1;1-4* этот параметр незначительно превышал, а у knockout-растений был ниже, чем у дикого типа, на 4 и 8 %.

В ткани мезофилла knockout-растений доля воды, находящейся под контролем тургора, была идентичной таковой у растений дикого типа, однако снизилась доля воды, не контролируемой тургором. У растений-сверхэкспрессоров доля воды, не контролируемой тургором, была в 10 раз меньше, чем у дикого типа. Такое распределение фракций воды характерно для ткани листа гигрофитов [15].

Эластичность ткани листа у knockout-растений была на 4 % выше, чем у растений дикого типа, а у растений-сверхэкспрессоров эластичность ткани у *pip1;1-4* и *pip2;2-23* возросла на 8 и 10 % соответственно. Этот параметр определяется диапазоном изменений толщины ткани мезофилла от состояния максимального до минимального тургора. При сверхэкспрессии PIP аквапоринов эластичность ткани мезофилла возрастала, для такого листа период установления осмотического равновесия снижался, ткань быстрее теряла и восстанавливала тургор.

Объем межклетников мезофилла у сверхэкспрессоров отличался от аналогичного показателя у растений дикого типа незначительно, в то время как у knockout-растений он был на 21 % ниже, чем у дикого типа, что характерно для более гигроморфной структуры ткани [15].

Отмечено также, что у растений с выключенной экспрессией *pip1;4-2* количество сухого вещества на единицу площади листа достоверно увеличивалось на 50 % по сравнению с таковым у растений дикого типа. При сверхэкспрессии *pip2;2-23* этот показатель был выше контрольного

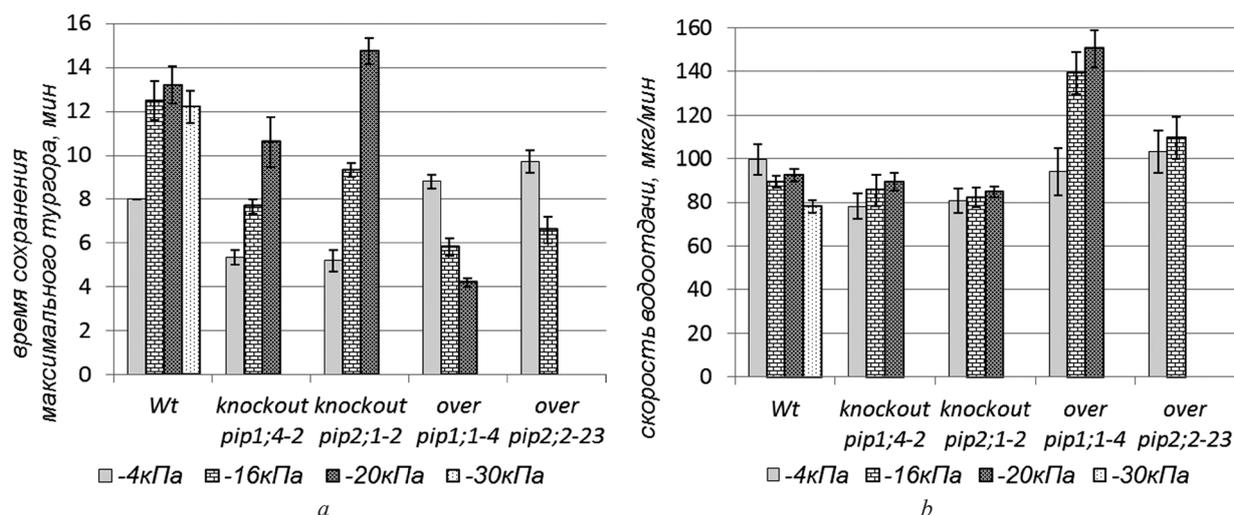


Рис. 1. Время сохранения максимального тургора мезофилла ткани (а) и скорость устьичной водоотдачи (б) листьев *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. при выращивании на субстратах с различным водным потенциалом (Wt – дикий тип, knockout – растения с выключенной экспрессией гена аквапорина, over – сверхэкспрессоры)

Fig. 1. The time of maximum conservation mesophyll tissue turgor (a) and stomatal water loss rate (b) leaves *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. when grown on substrates with different water potentials (Wt – wild type, knockout – plants with exclusion of aquaporin gene expression, over – overexpressors)

на 17 %. Вероятно, работа каналов аквапорина *pip1;4-2* увеличивает оводненность ткани листа, либо увеличение доли аквапоринов подгруппы PIP2 по отношению к PIP1 приводит к снижению оводненности мезофилла.

Наибольшей толщиной листа в состоянии максимального тургора ($248 \pm 11,6$ мкм) обладал сверхэкспрессор *pip1;1-4* (на 12 % выше, чем у дикого типа), у сверхэкспрессора *pip2;2-23* и knockout *pip1;4-2* толщина листа незначительно превышала этот параметр у дикого типа.

У модифицированных по аквапоринам растений показатель жесткости ткани листа был снижен, минимальным он был у сверхэкспрессора *pip2;2-23* (на 28 % ниже, чем у дикого типа).

В целом растения с измененной экспрессией аквапоринов обладали более гигроморфной структурой мезофилла листа, наибольшая степень гигроморфности была у растений-сверхэкспрессоров PIP1 аквапоринов.

Как и следовало ожидать, согласно параметрам морфоструктуры и водообмена листа, модифицированные растения показали различную толерантность к водному стрессу. При ВП субстрата -30 кПа развивались только растения дикого типа, семена мутантов теряли всхожесть. Растения сверхэкспрессора *pip2;2-23* сохраняли жизнеспособность только в субстрате с ВП -16 кПа.

Выращивание в условиях пониженного ВП вызвало изменения параметров дегидратации ткани листа растений *Arabidopsis*. Время сохранения максимального тургора мезофилла ткани у растений дикого типа увеличивалось на 52–65 % с понижением ВП, причем максимального значения ($13,2 \pm 0,85$ мин) этот показатель достиг при -20 кПа (рис. 1, а).

У knockout-растений при выращивании в условиях водного стресса период сохранения максимального тургора мезофилла был в 2–2,8 раза выше, чем в условиях контрольного режима. Наибольшим ($14,8 \pm 0,67$ мин) этот параметр был у knockout *pip2;1-2* при ВП -20 кПа, превышая показатель у дикого типа, выращенного при таком же ВП. Вероятно, в условиях водного дефицита отсутствие или снижение количества некоторых изоформ PIP аквапоринов приводит к увеличению водоудерживающей функции ткани листа либо к снижению оводненности ткани, что способствует большей устойчивости растений к водному стрессу.

У растений-сверхэкспрессоров период сохранения максимального тургора мезофилла при воздействии водного стресса сокращался на 32 и 34 % при ВП -16 кПа и на 52 % при ВП -20 кПа.

При понижении ВП скорость устьичной водоотдачи у растений дикого типа снижалась до 20 % (при -30 кПа), у knockout *pip2;1-2* не изменялась, у knockout *pip1;4-2* повышалась на 14 % при -20 кПа, однако разница статистически недостоверна (рис. 1, б). У растений-сверхэкспрессоров в условиях

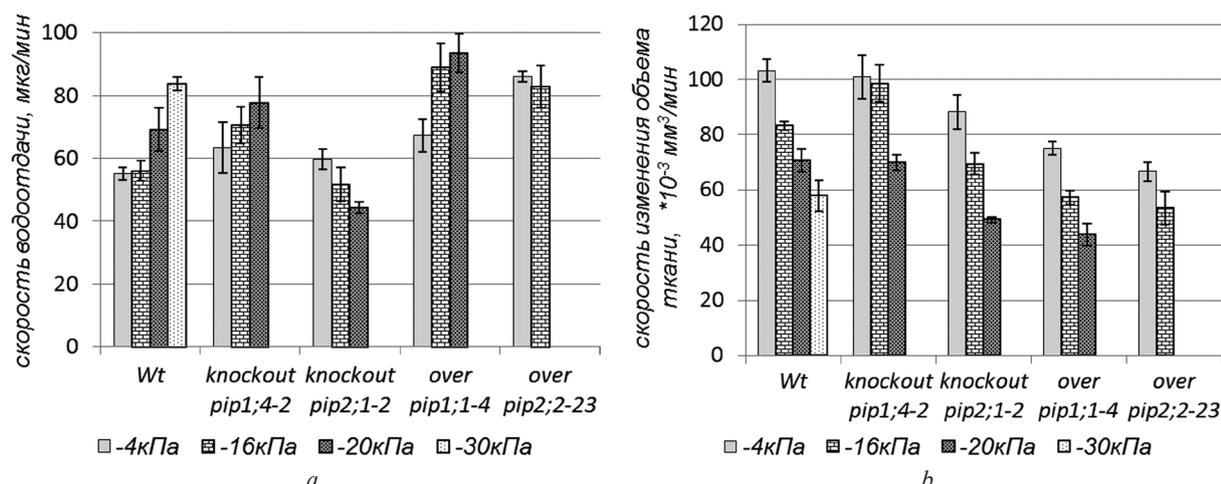


Рис. 2. Скорость водоотдачи (a) и скорость изменения объема (b) в диапазоне от максимального тургора до начала циторриза ткани листьев *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. при выращивании на субстратах с различным водным потенциалом (Wt – дикий тип, knockout – растения с выключенной экспрессией гена аквапорина, over – сверхэкспрессоры)

Fig. 2. The rate of fluid loss (a) and the rate of change in volume (b) in the range from the maximum turgor to the beginning of cytorrhiza of the leaf tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. when grown on substrates with different water potentials (Wt – wild type, knockout – plants with exclusion of aquaporin gene expression, over – overexpressors)

водного стресса скорость устьичной водоотдачи увеличивалась. Максимально (на 60 %) по сравнению с растениями, выращенными при контрольных условиях, этот параметр возрос у сверхэкспрессора *pip1;1-4* при ВП –20 кПа. Это также свидетельствует в пользу участия PIP1 аквапоринов в регуляции работы устьичного аппарата.

Дифференцированно изменялся параметр скорости водоотдачи в диапазоне от максимального тургора до начала циторриза ткани мезофилла (рис. 2, a). У растений дикого типа, knockout *pip1;4-2* и сверхэкспрессора *pip1;1-4* этот параметр возрастал при понижении ВП субстрата, у растений-сверхэкспрессоров *pip2;2-23* изменялся несущественно. У knockout *pip2;1-2* скорость водоотдачи в диапазоне от максимального тургора до начала циторриза снижалась, а при ВП –20 кПа была на 26 % ниже, чем у растений, выращенных в контрольных условиях (ВП –4 кПа). Следовательно, у растений с выключенной экспрессией аквапорина *pip2;1-2* в условиях водного стресса повысилась устойчивость ткани мезофилла к обезвоживанию.

Скорость изменения объема мезофилла в диапазоне от максимального тургора до начала циторриза ткани мезофилла при нарастании водного стресса снижалась как у растений дикого типа, так и у генетически модифицированных (рис. 2, b). Это может быть связано с повышением жесткости ткани листа, которая закономерно возрастает при выращивании растений в условиях пониженного водного потенциала по мере ксерофитизации ткани мезофилла [15].

Заключение. В связи с множеством изоформ PIP аквапоринов и их способностью образовывать гетеротетрамеры [1] идентифицировать роль одной изоформы белка в водообмене растения сложно. Модификация экспрессии единичных генов аквапоринов не приводит к появлению выраженных фенотипов растений *Arabidopsis thaliana*, однако обнаружены различия в характере водообмена и в морфоструктуре мезофилла.

Изменение экспрессии аквапоринов подгруппы PIP1 играет роль в регуляции работы устьичного аппарата, а вклад аквапоринов подгруппы PIP2 в поступление воды в клетки мезофилла более значимый.

Генетически модифицированные по PIP аквапоринам растения *Arabidopsis thaliana* менее устойчивы к низкому водному потенциалу субстрата, чем растения дикого типа.

Сверхэкспрессия PIP аквапоринов увеличивает степень гигроморфности структуры листа, а наименее устойчивы к водному стрессу растения-сверхэкспрессоры *pip2;2-23*.

Полагаем, что снижение количества аквапоринов PIP2 подгруппы при воздействии водного стресса у растений *Arabidopsis* дикого типа должно повышать их засухоустойчивость за счет интенсификации водоудерживающей функции ткани листа.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Chaumont, F. Aquaporins : highly regulated channels controlling plant water relations / F. Chaumont, S. D. Tyerman // *Plant Physiol.* – 2014 – Vol. 164, iss. 4. – P. 1600–1618.
2. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants / U. Johanson [et al.] // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 126, N 4. – P. 1358–1369.
3. Barrieu, F. Modulation of aquaporin gene expression in Arabidopsis leads to altered membrane water permeability / F. Barrieu, R. Morillon, M. J. Chrispeels // *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport* / S. Hohmann, S. Nielsen. – New York, 2000. – P. 255–259.
4. Regulation of Arabidopsis leaf hydraulics involves light-dependent phosphorylation of aquaporins in veins / K. Prado [et al.] // *Plant Cell.* – 2013. – Vol. 25, iss. 3. – P. 1029–1039.
5. A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis / O. Postaire [et al.] // *Plant Physiol.* – 2010. – Vol. 152. – P. 1418–1430.
6. Overexpression of PIP2;5 aquaporin alleviates effects of low root temperature on cell hydraulic conductivity and growth in Arabidopsis / S. H. Lee [et al.] // *Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 159, iss. 1. – P. 479–488.
7. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress / R. Aharon [et al.] // *Plant Cell.* – 2003. – Vol. 15. – P. 439–447.
8. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to functions in plants / F. Siefritz [et al.] // *Plant Cell.* – 2002. – Vol. 14. – P. 869–876.
9. Новые пленкообразующие биотехнические средства сельскохозяйственного назначения на основе химически сшитых функционализированных полиакриламидов / Е. В. Гринюк [и др.] // Свиридовские чтения = Sviridov Readings : сб. ст. / Белорус. гос. ун-т, Науч.-исслед. ин-т физ.-хим. проблем. – Минск, 2012. – Вып. 8. – С. 194–201.
10. Методика электронного мониторинга водного обмена ассимиляционной ткани листа / Е. С. Зубей [и др.] // 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, 2016. – Вып. 45. – С. 299–308.
11. Особенности водообмена в системе апопласт-протопласт клеток мезофилла листа как фактор стрессоустойчивости растений / В. Г. Реуцкий [и др.] // 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, 2010. – Вып. 39. – С. 375–388.
12. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – С. 88–95.
13. Aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions / C. Maurel [et al.] // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 595–624.
14. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants / R. Aroca [et al.] // *Annals of Botany.* – 2006. – Vol. 98. – iss. 6. – P. 1301–1310.
15. Телюк, Н. А. Водный режим ассимиляционной ткани листьев растений различных экологических групп / Н. А. Телюк, В. Г. Реуцкий, П. А. Родионов // Проблемы экспериментальной ботаники : к 100-летию со дня рождения В. Ф. Купревича / Акад. наук Беларуси, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича ; науч. ред. В. И. Парфенов. – Минск, 1997. – С. 436–448.

References

1. Chaumont F., Tyerman S. D. Aquaporins : highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology*, 2014, vol. 164, iss. 4, pp. 1600–1618. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.233791>
2. Johanson U., Karlsson M., Johansson I. Gustavsson S., Sjövall S., Fraysse L., Weig A. R., Kjellbom P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 2001, vol. 126, no. 4, pp. 1358–1369.
3. Barrieu F., Morillon R., Chrispeels M. J. Modulation of aquaporin gene expression in Arabidopsis leads to altered membrane water permeability. *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. New York, 2000, pp. 255–259.
4. Prado K., Boursiac Y., Tournaire-Roux C., Postaire O., Da Ines O., Schäffner A. R., Hem S., Santoni V., Maurel C. Regulation of Arabidopsis leaf hydraulics involves light-dependent phosphorylation of aquaporins in veins. *The Plant Cell*, 2013, vol. 25, iss. 3, pp. 1029–1039. DOI: 10.1105/tpc.112.108456
5. Postaire O., Tournaire-Roux C., Grondin A., Boursiac Y., Morillon R., Schäffner A. R., Maurel C. PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2010, vol. 152, no. 3, pp. 1418–1430. DOI: 10.1104/pp.109.145326
6. Lee S. H., Chung G. C., Jang J. Y., Ahn S. J., Zwiazek J. J. Overexpression of PIP2;5 aquaporin alleviates effects of low root temperature on cell hydraulic conductivity and growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2012, vol. 159, iss. 1, pp. 479–488.
7. Aharon R., Shahak Y., Winger S. Bendov R., Kapulnik Y., Galili G. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell*, 2003, vol. 15, pp. 439–447.
8. Siefritz F., Tyree M. T., Lovisolo C., Schubert A., Kaldenhoff R. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to functions in plants. *Plant Cell*, 2002, vol. 14, pp. 869–876. DOI: 10.1074/mcp.M113.028241

9. Grinyuk E. V., Fomina E. K., Yakimtsova L. B., Krul L. P. New film-forming biotechnical preparations of agricultural purpose based on chemically cross-linked functionalized polyacrylamides. *Sviridovskie chtenija* = Sviridov's readings, Belarusian State Institute, Research Institute of Physical and Chemical Problems, Faculty of Chemistry, Chair of Inorganic Chemistry, in Ivashkevich O. A. (ed.), et al. Minsk, 2012, iss. 8, pp. 194–201 (in Russian).
10. Zubej E. S., Rodionov P. A., Teljuk N. A., Reuckij V. G. Method of electronic monitoring of water exchange of leaf assimilation tissue. *Botanika: (issledovanija)* [Botanica: (research)], National Academy of Sciences of Belarus, Department of Biological Sciences, Institute of Experimental Botany of V. F. Kuprevich National Academy of Sciences of Belarus, Belarusian Botanical Society, Belarusian Society of Plant Physiologists, in Laman N. A. (ed.), et al. Minsk, 2016, iss. 45, pp. 299–308 (in Russian).
11. Reuckij V. G., Zubej E. S., Skuratovich T. A., Rodionov P. A. Features of water exchange in the apoplast-protoplast system of mesophyll leaf cells as a stress-resistance factor of plants. *Botanika: (issledovanija)* [Botanica: (research)], National Academy of Sciences of Belarus, Department of Biological Sciences, Institute of Experimental Botany of V. F. Kuprevich National Academy of Sciences of Belarus, Belarusian Botanical Society, Belarusian Society of Plant Physiologists, in Laman N. A. (ed.), et al. Minsk, 2010, iss. 39, pp. 375–388 (in Russian).
12. Glanc S. *Medico-biological statistics*. Moscow, Practica Publ., 1998. 459 p. (in Russian).
13. Maurel C., Verdoucq L., Luu D., Santoni V. Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, vol. 59, pp. 595–624. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734
14. Aroca R., Ferrante A., Vernier P., Chrispeels M. J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany*, 2006, vol. 98, iss. 6, pp. 1301–1310. DOI:10.1093/aob/mcl219
15. Teljuk N. A., Reuckij V. G., Rodionov P. A. Water regime of assimilating leaf tissue of plants of different ecological groups. *Problemy jeksperimental'noj botaniki : k 100-letiju so dnja rozhdenija V. F. Kuprevicha* [Problems of experimental botany: to the 100th anniversary of the birth of V. F. Kuprevich], Academy of Sciences of Belarus, Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich, in Parfenov V. I. (ed.). Minsk, 1997, pp. 436–448 (in Russian).

Информация об авторах

Зубей Екатерина Сергеевна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: katya.zubej@yandex.by.

Реуцкий Владимир Григорьевич – д-р биол. наук, профессор. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Ekaterina S. Zubei – 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: katya.zubej@yandex.by.

Vladimir G. Reutskiy – D. Sc. (Biol.), Professor. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 579.66+577.113.7

Поступила в редакцию 23.06.2017

Received 23.06.2017

А. И. Зинченко, А. С. Щеколова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СрG-ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДЫ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Аннотация. Бактериальные ДНК (в том числе плазмиды) и синтетические олиго-2'-дезоксинуклеотиды, содержащие неметилованные СрG-динуклеотиды (СрG-ОДН), при введении в организм человека и животных стимулируют как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. В связи с этим терапевтическое применение СрG-ОДН против инфекционных, онкологических и аллергических заболеваний является весьма перспективным. Однако молекулы СрG-ОДН заряжены отрицательно и поэтому с трудом проникают через клеточные мембраны, имеющие аналогичный поверхностный заряд. Кроме того, природные СрG-ОДН легко расщепляются нуклеазами. Одним из эффективных способов защиты СрG-ОДН от деградации нуклеазами является химическая модификация их сахарофосфатного скелета. В то же время известны случаи, когда введение таких модифицированных молекул приводило к серьезным побочным эффектам. Все эти обстоятельства существенно ограничивают терапевтическое применение СрG-ОДН и подогревают интерес к поиску эффективных систем доставки СрG-ОДН в ткани и клетки-мишени.

Наблюдаемый в последние годы существенный прогресс в области нанобиотехнологий предоставил беспрецедентные возможности для инкапсулирования лекарственных субстанций (в том числе СрG-ОДН) в различные наноразмерные транспортные системы, а также для синтеза из СрG-ОДН разнообразных по форме наноразмерных структур. При использовании таких систем доставки значительно повышается как стабильность СрG-ОДН, так и степень их интернализации в клетки-мишени. Кроме того, применение таких транспортных наносистем, возможно, позволит отказаться от вызывающей побочные эффекты химической модификации СрG-ОДН.

Ключевые слова: СрG-олигодезоксинуклеотиды, иммуностимуляторные эффекты СрG-олигодезоксинуклеотидов, доставка лекарств в клетки-мишени, наночастицы, слоистые двойные гидроксиды

Для цитирования: Зинченко, А. И. СрG-олигодезоксинуклеотиды и их практическое применение / А. И. Зинченко, А. С. Щеколова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 96–109.

A. I. Zinchenko, A. S. Shchokolova

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

CpG OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AND THEIR PRACTICAL USAGE

Abstract. Bacterial DNA (including plasmids) and synthetic oligo-2'-deoxynucleotides containing non-methylated CpG-dinucleotides (CpG-ODN) upon introduction into human or animal body stimulate both innate and adaptive immune responses. In this regard bright prospects open up for therapeutic application of CpG-ODN to cope with infectious, allergic diseases and cancer. However, CpG-ODN molecules are negatively charged and hence can hardly penetrate through cell membrane bearing the equipolar surface charge. Moreover, native CpG-ODN are easily cleaved by nucleases. One of the effective methods to counter CpG-ODN nuclease attack is chemical modification of their sugar-phosphate skeleton. Yet some cases have been reported when supply of modified molecules caused grave side-effects. All these circumstances restrain considerably therapeutic prospects of CpG-ODN and spur-up the interest in search of efficient systems for CpG-ODN delivery to target tissues and cells. Lately progress of nanobiotechnologies provided unprecedented opportunities for encapsulation of active drug substances (including CpG-ODN) into various nanosize transport vehicles and synthesis of multiform nanostructures from CpG-ODN. The use of such delivery systems raises significantly both CpG-ODN stability and extent of their internalization into target cells. It is plausible that development of nanotransporters will enable to get rid of chemical CpG-ODN modification provoking adverse effects.

Keywords: CpG oligodeoxynucleotides, immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides, drug delivery, nanoparticles, layered double hydroxides

For citation: Zinchenko A. I., Shchokolova A. S. CpG oligodeoxynucleotides and their practical usage. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 96–109 (in Russian).

Введение. Человек окружен бесчисленным количеством микроорганизмов, в том числе патогенных, которые непрерывно его атакуют. К счастью, наш организм снабжен мощными защитными механизмами, составляющими систему иммунитета. В составе этой системы различают две линии защиты. На первом оборонительном рубеже вторгшиеся патогены останавливает так называемый врожденный иммунитет. Он защищает организм хозяина неспецифическим способом. Для большинства микроорганизмов непреодолимым физическим препятствием служат наша кожа и слизистые оболочки. При проникновении микробов через этот барьер начинают действовать лейкоциты – клетки белой крови. Лейкоциты, включая фагоциты, макрофаги и клетки НК (от англ. *natural killer*), являются самыми важными компонентами врожденного иммунитета. Эти клетки вызывают воспаление, которое, как правило, быстро устраняет угрозу со стороны патогенов.

Однако врожденный иммунитет не всегда обеспечивает полноценную защиту, и, если микроорганизмы прорываются через барьеры врожденного иммунитета, начинает функционировать адаптивный иммунитет. При участии В- и Т-лимфоцитов продуцируются высокоспецифичные антитела и клетки-киллеры, которые разрушают инфицированные клетки. После победы над инфекцией наша адаптивная иммунная система поддерживает иммунную память, которая позволяет более быстро мобилизовать силы обороны при последующих атаках таких же микроорганизмов.

Первичное обнаружение вторгшихся микроорганизмов выполняют многочисленные белки-рецепторы, которые расположены на клетках врожденного иммунитета и способны распознавать так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП) [1, 2]. ПАМП представляют собой уникальные, не имеющие аналогов у макроорганизмов, консервативные молекулярные структуры. Наиболее известные ПАМП – липополисахариды внешней мембраны грамотрицательных бактерий; липотейхоевые кислоты, которые входят в состав мембран преимущественно грамположительных бактерий; пептидогликаны грамположительных и грамотрицательных бактерий; липоарабиноманноза микобактерий; зимозан грибов; двуспиральные вирусные РНК; бактериальные ДНК [3–5].

Среди белков, которые распознают широкий спектр ПАМП, первым обнаружен и лучше всех охарактеризован рецептор TLR9 (от англ. *toll-like receptor 9*) [6, 7]. Этот рецептор реагирует на CpG-динуклеотиды, в большом количестве присутствующие в ДНК бактерий и других прокариот. Следует подчеркнуть, что ДНК эукариот иммунологически нейтральна, поскольку большинство динуклеотидов CpG в ее составе метилированы по пятому атому углерода остатка цитозина [8, 9]. Неметилированные CpG-динуклеотиды в составе бактериальной ДНК, высвобождающейся из бактериальной клетки во время инфекции, служат «сигналом опасности» для системы врожденного иммунитета человека и животных, вызывая защитный иммунный ответ [10–12].

Биологические эффекты CpG-ОДН. Короткие синтетические одноцепочечные ОДН, содержащие неметилированные CpG-динуклеотиды, имитируют бактериальную ДНК и проявляют сходные иммуностимулирующие эффекты [13] (рис. 1).

Так, связывание CpG-ОДН с TLR9 инициирует каскад молекулярных событий, которые индуцируют созревание, дифференцировку и пролиферацию многочисленных иммунных клеток, включая В- и Т-лимфоциты, клетки НК и моноциты/макрофаги [14, 15]. Затем включаются клеточные сигнальные пути, которые приводят к индукции синтеза многочисленных провоспалительных цитокинов и хемокинов и модулируют клеточный воспалительный ответ [11, 16]. Эти свойства позволяют CpG-ОДН выступать в качестве многообещающих вакцинных адьювантов, а также иммунотерапевтических средств против инфекций, рака и аллергии [7, 16–18].

Следует отметить, что в то время, как большинство TLR распознают ПАМП на поверхности клеток, рецептор TLR9, распознающий CpG-ОДН, обнаруживается внутри клеток (в частности, в эндосомах [19, 20]). Следовательно, для стимуляции иммунного ответа CpG-ОДН должны проникнуть в клетку и попасть в эндосому. Механизмы такой интернализации еще не до конца поняты. Известно только, что CpG-ОДН захватываются клеткой посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Основными типами клеток человека, которые экспрессируют TLR9 и непосредственно отвечают на стимуляцию CpG-ОДН, являются В-лимфоциты и плазматоцитоподобные дендритные клетки (pDC). CpG-ОДН побуждают В-лимфоциты входить в фазу G1 клеточного цикла и секретировать

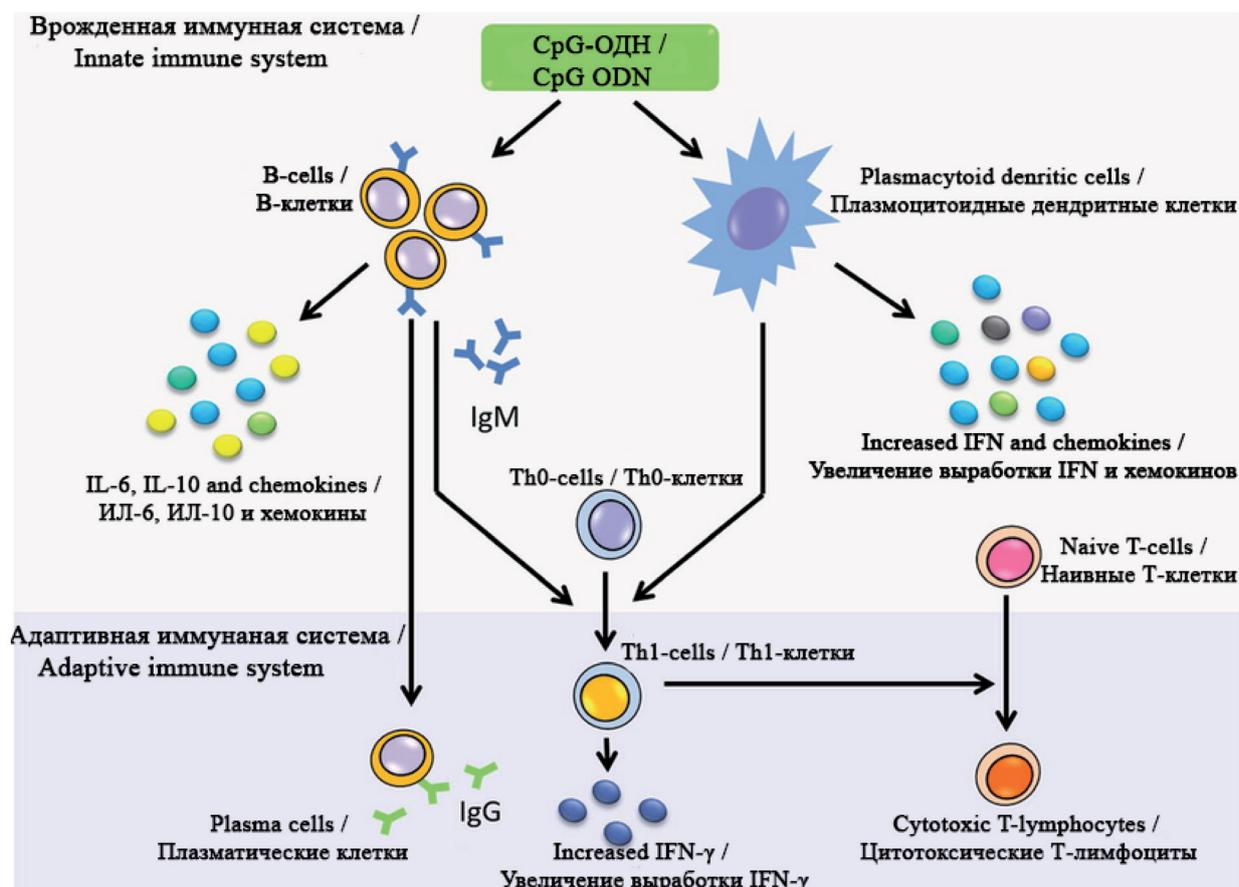


Рис. 1. Иммуностимуляторные эффекты CpG-ОДН

Fig. 1. Immunostimulatory effects of CpG ODNs

интерлейкины IL-6, IL-10 и IL-12 уже спустя считанные часы [6, 21–23]. В результате продуцирование антител значительно увеличивается [24, 25].

Активация pDC повышает секрецию ими цитокинов, вовлеченных во врожденный иммунный ответ, включая интерфероны типа I и TNF- α [26]. Эти pDC также улучшают функцию профессиональных антигенпрезентирующих клеток [12]. Кроме того, pDC, активированные CpG-ОДН, секретируют IL-12 и способствуют дифференцировке клеток-хелперов Th0 в Th1 [27, 28].

Как указывалось выше, CpG-ОДН имитируют бактериальную ДНК и активируют не только врожденную, но и адаптивную иммунную систему. Иммуностимулирующие эффекты CpG-ОДН дают возможность для применения их в качестве разнообразных иммуностимуляторов [12, 29, 30]. Так, при объединении с аллергеном CpG-ОДН селективно стимулируют антиген-специфический невоспалительный Th1-ответ, который ингибирует развитие аллергического Th2-ответа, заметно смягчая симптомы аллергии [12, 13].

CpG-ОДН «заставляет» pDC секретировать интерфероны типа I, которые подавляют размножение широкого спектра вирусов и бактерий. Поэтому CpG-ОДН могут быть использованы в качестве автономных терапевтических средств против инфекционных болезней [5, 12]. Введение в организм CpG-ОДН приводит к активации клеток НК и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), что помогает (особенно в сочетании с другими терапевтическими методами) лечить рак [11, 12, 31]. В этом случае особое значение имеет способ введения CpG-ОДН в организм. Так, А. F. Carpentier с соавт. [32] показали, что только внутриопухолевая инъекция мышам и крысам CpG-ОДН в качестве монотерапии индуцировала отторжение опухолей и обеспечивала долговременную защиту при последующей пересадке опухоли. Здесь уместно вспомнить, что более 100 лет назад американский врач Уильям Коули весьма успешно излечивал неоперабельные формы рака, используя именно такой способ введения так называемого токсина Коули. Этот препарат представлял собой

смесь двух инактивированных нагреванием бактерий, в которой ключевым активным компонентом выступала бактериальная ДНК [33, 34].

Следует отметить, что выбор и очистка подходящего, специфического для опухоли антигена в большинстве случаев является лимитирующей стадией процесса создания противораковых вакцин. Учитывая это, А. F. Carpentier и соавт. [32] предложили вводить CpG-ОДН непосредственно в опухоль, ожидая, что иммунная система сама произведет отбор наиболее подходящих антигенов. Такая локальная иммуностимуляция с помощью CpG-ОДН эффективно активировала NK-клетки и макрофаги (которые, как известно, способны напрямую уничтожать опухолевые клетки), приводила к отторжению у крыс пересаженной опухоли глиомы и обеспечивала долговременную защиту от последующей инокуляции опухолевых клеток [32].

Проблемы применения CpG-ОДН. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что CpG-ОДН представляют собой мощные активаторы иммунной системы у многочисленных видов животных. Это позволило приступить к серии клинических испытаний, чтобы оценить практическую возможность применения CpG-ОДН в качестве вакцинных адьювантов и средств для лечения рака, аллергии и астмы. Однако исследователи столкнулись с рядом трудностей. Например, CpG-ОДН отрицательно заряжены и не могут легко проникать через клеточную мембрану. Как полагают, электростатическое отталкивание ограничивает эффективность захвата CpG-ОДН иммунными клетками. Кроме того, природные CpG-ОДН нестабильны и быстро расщепляются нуклеазами, о чем свидетельствует короткий период их полуинактивации в русле крови. Все это сильно снижает потенциал клинического применения CpG-ОДН.

Экспериментальные подходы к повышению эффективности CpG-ОДН. В литературе обсуждаются несколько подходов к усилению иммуностимулирующих эффектов CpG-ОДН.

Увеличение периода полуинактивации CpG-ОДН. Фосфодиэфирные CpG-ОДН нестабильны и после введения в русло крови быстро деградируют с периодом полуинактивации порядка 5 мин [35]. Поэтому увеличение стабильности CpG-ОДН является перспективным подходом к повышению их эффективности. Опытным путем установлено, что химическая модификация фосфатной группы посредством замены атома кислорода серой приводит к образованию фосфотиоатной межнуклеотидной связи, что значительно снижает деградацию нуклеазами и повышает время полуинактивации в плазме до 30–60 мин [35, 36]. Более сложные модификации структуры, заключающиеся во введении поперечных сшивок между различными CpG-мотивами, обеспечивают устойчивость от деградации в плазме крови в течение 24 ч [37].

Замена фосфодиэфирных связей на фосфотиоатные приводит к повышению иммуностимулирующих эффектов, индуцируемых CpG-ОДН. Однако было сообщено, что системное введение модифицированных CpG-ОДН вызывает такие серьезные побочные эффекты, как разрушение лимфатических фолликулов и увеличение органов [38]. В связи с этим имеется настоятельная необходимость в разработке новых, более эффективных систем доставки CpG-ОДН в клетки-мишени.

Повышение эффективности проникновения CpG-ОДН в клетку. CpG-ОДН способны активировать рецепторы TLR9 только после эндоцитоза. Поэтому для проявления биологической активности CpG-ОДН очень важна стадия интернализации. Поскольку молекулы CpG-ОДН отрицательно заряжены, это создает определенные трудности для их связывания с отрицательно заряженной поверхностью клетки. Одной из причин, почему CpG-ОДН, адсорбированные на наночастицы или инкапсулированные в них, проявляют активность более высокую, чем свободные CpG-ОДН, является то, что облегчается процесс проникновения этих соединений в клетки [39, 40].

Рекрутирование и активация иммунных клеток. Иммуностимулирующие эффекты CpG-ОДН могут быть повышены также, если их вводить совместно с цитокинами и хемокинами, которые рекрутируют иммунциты (например, дендритные клетки) к сайтам, где они могут быть активированы под действием CpG-ОДН [41, 42].

Наносистемы для доставки CpG-ОДН в клетки-мишени. Развитие нанобиотехнологий в последнее время привело к созданию эффективных нанотранспортных систем, которые можно использовать для доставки CpG-ОДН в клетки. Для этой цели уже испробованы такие наноматериалы, как желатин [43], липосомы [44, 45], углеродные нанотрубки [46, 47], наночастицы золота [48–50], нитрида бора [40, 51], кварца [39, 52–54], биоразлагаемые полилактиды [55], полисахариды [56, 57].

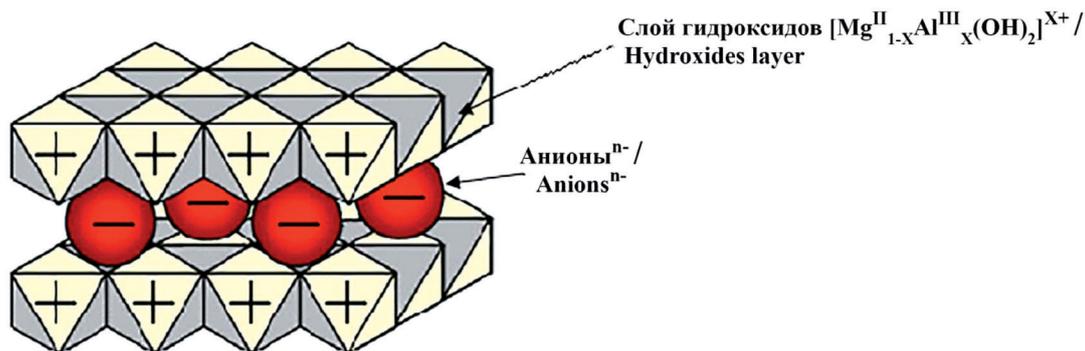


Рис. 2. Схема структуры Mg,Al-СДГ

Fig. 2. Schematic structure of Mg,Al-LDH

С целью повышения иммуностимулирующего эффекта CpG-ОДН на их основе сконструированы самособирающиеся наноразмерные структуры, такие как ДНК-нанотрубки [58], ДНК-дендримеры [59], гидрогели [60] и «наноцветы» [61], а также ДНК-оригами [58]. У этих нанотранспортных систем имеется много преимуществ. В частности, они могут защищать CpG-ОДН от деградации нуклеазами, повышать эффективность проникновения в клетки, изменять характер индукции цитокинов [51, 62–64]. По причине перечисленных уникальных особенностей у этих систем доставки имеется многообещающий иммунотерапевтический потенциал [65, 66].

Транспорт CpG-ОДН с помощью Mg,Al-слоистых двойных гидроксидов (СДГ). По химической природе СДГ представляют собой класс анионных глин. Их структуру описывают в виде металл-гидроксидных слоев, в которых часть двухвалентных катионов изоморфно замещена на трехвалентные, что приводит к возникновению на этих слоях положительных зарядов [67, 68], которые частично компенсируются за счет встраивания в галерейное пространство гидратированных анионов (рис. 2).

Наночастицы на основе СДГ сравнительно легко синтезируются, как правило, одним из двух методов: соосаждением [69, 70] и ионным обменом [71]. Особая «сэндвич-подобная» структура и анионообменные свойства СДГ дают возможность их использования для транспортировки анионных биомолекул и лекарств, таких как олигонуклеотиды [72], ДНК [73], противоопухолевые средства (например, метотрексат [74]). Кроме того, положительный заряд наночастиц на основе СДГ облегчает их проникновение в клетки-мишени.

Важно подчеркнуть, что СДГ имеют ряд преимуществ перед другими соединениями, являясь частицами-переносчиками. Они обладают рядом полезных свойств, среди которых особое значение имеет хорошая биодоступность и низкая токсичность. Согласно данным литературы, синтез различных по качественному и количественному составу катионов СДГ при определенных условиях обеспечивает получение частиц, размер которых варьируется в диапазоне от 50 до 500 нм [75]. При этом структура вещества, помещенного в межслоевое (галерейное) пространство, надежно защищена от воздействия разрушающих его агентов [73].

СДГ имеют небольшой положительный заряд, что обеспечивает эффективное включение в их состав отрицательно заряженных соединений, а также необходимое электростатическое притяжение к отрицательно заряженной поверхности клеток [67]. При этом частицы СДГ обладают свойством быстро распадаться в среде с низкими значениями pH на сравнительно безопасные, выводимые почками ионы металлов (например, ионы магния и алюминия). Важно, что при нейтральных значениях pH среды СДГ стабильны.

Способы получения CpG-ДНК. Наиболее распространенным способом получения CpG-ОДН является многостадийный химический синтез. По нашему мнению, более перспективным способом получения CpG-ОДН является метод, предложенный группой канадских и немецких исследователей [76]. Суть этого метода – конструирование рекомбинантных штаммов бактерий, способных к репликации и поддержанию плазмид, обогащенных CpG-ОДН (штаммов-продуцентов CpG-плазмид). Такой способ биотехнологического получения CpG-ДНК имеет ряд преимуществ

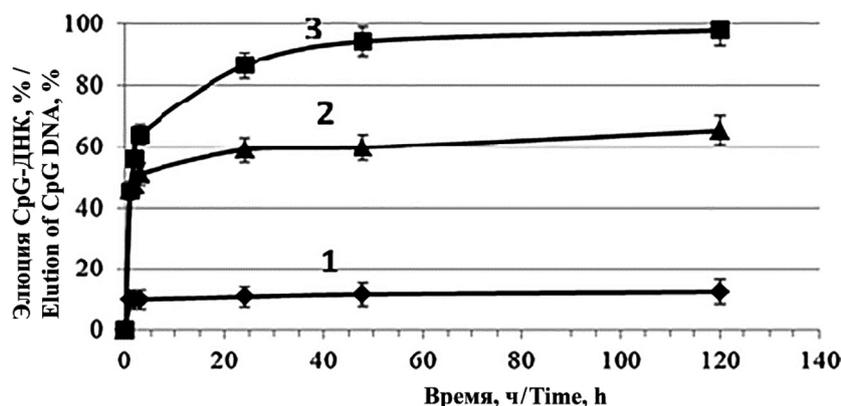


Рис. 3. Динамика элюции CpG-плазмиды из комплекса с Mg,Al-СДГ в воду (1), 0,05 М фосфатно-цитратный буфер с рН 7,5 (2) и буфер с рН 4,5 (3)

Fig. 3. Dynamics of CpG-plasmids releasing from complex with Mg,Al-LDH in H₂O (1), 0.05 M phosphate-citrate buffer at pH 7.5 (2) and pH 4.5 (3)

перед химическим синтезом: процесс получения более прост и не требует использования экологически небезопасных растворителей и реагентов [77].

В настоящее время проходит клинические испытания комплекс CpG-плазмиды с катионными липидами (коммерческое название JVRS-100). Показана высокая эффективность такого комплекса для терапии острого миелобластного лейкоза [78]. Кроме того, в опытах на животных получены положительные результаты применения препарата JVRS-100 в качестве адъюванта для вакцин против вируса простого герпеса [79], гепатита В [80] и вируса гриппа [81, 82].

В развитие этого направления нами сконструирован рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, который способен продуцировать плазмиду (CpG-плазмиду) с наибольшим среди известных аналогов числом CpG-ОДН (104 повтора нуклеотидной последовательности GTCGTT) [83].

Нами также впервые синтезированы комплексы CpG-плазмиды с наноразмерными частицами Mg,Al-СДГ. При изучении динамики элюции CpG-плазмиды из комплексов с Mg,Al-СДГ установлено, что скорость высвобождения CpG-плазмиды из СДГ-комплекса варьируется в зависимости от рН среды (при кислых значениях рН более высокая, чем при нейтральных) (рис. 3).

Кроме того, показано, что СДГ не влияет на химическую структуру иммобилизованной плазмидной ДНК и обеспечивает частичную защиту ДНК от действия нуклеаз. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования комплексов Mg,Al-СДГ с CpG-плазмидой в качестве рН-контролируемой пассивной системы доставки данных соединений в клетки-мишени [84].

Заключение. CpG-ОДН распознаются иммунной системой человека и животных как «сигнал опасности» и индуцируют врожденные и адаптивные иммунные ответы. Показано, что применение CpG-ОДН в качестве адъювантов или иммунотерапевтических средств эффективно при лечении инфекционных заболеваний, раковых образований и аллергии. Но из-за таких недостатков, как низкая эффективность проникновения в клетки, слабая устойчивость против деградации нуклеазами и относительно высокая цитотоксичность, возникла серьезная потребность в разработке более совершенных систем доставки, которые могли бы устранить эти проблемы.

С целью обеспечения устойчивости к деградации под действием ДНКаз все CpG-ОДН, клинические испытания которых были проведены или проводятся в настоящее время, содержали фосфотиоатные межнуклеотидные связи [85]. Однако побочные эффекты, выявляющиеся при использовании CpG-ОДН с такими неприродными межнуклеотидными связями, дают повод для беспокойства. Так, недавно сообщено о повреждении печени и селезенки у мышей, которым инъецировали фосфотиоатные CpG-ОДН (ODN1826) [86]. Ранее, в ходе III фазы клинических испытаний, в которых CpG-ОДН (ODN2006) применялись совместно со стандартной химиотерапией, выявилась высокая вероятность развития неблагоприятных эффектов [87, 88]. Результаты этих доклинических и клинических исследований указывают на то, что предпочтение следует отдавать CpG-ОДН с фосфодиэфирным сахарофосфатным скелетом, а не фосфотиоатным аналогам.

Результаты многочисленных доклинических исследований показали, что CpG-ОДН в составе разнообразных наноразмерных препаративных форм (другими словами, в виде «нанолекарств») при онкологических, инфекционных и аллергических заболеваниях проявляют более выраженные профилактические и терапевтические эффекты по сравнению со «свободными» CpG-ОДН.

В данном обзоре нами выборочно рассмотрены текущие достижения по разработке новых нанотранспортных систем для доставки CpG-ОДН в ткани и клетки-мишени. Эти транспортные системы имеют много преимуществ. Они могут предохранять CpG-ОДН от деградации ДНКазами и таким образом увеличивать период их полураспада в организме, повышать эффективность проникновения CpG-ОДН в клетку и изменять их внутриклеточную локализацию, доставлять CpG-ОДН непосредственно в ткани-мишени и изменять виды индукции цитокинов. В целом, эти наносистемы доставки значительно усиливают иммунотерапевтический эффект CpG-ОДН. Однако терапевтический потенциал CpG-ОДН еще далеко не исчерпан.

Одним из многообещающих направлений может служить применение CpG-ОДН совместно с другими химиопрепаратами. Наблюдающийся при этом синергизм дает возможность снижать дозу особо токсичных лекарственных средств и, соответственно, понижать уровень вызываемых ими побочных эффектов [89, 90]. Так, Y. Mizuno с соавт. [91] сообщили, что комплекс плазмидной CpG-ДНК с доксорубицином эффективно доставлялся в опухоль печени мыши и проявлял увеличенный антипролиферативный эффект по сравнению со свободным доксорубицином, плазмидной CpG-ДНК или комплексом доксорубицина с плазмидой без CpG-ОДН.

Еще одной многообещающей терапевтической стратегией в онкологии является так называемая вакцинация *in situ*, которая заключается в комбинации низкодозной радиации (или химиотерапии) с введением CpG-ОДН непосредственно внутрь опухоли [92, 93]. При этом CpG-ОДН, выступая в роли ПАМП, обеспечивает подачу «сигнала опасности», что приводит к активации антигенпрезентирующих клеток и высвобождению (в результате гибели раковых клеток) всего спектра опухоль-ассоциированных антигенов. Таким образом, при вакцинации *in situ* отпадает необходимость подбирать потенциальный терапевтический антиген или набор антигенов для конкретного пациента.

Вакцинация *in situ* вызывает мощный Т-клеточный ответ, который необходим для эффективного антиопухолевого иммунитета. Дополнительной важной особенностью вакцинации *in situ* является присущая ей безопасность из-за пониженных доз системных воздействий (химиотерапевтических или радиационных) на пациентов.

Имеются веские основания предполагать, что в скором времени вакцинация *in situ* пополнит арсенал терапевтического инструментария клиницистов в борьбе с раком [94, 95].

Список использованных источников

1. Medzhitov, R. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition / R. Medzhitov, C. A. Janeway // Cell. – 1997. – Vol. 91. – P. 295–298.
2. Janeway, C. A. Innate immune recognition / C. A. Janeway, R. Medzhitov // Annu. Rev. Immunol. – 2002. – Vol. 20. – P. 197–216.
3. Aderem, A. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response / A. Aderem, R. J. Ulevitch // Nature. – 2000. – Vol. 406. – P. 782–787.
4. Hobohm, U. Pathogen-associated molecular pattern in cancer immunotherapy / U. Hobohm, J. L. Stanford, J. M. Grange // Crit. Rev. Immunol. – 2008. – Vol. 28, N 2. – P. 95–107.
5. Pathogen-associated molecular patterns induced crosstalk between dendritic cells, T helper cells, and natural killer helper cells can improve dendritic cell vaccination / T. Oth [et al.] // Mediat. Inflamm. – 2016. – Vol. 2016:5740373.
6. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation / A. M. Krieg [et al.] // Nature. – 1995. – Vol. 374. – P. 546–549.
7. Krieg, A. M. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation / A. M. Krieg // Nat. Rev. Drug Discov. – 2006. – Vol. 5. – P. 471–484.
8. Krieg, A. M. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides / A. M. Krieg // BBA-Gene Struct. Expr. – 1999. – Vol. 1489. – P. 107–116.
9. Jain, V. V. CpG DNA and immunotherapy of allergic airway diseases / V. V. Jain, K. Kitagaki, J. N. Kline // Clin. Exp. Allergy. – 2003. – Vol. 33, N 10. – P. 1330–1335.
10. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition / S. Bauer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, N 16. – P. 9237–9242.

11. Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects / A. M. Krieg // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 709–760.
12. Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides / D. M. Klinman // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 4, N 4. – P. 249–258.
13. Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides / H. L. Wilson [et al.] // *Int. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 25, N 3/4. – P. 183–213.
14. Stacey, K. J. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA / K. J. Stacey, M. J. Sweet, D. A. Hume // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157, N 5. – P. 2116–2122.
15. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA / S. Q. Sun [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 188. – P. 2335–2342.
16. Fonseca, D. E. Use of CpG oligodeoxynucleotides in treatment of asthma and allergic disease / D. E. Fonseca, J. N. Kline // *Adv. Drug Delivery. Rev.* – 2009. – Vol. 61. – P. 256–262.
17. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases / D. M. Klinman [et al.] // *Adv. Drug Delivery. Rev.* – 2009. – Vol. 61, N 3. – P. 248–255.
18. Murad, Y. M. CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic applications in cancer / Y. M. Murad, T. M. Clay // *BioDrugs.* – 2009. – Vol. 23, N 6. – P. 361–375.
19. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation / H. Hacker [et al.] // *EMBO J.* – 1998. – Vol. 17, N 21. – P. 6230–6240.
20. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner / M. Rutz [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – Vol. 34, N 9. – P. 2541–2550.
21. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA: systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway / A. K. Yi [et al.] // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157, N 12. – P. 5394–5402.
22. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides / T. W. Redford [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161, N 8. – P. 3930–3935.
23. Akira, S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // *Cell.* – 2006. – Vol. 124, N 4. – P. 783–801.
24. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA / J. Jung [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169, N 5. – P. 2368–2373.
25. Bernasconi, N. L. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells / N. L. Bernasconi, E. Traggiai, A. Lanzavecchia // *Science.* – 2002. – Vol. 298. – P. 2199–2202.
26. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration / C. Asselin-Paturel [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201, N 7. – P. 1157–1167.
27. CpG oligodeoxynucleotides stimulate IFN- γ -inducible protein-10 production in human B cells / J. Vollmer [et al.] // *J. Endotoxin Res.* – 2004. – Vol. 10, N 6. – P. 431–438.
28. Selected TLR agonist combinations synergistically trigger a TH1 polarizing program in dendritic cells / G. Napolitani [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 769–776.
29. Klinman, D. M. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents / D. M. Klinman // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2004. – Vol. 4, N 6. – P. 937–946.
30. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants / D. M. Klinman [et al.] // *Immunol. Rev.* – 2004. – Vol. 199. – P. 201–216.
31. Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors / B. G. Zhao [et al.] // *J. Immunother. Cancer.* – 2014. – Vol. 2. – Mode of access: <http://www.immunotherapyofcancer.org/content/2/1/12>. – Date of access: 15.06.2017.
32. Carpentier, A. F. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy: review of the literature and potential applications in malignant glioma / A. F. Carpentier, G. Auf, J. Y. Delattre // *Front. Biosci.* – 2003. – Vol. 8. – P. 115–127.
33. Tokunaga, T. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA / T. Tokunaga, T. Yamamoto, S. Yamamoto // *Jpn J. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 52, N 1. – P. 1–11.
34. Krieg, A. M. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? / A. M. Krieg // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, N 7. – P. 831–835.
35. Biodistribution and metabolism of internally H-3 labeled oligonucleotides. 2. 3',5'-blocked oligonucleotides / H. Sands [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 47. – P. 636–646.
36. Agrawal, S. Antisense therapeutics / S. Agrawal, Q. Y. Zhao // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1998. – Vol. 2, N 4. – P. 519–528.
37. Nuclease-resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human toll-like receptor 9 agonists / W. J. Meng [et al.] // *BMC Biotechnol.* – 2011. – Vol. 11. – P. 88.
38. Zhang, H. Nanodelivery systems for enhancing the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides / H. Zhang, X. D. Gao // *Mat. Sci. Eng.: C.* – 2017. – Vol. 70, pt. 2. – P. 935–946.
39. Design of mesoporous silica/cytosine—phosphodiester—guanine oligodeoxynucleotide complexes to enhance delivery efficiency / Y. Zhu [et al.] // *J. Phys. Chem. C.* – 2011. – Vol. 115, N 2. – P. 447–452.
40. BN nanospheres as CpG ODN carriers for activation of toll-like receptor 9 / C. Y. Zhi [et al.] // *J. Materials Chem.* – 2011. – Vol. 21, N 14. – P. 5219–5222.
41. Ahlers, J. D. Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines / J. D. Ahlers, I. M. Belyakov, J. A. Berzofsky // *Curr. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 3, N 3. – P. 285–301.

42. CpG oligodeoxynucleotide induction of antiviral effector molecules in sheep / A. K. Nichani [et al.] // Cell. Immunol. – 2004. – Vol. 227, N 1. – P. 24–37.
43. Towards an inhalative *in vivo* application of immunomodulating gelatin nanoparticles in horse-related preformulation studies / S. Fuchs [et al.] // J. Microencapsul. – 2012. – Vol. 29, N 7. – P. 615–625.
44. Kwong, B. Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy / B. Kwong, H. Liu, D. J. Irvine // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – P. 5134–5147.
45. Encapsulating immunostimulatory CpG oligonucleotides in Listeriolysin O-liposomes promotes a Th1-type response and CTL activity / C. D. Andrews [et al.] // Mol. Pharm. – 2012. – Vol. 9, N 5. – P. 1118–1125.
46. Preparation of immunostimulatory single-walled carbon nanotube/CpG DNA complexes and evaluation of their potential in cancer immunotherapy / S. Zhou [et al.] // Int. J. Pharm. – 2014. – Vol. 471, N 1/2. – P. 214–223.
47. Uniform small graphene oxide as an efficient cellular nanocarrier for immunostimulatory CpG oligonucleotides / J. Sun [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2014. – Vol. 6, N 10. – P. 7926–7932.
48. Gold nanoparticle delivery of modified cpg stimulates macrophages and inhibits tumor growth for enhanced immunotherapy / A.Y. Lin [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 5.: e63550.
49. Tao, W. Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus / W. Tao, K. S. Ziemer, H. S. Gill // Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. 237–252.
50. Self-assembly of poly-adenine-tailed CpG oligonucleotide-gold nanoparticle nanoconjugates with immunostimulatory activity / N. Chen [et al.] // Small. – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 368–375.
51. Polyethyleneimine-functionalized boron nitride nanospheres as efficient carriers for enhancing the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides / H. Zhang [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2015. – Vol. 10. – P. 5343–5353.
52. Organosilane and polyethylene glycol functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticles as carriers for CpG immunotherapy *in vitro* and *in vivo* / H. Zheng [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 10.: e0140265.
53. Effect of amino groups of mesoporous silica nanoparticles on CpG oligodeoxynucleotide delivery / Y. Xu [et al.] // Sci. Technol. Adv. Mater. – 2015. – Vol. 16, N 4.: 045006.
54. Binding of CpG oligodeoxynucleotides to mesoporous silica nanoparticles for enhancing delivery efficiency / C. Tao [et al.] // Micropor. Mesopor. Mater. – 2015. – Vol. 204. – P. 91–98.
55. Coencapsulation of tumor lysate and CpG-ODN in PLGA-microspheres enables successful immunotherapy of prostate carcinoma in TRAMP mice / M. Mueller [et al.] // J. Control. Rel. – 2012. – Vol. 162. – P. 159–166.
56. Immunization with antigenic peptides complexed with β -glucan induces potent cytotoxic T-lymphocyte activity in combination with CpG-ODNs / S. Mochizuki [et al.] // J. Control. Rel. – 2015. – Vol. 220, N 1. – P. 495–502.
57. Adjuvant activity enhanced by cross-linked CpG-oligonucleotides in β -glucan nanogel and its antitumor effect / N. Miyamoto [et al.] // Bioconjug. Chem. – 2017. – Vol. 28, N 2. – P. 565–573.
58. Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA origami structures / V. J. Schuller [et al.] // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5. – P. 9696–9702.
59. Self-assembling DNA dendrimer for effective delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells / K. Mohri [et al.] // Biomacromolecules. – 2015. – Vol. 16, N 4. – P. 1095–1101.
60. Biodegradable CpG DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice / M. Nishikawa [et al.] // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, N 2. – P. 488–494.
61. Self-assembled multifunctional DNA nanoflowers for the circumvention of multidrug resistance in targeted anticancer drug delivery / L. Mei [et al.] // Nano. Res. – 2015. – Vol. 8, N 11. – P. 3447–3460.
62. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides / G. K. Mutwiri [et al.] // J. Control. Rel. – 2004. – Vol. 97, N 1. – P. 1–17.
63. Mutwiri, G. S. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides / G. S. Mutwiri, S. van Drunen Littel-van den Hurk, L. A. Babiuk // Adv. Drug Delivery. Rev. – 2009. – Vol. 61, N 3. – P. 226–232.
64. Demoullins, P. Alginate-coated chitosan nanogels differentially modulate class-A and class-B CpG-ODN targeting of dendritic cells and intracellular delivery / T. Demoullins, P. Milona, K. C. McCullough // Nanomedicine. – 2014. – Vol. 10, N 8. – P. 1739–1749.
65. Hanagata, N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system / N. Hanagata // Int. J. Nanomed. – 2012. – Vol. 7. – P. 2181–2195.
66. DNA-inorganic hybrid nanovaccine for cancer immunotherapy / G. Zhu [et al.] // Nanoscale. – 2016. – Vol. 8, N 12. – P. 6684–6692.
67. Xu, Z. P. Layered double hydroxide nanomaterials as potential cellular drug delivery agents / Z. P. Xu, G. Q. Lu // Pure Appl. Chem. – 2006. – Vol. 78, N 9. – P. 1771–1779.
68. Rives, V. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): a review / V. Rives, M. del Arco, C. Martin // J. Control. Rel. – 2013. – Vol. 169. – P. 28–39.
69. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties / H. W. Olf [et al.] // Appl. Clay Sci. – 2009. – Vol. 43, N 3/4. – P. 459–464.
70. Theiss, F. L. Synthesis of layered double hydroxides containing Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} and Al^{3+} layer cations by co-precipitation methods / F. L. Theiss, G. A. Ayoko, R. L. Frost // Appl. Surf. Sci. – 2016. – Vol. 383. – P. 200–213.
71. Intercalation of nucleotides into layered double hydroxides by ion-exchange reaction / S. Aisawa [et al.] // Appl. Clay Sci. – 2005. – Vol. 28, N 1/4. – P. 137–145.
72. Bio-LDH nanohybrid for gene therapy / S. Y. Kwak [et al.] // Solid State Ionics. – 2002. – Vol. 151. – P. 229–234.
73. Layered double hydroxide nanoparticles as cellular delivery vectors of supercoiled plasmid DNA / Z. P. Xu [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2007. – Vol. 2, N 2. – P. 163–174.

74. Anticancer drug-inorganic nanohybrid and its cellular interaction / J. Y. Kim [et al.] // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2007. – Vol. 7, N 11. – P. 3700–3705.
75. The effects of intralayer metal composition of layered double hydroxides on glass transition, dispersion, thermal and fire properties of their PMMA nanocomposites / C. Manzi-Nshuti [et al.] // *Thermochim. Acta.* – 2009. – Vol. 495, N 1/2. – P. 63–71.
76. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors / R. A. Pontarollo [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2002. – Vol. 83. – P. 2973–2981.
77. Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine / Y. Kojima [et al.] // *Vaccine.* – 2002. – Vol. 20, N 23/24. – P. 2857–2865.
78. Juvaris BioTherapeutics announces positive data from clinical trial of JVRS-100 adjuvanted flu vaccine [Electronic resource] // Juvaris BioTherapeutics, Inc. – Mode of access: http://www.juvaris.com/news/press/09_01_08.html. – Date of access: 18.05.2017.
79. Effects of herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines and CLDC adjuvant on genital herpes infection in the guinea pig / D. I. Bernstein [et al.] // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29, N 11. – P. 2071–2078.
80. Breaking B and T cell tolerance using cationic lipid-DNA complexes (CLDC) as a vaccine adjuvant with hepatitis B virus (HBV) surface antigen in transgenic mice expressing HBV / J. D. Morreya [et al.] // *Antiviral Res.* – 2011. – Vol. 90, N 3. – P. 227–230.
81. Cationic liposome–DNA complexes (CLDC) adjuvant enhances the immunogenicity and cross-protective efficacy of a pre-pandemic influenza A H5N1 vaccine in mice / L. Dong [et al.] // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30. – P. 254–264.
82. Efficacy of influenza vaccination of elderly Rhesus Macaques is dramatically improved by addition of a cationic lipid/DNA adjuvant / T. D. Carroll [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 209, N 1. – P. 24–33.
83. Zinchenko, A. I. Construction of plasmid enriched with immunostimulatory CpG motifs / A. I. Zinchenko, S. V. Kvach, A. S. Shchokolova // *East. Eur. Sci. J.* – 2014. – N 3. – P. 10–13.
84. Цеколова, А. С. Разработка биотехнологических способов получения иммуностимуляторов нуклеиновой природы – CpG-ДНК и цикло-диГМФ : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.01.06 / А. С. Цеколова ; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т микробиологии. – Минск, 2014. – 24 с.
85. Hanagata, N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies / N. Hanagata // *Int. J. Nanomed.* – 2017. – Vol. 12. – P. 515–531.
86. Design and structural requirements of the potent and safe TLR-9 agonistic immunomodulator MGN1703 / M. Schmidt [et al.] // *Nucleic Acid Ther.* – 2015. – Vol. 25, N 3. – P. 130–140.
87. Randomized phase III trial of paclitaxel/carboplatin with or without PF-3512676 (Toll-like receptor 9 agonist) as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer / V. Hirsh [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, N 19. – P. 2667–2674.
88. A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer / C. Manegold [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2012. – Vol. 23, N 1. – P. 72–77.
89. Co-delivery of drug and DNA from cationic dual-responsive micelles derived from poly(DMAEMA-co-PPGMA) / X. J. Loh [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2013. – Vol. 33, N 8. – P. 4545–4550.
90. Biodegradable microparticles loaded with doxorubicin and CpG ODN for *in situ* immunization against cancer / A. Makkouk [et al.] // *AAPS J.* – 2015. – Vol. 17, N 1. – P. 184–193.
91. Simultaneous delivery of doxorubicin and immunostimulatory CpG motif to tumors using a plasmid DNA/doxorubicin complex in mice / Y. Mizuno [et al.] // *J. Control. Rel.* – 2010. – Vol. 141, N 2. – P. 252–259.
92. *In situ* vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study / J. D. Brody [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, N 28. – P. 4324–4332.
93. Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy / A. Marabelle [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20, N 7. – P. 1747–1756.
94. *In-situ* tumor vaccination: bringing the fight to the tumor / R. H. Pierce [et al.] // *Hum. Vaccines Immunother.* – 2015. – Vol. 11, N 8. – P. 1901–1909.
95. Nanotechnology based therapeutic modality to boost anti-tumor immunity and collapse tumor defense / X. Hu [et al.] // *J. Control. Rel.* – 2017. – Vol. 256. – P. 26–45.

References

1. Medzhitov R., Janeway C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 1997, vol. 91, pp. 295–298.
2. Janeway C. A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 2002, vol. 20, pp. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
3. Aderem A., Ulevitch R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, vol. 406, pp. 782–787.
4. Hobohm U., Stanford J. L., Grange J. M. Pathogen-associated molecular pattern in cancer immunotherapy. *Critical Review of Immunology*, 2008, vol. 28, no. 2, pp. 95–107.
5. Oth T., Vanderlocht J., Van Elssen C. H., Bos G. M., Germeraad W. T. Pathogen-associated molecular patterns induced crosstalk between dendritic cells, T helper cells, and natural killer helper cells can improve dendritic cell vaccination. *Mediators of Inflammation*, 2016, vol. 2016: 5740373. DOI: 10.1155/2016/5740373
6. Krieg A. M., Yi A. K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A., Klinman D. M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995, vol. 374, pp. 546–549. DOI: 10.1038/374546a0
7. Krieg A. M. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nature Review Drug Discovery*, 2006, vol. 5, pp. 471–484. DOI: 10.1038/nrd2059

8. Krieg A. M. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, 1999, vol. 1489, pp. 107–116.
9. Jain V. V., Kitagaki K., Kline J. N. CpG DNA and immunotherapy of allergic airway diseases. *Clinical and Experimental Allergy*, 2003, vol. 33, no. 10, pp. 1330–1335. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2003.01763.x
10. Bauer S., Kirschning C. J., Hacker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford G. B. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, no. 16, pp. 9237–9242. DOI: 10.1073/pnas.161293498
11. Krieg A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, 2002, vol. 20, pp. 709–760. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
12. Klinman D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature Reviews. Immunology*, 2004, vol. 4, no. 4, pp. 249–258. DOI: 10.1038/nri1329
13. Wilson H. L., Dar A., Napper S. K., Marianela Lopez A., Babiuk L. A., Mutwiri G. K. Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. *International Review of Immunology*, 2006, vol. 25, no. 3/4, pp. 183–213. DOI: 10.1080/08830180600785868
14. Stacey K. J., Sweet M. J., Hume D. A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *Journal of Immunology*, 1996, vol. 157, no. 5, pp. 2116–2122.
15. Sun S. Q., Zhang X., Tough D., Sprent J. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *Journal of Experimental Medicine*, 1998, vol. 188, pp. 2335–2342.
16. Fonseca D. E., Kline J. N. Use of CpG oligodeoxynucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Advances of Drug Delivery. Reviews*, 2009, vol. 61, pp. P. 256–262.
17. Klinman D. M., Klaschik S., Sato T., Tross D. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, vol. 61, no. 3, pp. 248–255. DOI: 10.1016/j.addr.2008.12.012
18. Murad Y. M., Clay T. M. CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic applications in cancer. *BioDrugs*, 2009, vol. 23, no. 6, pp. 361–375. DOI: 10.2165/11316930-000000000-00000
19. Hacker H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G. B., Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *The EMBO Journal*, 1998, vol. 17, no. 21, pp. 6230–6240. DOI: 10.1093/emboj/17.21.6230
20. Rutz M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G. B., Wagner H., Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology*, 2004, vol. 34, no. 9, pp. 2541–2550. DOI: 10.1002/eji.200425218
21. Yi A. K., Klinman D. M., Martin T. L., Matson S., Krieg A. M. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA: systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *Journal of Immunology*, 1996, vol. 157, no. 12, pp. 5394–5402.
22. Redford T. W., Yi A. K., Ward C. T., Krieg A. M. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology*, 1998, vol. 161, no. 8, pp. 3930–3935.
23. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, vol. 124, no. 4, pp. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015
24. Jung J., Yi A. K., Zhang X., Choe J., Li L., Choi Y. S. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *Journal of Immunology*, 2002, vol. 169, no. 5, pp. 2368–2373.
25. Bernasconi N. L., Traggiai E., Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 2002, vol. 298, pp. 2199–2202. DOI: 10.1126/science.1076071
26. Asselin-Paturel C., Brizard G., Chemin K., Boonstra A., O'Garra, A., Vicari A., Trinchieri G. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *Journal of Experimental Medicines*, 2005, vol. 201, no. 7, pp. 1157–1167. DOI: 10.1084/jem.20041930
27. Vollmer J., Jurk M., Samulowitz U., Lipford G., Forsbach A., Wüllner M., Tluk S., Hartmann H., Kritzler A., Müller C., Schetter C., Krieg A. M. CpG oligodeoxynucleotides stimulate IFN-gamma-inducible protein-10 production in human B cells. *Journal of Endotoxin Research*, 2004, vol. 10, no. 6, pp. 431–438. DOI: 10.1179/096805104225006534
28. Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A. Selected TLR agonist combinations synergistically trigger a TH1 polarizing program in dendritic cells. *Nature. Immunology*, 2005, vol. 6, no. 8, pp. 769–776.
29. Klinman D. M. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2004, vol. 4, no. 6, pp. 937–946. DOI: 10.1517/14712598.4.6.937
30. Klinman D. M., Currie D., Gursel I., Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunological Reviews*, 2004, vol. 199, pp. 201–216. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00148.x
31. Zhao B. G., Vasilakos J. P., Tross D., Smirnov D., Klinman D. M. Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2014, vol. 2. Available at: <http://www.immunotherapyofcancer.org/content/2/1/12> (accessed 15.06.2017).
32. Carpentier A. F., Auf G., Delattre J. Y. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy: review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Frontiers in Bioscience*, 2003, vol. 8, pp. 115–127.
33. Tokunaga T., Yamamoto T., Yamamoto S. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Japan Journal of Infection Diseases*, 1999, vol. 52, no. 1, pp. 1–11.
34. Krieg A. M. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nature Medicine*, 2003, vol. 9, no. 7, pp. 831–835. DOI: 10.1038/nm0703-831
35. Sands H., Gorey-Feret L. J., Ho S. P., Bao Y., Cocuzza A. J., Chidester D., Hobbs F.W. Biodistribution and metabolism of internally H-3 labeled oligonucleotides. II. 3',5'-blocked oligonucleotides. *Molecular Pharmacology*, 1995, vol. 47, pp. 636–646.

36. Agrawal S., Zhao Q. Y. Antisense therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, vol. 2, no. 4, pp. 519–528.
37. Meng W., Yamazaki T., Nishida Y., Hanagata N. Nuclease-resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human toll-like receptor 9 agonists. *BMC Biotechnology*, 2011, vol. 11. DOI: 10.1186/1472-6750-11-88
38. Zhang H., Gao X. D. Nanodelivery systems for enhancing the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, vol. 70, pt. 2, pp. 935–946.
39. Zhu Y., Meng W., Li X., Gao H., Hanagata N. Design of mesoporous silica/cytosine–phosphodiester–guanine oligodeoxynucleotide complexes to enhance delivery efficiency. *Journal of Physical Chemistry*, 2011, vol. 115, no. 2, pp. 447–452. DOI: 10.1021/jp109535d
40. Zhi C., Meng W., Yamazaki T., Bando Y., Golberg D., Tang C., Hanagata N. BN nanospheres as CpG ODN carriers for activation of toll-like receptor 9. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, vol. 21, no. 14, pp. 5219–5222.
41. Ahlers J. D., Belyakov I. M., Berzofsky J. A. Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines. *Current Molecular Medicine*, 2003, vol. 3, no. 3, pp. 285–301.
42. Nichani A. K., Kaushik R. S., Mena A., Popowych Y., Dent D., Townsend H. G., Mutwiri G., Hecker R., Babiuk L. A., Griebel P. J. CpG oligodeoxynucleotide induction of antiviral effector molecules in sheep. *Cellular Immunology*, 2004, vol. 227, no. 1, pp. 24–37. DOI: 10.1016/j.cellimm.2004.01.004
43. Fuchs S., Klier J., May A., Winter G., Coester C., Gehlen H. Towards an inhalative *in vivo* application of immunomodulating gelatin nanoparticles in horse-related preformulation studies. *Journal of Microencapsulation*, 2012, vol. 29, no. 7, pp. 615–625.
44. Kwong B., Liu H., Irvine D. J. Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, pp. 5134–5147. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.067.
45. Andrews C. D., Huh M. S., Patton K., Higgins D., Van Nest G., Ott G., Lee K. D. Encapsulating immunostimulatory CpG oligonucleotides in Listeriolysin O-liposomes promotes a Th1-type response and CTL activity. *Molecular Pharmaceutics*, 2012, vol. 9, no. 5, pp. 1118–1125. DOI: 10.1021/mp2003835
46. Zhou S., Hashida Y., Kawakami S., Mihara J., Umeyama T., Imahori H., Murakami T., Yamashita F., Hashida M. Preparation of immunostimulatory single-walled carbon nanotube/CpG DNA complexes and evaluation of their potential in cancer immunotherapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, vol. 471, no. 1/2, pp. 214–223. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.037
47. Sun J., Chao J., Huang J., Yin M., Zhang H., Peng C., Zhong Z., Chen N. Uniform small graphene oxide as an efficient cellular nanocarrier for immunostimulatory CpG oligonucleotides. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2014, vol. 6, no. 10, pp. 7926–7932. DOI: 10.1021/am5012595
48. Lin A. Y., Almeida J. P., Bear A., Liu N., Luo L., Foster A. E., Drezek R. A. Gold nanoparticle delivery of modified CpG stimulates macrophages and inhibits tumor growth for enhanced immunotherapy. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 5, e63550.
49. Tao W., Ziemer K. S., Gill H. S. Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. *Nanomedicine*, 2014, vol. 9, no. 2, pp. 237–252. DOI: 10.2217/nnm.13.58
50. Chen N., Wei M., Sun Y., Li F., Pei H., Li X., Su S., He Y., Wang L., Shi J., Fan C., Huang Q. Self-assembly of polyadenine-tailed CpG oligonucleotide-gold nanoparticle nanoconjugates with immunostimulatory activity. *Small*, 2014, vol. 10, no. 2, pp. 368–375. DOI: 10.1002/sml.201300903
51. Zhang H., Feng S., Yan T., Zhi C., Gao X. D., Hanagata N. Polyethyleneimine-functionalized boron nitride nanospheres as efficient carriers for enhancing the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, vol. 10, pp. 5343–5353. DOI: 10.2147/IJN.S88774
52. Zheng H., Wen S., Zhang Y., Sun Z. Organosilane and polyethylene glycol functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticles as carriers for CpG immunotherapy *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 10, e0140265. DOI: 10.1371/journal.pone.0140265
53. Xu Y., Claiden P., Zhu Y., Morita H., Hanagata N. Effect of amino groups of mesoporous silica nanoparticles on CpG oligodeoxynucleotide delivery. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2015, vol. 16, no. 4, 045006. DOI: 10.1088/1468-6996/16/4/045006
54. Tao C., Zhu Y., Li X., Hanagata N. Binding of CpG oligodeoxynucleotides to mesoporous silica nanoparticles for enhancing delivery efficiency. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2015, vol. 204, pp. 91–98. DOI: 10.1016/j.micromeso.2014.11.007
55. Mueller M., Reichardt W., Koerner J., Groettrup M. Coencapsulation of tumor lysate and CpG-ODN in PLGA-microspheres enables successful immunotherapy of prostate carcinoma in TRAMP mice. *Journal of Controlled Release*, 2012, vol. 162, no. 1, pp. 159–166. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.015
56. Mochizuki S., Morishita H., Kobiyama K., Aoshi T., Ishii K. J., Sakurai K. Immunization with antigenic peptides complexed with β -glucan induces potent cytotoxic T-lymphocyte activity in combination with CpG-ODNs. *Journal of Controlled Release*, 2015, vol. 220, pp. 495–502.
57. Miyamoto N., Mochizuki S., Fujii S., Yoshida K., Sakurai K. Adjuvant activity enhanced by cross-linked CpG-oligonucleotides in β -glucan nanogel and its antitumor effect. *Bioconjugate Chemistry*, 2017, vol. 28, no. 2, pp. 565–573. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00675
58. Schüller V. J., Heidegger S., Sandholzer N., Nickels P. C., Suhartha N. A. Endres S., Bourquin C., Liedl T. Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA origami structures. *ACS Nano*, 2011, vol. 5, pp. 9696–9702.
59. Mohri K., Kusuki E., Ohtsuki S., Takahashi N., Endo M., Hidaka K., Sugiyama H., Takahashi Y., Takakura Y., Nishikawa M. Self-assembling DNA dendrimer for effective delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells. *Biomacromolecules*, 2015, vol. 16, no. 4, pp. 1095–1101. DOI: 10.1021/bm501731f
60. Nishikawa M., Mizuno Y., Mohri K., Matsuoka N., Rattanakit S., Takahashi Y., Funabashi H., Luo D., Takakura Y. Biodegradable CpG DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 2, pp. 488–494. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.013

61. Mei L., Zhu G., Qiu L., Wu C., Chen H., Liang H., Cansiz S., Lv Y., Zhang X., Tan W. Self-assembled multifunctional DNA nanoflowers for the circumvention of multidrug resistance in targeted anticancer drug delivery. *Nano Research*, 2015, vol. 8, no. 11, pp. 3447–3460.
62. Mutwiri G. K., Nichani A. K., Babiuk S., Babiuk L. A. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Controlled Release*, 2004, vol. 97, no. 1, pp. 1–17. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.02.022
63. Mutwiri G. S., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, vol. 61, no. 3, pp. 226–232. DOI: 10.1016/j.addr.2008.12.004
64. Demoulines T., Milona P., McCullough K. C. Alginate-coated chitosan nanogels differentially modulate class-A and class-B CpG-ODN targeting of dendritic cells and intracellular delivery. *Nanomedicine*, 2014, vol. 10, no. 8, pp. 1739–1749. DOI: 10.1016/j.nano.2014.06.003
65. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, vol. 7, pp. 2181–2195. DOI: 10.2147/IJN.S30197
66. Zhu G., Liu Y., Yang X., Kim Y. H., Zhang H., Jia R., Liao H. S., Jin A., Lin J., Aronova M., Leapman R., Nie Z., Niu G., Chen X. DNA-inorganic hybrid nanovaccine for cancer immunotherapy. *Nanoscale*, 2016, vol. 8, no. 12, pp. 6684–6692. DOI: 10.1039/c5nr08821f
67. Xu Z. P., Lu G. Q. Layered double hydroxide nanomaterials as potential cellular drug delivery agents. *Pure and Applied Chemistry*, 2006, vol. 78, no. 9, pp. 1771–1779. DOI: 10.1351/pac200678091771
68. Rives V., del Arco M., Martin C. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): a review. *Journal of Controlled Release*, 2013, vol. 169, pp. 28–39.
69. Olf H. W., Torres-Dorante L. O., Eckelt R., Kosslick H. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. *Applied Clay Science*, 2009, vol. 43, no. 3/4, pp. 459–464.
70. Theiss F. L., Ayoko G. A., Frost R. L. Synthesis of layered double hydroxides containing Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ and Al³⁺ layer cations by co-precipitation methods. *Applied Surface Science*, 2016, vol. 383, pp. 200–213. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.04.150
71. Aisawa S., Ohnuma Y., Hirose K., Takahashi S., Hirahara H., Narita E. Intercalation of nucleotides into layered double hydroxides by ion-exchange reaction. *Applied Clay Science*, 2005, vol. 28, no. 1/4, pp. 137–145.
72. Kwak S.-Y., Jeong Y.-Joo, Park J.-S., Choy J.-Ho. Bio-LDH nanohybrid for gene therapy. *Solid State Ionics*, 2002, vol. 151, pp. 229–234.
73. Xu Z. P., Walker T. L., Liu K., Cooper H. M., Lu G. M., Bartlett P. F. Layered double hydroxide nanoparticles as cellular delivery vectors of supercoiled plasmid DNA. *International Journal of Nanomedicine*, 2007, vol. 2, no. 2, pp. 163–174.
74. Kim J. Y., Choi S. J., Oh J. M., Park T., Choy J. H. Anticancer drug-inorganic nanohybrid and its cellular interaction. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2007, vol. 7, no. 11, pp. 3700–3705.
75. Manzi-Nshuti C., Chen D., Su S., Wilkie C. A. The effects of intralayer metal composition of layered double hydroxides on glass transition, dispersion, thermal and fire properties of their PMMA nanocomposites. *Thermochimica Acta*, 2009, vol. 495, no. 1/2, pp. 63–71.
76. Pontarollo R. A., Babiuk L. A., Hecker R., van Drunen Littel-van den Hurk S. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors. *Journal of General Virology*, 2002, vol. 83, pp. 2973–2981.
77. Kojima Y., Xin K. Q., Ooki T., Hamajima K., Oikawa T., Shinoda K., Ozaki T., Hoshino Y., Jounai N., Nakazawa M., Klinman D. Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine*, 2002, vol. 20, pp. 2857–2865.
78. Juvaris BioTherapeutics announces positive data from clinical trial of JVRS-100 adjuvanted flu vaccine. *Juvaris BioTherapeutics, Inc.* Available at: http://www.juvaris.com/news/press/09_01_08.html (accessed 18 May 2017).
79. Bernstein D. I., Earwood J. D., Bravo F. J., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Clark J. R., Fairman J., Cardin R. D. Effects of herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines and CLDC adjuvant on genital herpes infection in the guinea pig. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 11, pp. 2071–2078.
80. Morreya J. D., Motter N. E., Chang S., Fairman J. Breaking B and T cell tolerance using cationic lipid-DNA complexes (CLDC) as a vaccine adjuvant with hepatitis B virus (HBV) surface antigen in transgenic mice expressing HBV. *Antiviral Research*, 2011, vol. 90, no. 3, pp. 227–230.
81. Dong L., Liu F., Fairman J., Hong D. K., Lewis D. B., Monath T., Warner J. F., Belser J. A., Patel J., Hancock K., Katz J. M., Lu X. Cationic liposome–DNA complexes (CLDC) adjuvant enhances the immunogenicity and cross-protective efficacy of a pre-pandemic influenza A H5N1 vaccine in mice. *Vaccine*, 2012, vol. 30, pp. 254–264. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.10.103
82. Carroll T. D., Matzinger S. R., Barry P. A., McChesney M. B., Fairman J., Miller C. J. Efficacy of influenza vaccination of elderly Rhesus Macaques is dramatically improved by addition of a cationic lipid/DNA adjuvant. *Journal of Infection Diseases*, 2014, vol. 209, no. 1, pp. 24–33.
83. Zinchenko A. I., Kvach S. V., Shchokolova A. S. Construction of plasmid enriched with immunostimulatory CpG motifs. *Eastern European Scientific Journal*, 2014, no. 3, pp. 10–13.
84. Shchokolova A. S. *Elaboration of biotechnological methods of obtaining nucleic immunostimulants – CpG-DNA and cyclic di-GMP*, Abstract of Ph. D. diss. Minsk, 2014. 24 p. (in Russian).
85. Hanagata N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, vol. 12, pp. 515–531. DOI: 10.2147/IJN.S114477
86. Schmidt M., Hagner N., Marco A., König-Merediz S. A., Schroff M., Wittig B. Design and structural requirements of the potent and safe TLR-9 agonistic immunomodulator MGN1703. *Nucleic Acid Therapeutics*, 2015, vol. 25, no. 3, pp. 130–140. DOI: 10.1089/nat.2015.0533

87. Hirsh V., Paz-Ares L., Boyer M., Rosell R., Middleton G., Eberhardt W. E., Szczesna A., Reiterer P., Saleh M., Arrieta O., Bajetta E., Webb R. T., Raats J., Benner R. J., Fowst C., Meech S. J., Readett D., Schiller J. H. Randomized phase III trial of paclitaxel/carboplatin with or without PF-3512676 (Toll-like receptor 9 agonist) as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, vol. 29, no. 19, pp. 2667–2674. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.8971
88. Manegold C., van Zandwijk N., Szczesna A., Zatloukal P., Au J. S., Blasinska-Morawiec M., Serwatowski P., Krzakowski M., Jassem J., Tan E. H., Benner R. J., Ingrosso A., Meech S. J., Readett D., Thatcher N. A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 2012, vol. 23, no. 1, pp. 72–77. DOI: 10.1093/annonc/mdr030
89. Loh X. J., Ong S. J., Tung Y. T., Choo H. T. Co-delivery of drug and DNA from cationic dual-responsive micelles derived from poly(DMAEMA-co-PPGMA). *Material Science and Engineering*, 2013, vol. 33, no. 8, pp. 4545–4550. DOI: 10.1016/j.msec.2013.07.011
90. Makkouk A., Joshi V. B., Wongrakpanich A., Lemke C. D., Gross B. P., Salem A. K., Weiner G. J. Biodegradable microparticles loaded with doxorubicin and CpG ODN for *in situ* immunization against cancer. *AAPS Journal*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 184–193. DOI: 10.1208/s12248-014-9676-6
91. Mizuno Y., Naoi T., Nishikawa M., Rattanakit S., Hamaguchi N., Hashida M., Takakura Y. Simultaneous delivery of doxorubicin and immunostimulatory CpG motif to tumors using a plasmid DNA/doxorubicin complex in mice. *Journal of Controlled Release*, 2010, vol. 141, no. 2, pp. 252–259. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.09.014
92. Brody J. D., Ai W. Z., Czerwinski D. K., Torchia J. A., Levy M., Advani R. H., Kim Y. H., Hoppe R. T., Knox S. J., Shin L. K., Wapnir I., Tibshirani R. J., Levy R. *In situ* vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 28, pp. 4324–4332. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.9793
93. Marabelle A., Kohrt H., Caux C., Levy R. Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 2014, vol. 20, no. 7, pp. 1747–1756. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2116
94. Pierce R. H., Campbell J. S., Pai S. I., Brody J. D., Kohrt H. E. *In-situ* tumor vaccination: bringing the fight to the tumor. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2015, vol. 11, no. 8, pp. 1901–1909. DOI: 10.1080/21645515.2015.1049779
95. Hu X., Wu T., Bao Y., Zhang Z. Nanotechnology based therapeutic modality to boost anti-tumor immunity and collapse tumor defense. *Journal of Controlled Release*, 2017, vol. 256, pp. 26–45. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.04.026

Информация об авторах

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

Щеколова Анастасия Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastindeathnote@gmail.com.

Information about the authors

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

Anastasiya S. Schokolova – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastindeathnote@gmail.com.

Н. А. Балашенко, С. Е. Дромашко

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК И ИХ ФУНКЦИИ

Аннотация. В обзоре рассматривается роль длинных некодирующих РНК (lncRNA) в регуляции генных сетей с высокой степенью сложности. Приводится классификация всех не кодирующих белок РНК (вовлеченных в синтез белка, участвующих в посттранскрипционном изменении мРНК либо репликации ДНК, регуляторных). Обсуждается роль различных lncRNA в регуляции геноспецифической транскрипции, посттранскрипционной регуляции, инактивации X-хромосомы (такова, например, HOTAIR – перепрограммирующая состояние хроматина или Xist РНК, которая связывается с белковым комплексом PRC2, обуславливая инактивацию генов X-хромосомы). Рассматривается роль lncRNA, в частности TelRNA, в регуляции длины теломера и в репликативном старении. Обсуждается также характер экспрессии lncRNA в тканях нервной системы на примере такого эволюционно консервативного транскрипта, как TUNA. Кроме того, приводятся литературные данные о возможном участии различных типов lncRNA в развитии ряда заболеваний, в том числе онкологических и сердечно-сосудистых.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК (нкРНК), регуляция генетических и эпигенетических процессов, генные сети

Для цитирования: Балашенко, Н. А. Длинные некодирующие РНК и их функции / Н. А. Балашенко, С. Е. Дромашко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 110–119.

N. A. Balashenko, S. E. Dromashko

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

LONG NON-CODING RNAs AND THEIR FUNCTIONS

Abstract. The review examines the role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in the regulation of gene networks with a high degree of complexity. There are such divisions as the role of lncRNAs in: the genome and transcriptome organization; the regulation of a gene specific transcription; the post-transcriptional regulation; X chromosome inactivation; the development of oncopathology and some other diseases; the regulation of telomere length; the expression in tissues of the nervous system. We discuss the literature data on several kinds of non-coding RNA, the participation of lncRNAs in the transmission and coordination of information flows in the epigenetic, transcriptional and post-transcriptional processes. For example, there is a list of non-coding RNAs including both long non-coding RNAs (lncRNAs) and other RNA types (micro RNAs (miRNA), small interfering RNAs (siRNA), piwi-interacting RNAs (piRNA), small nucleolar RNAs (snoRNA), etc.) Our article also deals with the role of such RNAs as HOTAIR – RNA reprogramming chromatin state, Xist, which causes an inactivation of X chromosome genes, or TelRNA involved in replicative aging. Some features of lncRNA expression in tissues of the nervous system are discussed on example of such an evolutionary conservative molecule as TUNA, probably involved in the development of Huntington's disease. In addition, we consider the probable role of lncRNAs in the development of a number of diseases, including cancer and cardiovascular ones (PCGEM1 – prostate tumor, MALAT1 – non-small cell lung cancer; Miata – myocardial infarction, ANRIL – atherosclerosis, etc.).

Keywords: long non-coding RNAs (lncRNAs), regulation of genetic and epigenetic processes, gene networks

For citation: Balashenko N. A., Dromashko S. E. Long non-coding RNAs and their functions. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 110–119 (in Russian).

Введение. На протяжении многих лет считалось, что основная функция РНК – выступать в качестве посредника в процессе считывания белковой последовательности с кодирующего ее гена. Поэтому одной из самых больших неожиданностей в современной биологии стало открытие, что белок-кодирующие последовательности составляют менее 2 % от всего генома; затем было установлено, что по крайней мере 90 % генома человека активно транскрибируются [1]. Таким образом, было установлено, что транскриптом человека имеет более сложную организацию. Хотя раньше полагали, что эти 90 % – транскрипционный «шум» или «эволюционный мусор», возникающий из-за вставки мобильных генетических элементов, последние данные свидетельствуют о том, что некодирующие РНК (нкРНК) могут играть важную биологическую роль в развитии организмов, их физиологии и патологии [1].

В последние годы малые нкРНК (микроРНК) изучались наиболее активно, однако сейчас идет интенсивное накопление данных о молекулярных механизмах функционирования широкого спектра новых классов РНК, что обеспечивает понимание их роли в клеточной биологии и развитии заболеваний человека. В данном обзоре внимание сконцентрировано в основном на длинных некодирующих РНК (long non-coding RNA, lncRNA), их функциях в клетке и в развитии онкозаболеваний, а также на потенциальной возможности использования их в качестве биомаркеров.

Значение lncRNA, организация генома и транскриптома. Следует отметить, что lncRNA – это транскрипты, не кодирующие белок и имеющие длину более 200 нуклеотидов [2]. Это позволяет их отличать от других видов нкРНК, таких как микроРНК (miRNA) – коротких интерферирующих РНК (siRNA), взаимодействующих с белком piwiРНК (piRNA), малых ядерных РНК (snoRNAs) и некоторых других коротких РНК (см. таблицу).

Классификация РНК, не кодирующих белок
Classification of RNA, non-coding a protein

Тип РНК	Аббревиатура на английском	Функция	Распространенность
<i>РНК, вовлеченные в синтез белка</i>			
Рибосомальные РНК [3]	rRNA	Входят в состав рибосом	Все организмы
Сигнал-распознающие РНК [4]	7SL RNA or SRP RNA	Распознавание сигнала на мембране	Все организмы
Транспортные РНК [5]	tRNA	Трансляция	Все организмы
Транспортно-матричные РНК [6]	tmRNA	Трансляция	Бактерии
<i>РНК, вовлеченные в посттранскрипционное изменение мРНК либо репликацию ДНК</i>			
Малые ядерные РНК [7]	snRNA	Сплайсинг и др.	Эукариоты и археи
Малые ядрышковые РНК [8, 9]	snoRNA	Нуклеотидные модификации РНК	Эукариоты и археи
SmY рибонуклеиновая кислота [10]	SmY	Транс-сплайсинг мРНК	Нематоды
Малые Cajal-специфичные РНК [9, 11]	scaRNA	Нуклеотидные модификации РНК	Животные
Гидовые РНК [12]	gRNA	Нуклеотидные модификации мРНК	Митохондрии и пластиды
Рибонуклеаза Р [13]	RNase P	Созревание транспортной РНК	Все организмы
Рибонуклеаза MRP [14]	RNase MRP	Созревание рибосомной РНК, репликация ДНК	Эукариоты
Y РНК [15]	Y RNA	Процессинг РНК, репликация ДНК	Животные
Теломеразные РНК [16]	TERC	Синтез теломер	Большинство эукариот
Сплайсинговые лидерные РНК [17]	SL RNA	Транс-сплайсинг мРНК, процессинг РНК	Низшие эукариоты
<i>Регуляторные РНК</i>			
Антисмысловые РНК [18]	aRNA, asRNA	Деградиция/стабилизация мРНК, трансляция	Все организмы
Цис-природный антисмысловой транскрипт [19]	cis-NAT	Регуляция экспрессии генов	Некоторые эукариоты
Кластерные регулярные короткие палиндромные повторы РНК [20]	crRNA	Устойчивость к паразитам, вероятно, таргетинг их ДНК	Бактерии и археи
Длинные некодирующие РНК [21]	lncRNA	Эпигенетическое регулирование транскрипции генов	Эукариоты
МикроРНК [22]	miRNA, microRNA	Регуляция экспрессии генов	Большинство эукариот
Взаимодействующие с белком Piwi РНК [23]	piRNA	Защита от транспозонов	Большинство животных
Малые интерферирующие РНК [24]	siRNA	Регуляция экспрессии генов	Большинство эукариот
Транс-активирующие малые интерферирующие РНК [25, 26]	tasiRNA	Регуляция экспрессии генов	Растения
Ассоциированные с повторами малые интерферирующие РНК [27]	gasiRNA	Защита от транспозонов	Насекомые
7SK РНК [28]	7SK	Негативно регулирует CDK9/cyclin T (регулирует клеточный цикл)	Эукариоты

Геном имеет модульную структуру из транскрибируемых локусов и участков некодирующих транскриптов. Крупномасштабные проекты, такие как FANTOM (определение функций кДНК млекопитающих), выявили примерно 35 000 некодирующих транскриптов, причем неожиданным оказалось обилие длинных нкРНК. Геном млекопитающих кодирует множество длинных, не кодирующих белки РНК (lncRNAs), которые играют важную роль в различных биологических процессах. Обычно lncRNA обнаруживаются в ядре и, в частности, в ассоциированных с хроматином фракциях [29]. В соответствии с их локализацией многие lncRNA связывают с регуляцией экспрессии генов и формированием трехмерной организации ядра. Многие lncRNA могут взаимодействовать с различными регуляторными белками и связывать их с определенными сайтами ДНК, регулируя экспрессию генов [30]. Хотя некоторые lncRNA обнаружены в интронах, большинство из них транскрибируются, захватывая участки смысловых и некодирующих последовательностей генов [31].

Роль lncRNA в регуляции геноспецифической транскрипции. Существует множество подтверждений того, что lncRNA участвуют в регуляции экспрессии различных генов. Первые доказательства этого получены благодаря исследованиям инактивации X-хромосомы млекопитающих, вследствие которой выключается одна из X-хромосом. В этот процесс вовлечена длинная нкРНК под названием Xist (X-inactive specific transcript), причем генетическая делеция Xist предотвращает инактивацию X-хромосомы, а индукции Xist достаточно, чтобы инициировать инактивацию именно той X-хромосомы, с которой Xist транскрибируется [32].

Классическим примером является также lncRNA, которая отвечает за регуляцию гена *Igfr2*, контролируя генетический импринтинг [33–35]. Кроме того, еще одна lncRNA – HOTAIR влияет на экспрессию генов кластера HoxD и других генов, имеющих разную локализацию в геноме [36, 37]. Недавние исследования показали, что большой процент lncRNA в клетке влияет на экспрессию генов, в том числе тех, которые участвуют в эмбриональном развитии [38–41], функционировании сердечной мышцы [42, 43], иммунном ответе [44], развитии онкопатологии [45–48]. На основании этих исследований были предложены различные модели регулирующих стратегий lncRNA, в том числе активации и репрессии генов в цис- [49] и транс-положении [50].

Показано, что длинные нкРНК могут взаимодействовать с некоторыми белками, в том числе участвующими в транскрипции. Что будет, если удалить часть этих белков? Ответ на этот вопрос напрямую связан с белковым комплексом под названием Mediator [51]. Длинные нкРНК связываются с этим комплексом в нескольких местах, и вместе они уже могут активировать другие гены. Некодирующие РНК с помощью Mediator влияют на активность ферментов, взаимодействующих с гистонами. При этом выстраивается такая цепочка: РНК связывается с Mediator, затем они вместе помогают раскрыть гистоновую упаковку ДНК и ДНК становится доступной для белков аппарата транскрипции. Интересно, что сам Mediator может связываться даже с удаленными энхансерными последовательностями в ДНК, которые располагаются на расстоянии в 100 тыс. нуклеотидов от активируемого гена. Таким образом, длинные нкРНК образуют что-то наподобие информационного мостика или петли между энхансером и нужным геном.

Роль lncRNA в посттранскрипционной регуляции. Кроме регуляции транскрипции lncRNA также контролируют различные этапы посттранскрипционного процессинга мРНК. Как и у микроРНК, эти функции часто связаны с присоединением к комплементарной последовательности мРНК-мишени. Формирование РНК-дуплексов между комплементарными lncRNA и мРНК может рассматриваться как ключевой момент, необходимый для связывания транс-действующих факторов, влияющих на трансляцию мРНК (в том числе на сплайсинг, транспорт и деградацию).

Роль lncRNA в инактивации X-хромосомы. В инактивации одной из двух X-хромосом у млекопитающих участвует длинная нкРНК – Xist (молекула РНК, состоящая из 17 тыс. нуклеотидных остатков) [52]. Распределяясь по хромосоме, эта РНК одним из своих доменов связывается с белковым комплексом PRC2, обуславливая его взаимодействие с участками, где гены должны быть инактивированы. Этот комплекс, в свою очередь, модифицирует гистоны: присоединяет к ним в определенных местах метильные группы, инактивируя таким образом гены. В ряде работ показано, что для распределения по X-хромосоме Xist использует несколько разных доменов [53–55]. Кроме того, для распределения нужно, чтобы эта РНК взаимодействовала с белками, ассоцииро-

ванными с ядерным матриксом. Авторы также решили выяснить, в каких местах X-хромосома оказывается Xist, когда хромосома инактивируется. Оказалось, что Xist распределена по всей X-хромосоме, за исключением генов, работающих при ее инактивации. В участках нахождения Xist есть следы работы белкового комплекса, используемого Xist для выключения генов путем метилирования гистонов.

Молекулы РНК Xist распределяются по хромосоме спустя некоторое время после начала транскрипции: через 1 ч молекулы Xist находятся лишь в области кодирующего ее гена, через 3 ч они уже распределены по всей X-хромосоме, а через 6 ч окутывают хромосому почти целиком. Обнаружено также, что через какое-то время после начала транскрипции большая часть молекул Xist сосредотачивается в определенных участках хромосомы, скапливаясь там перед тем, как распространиться по всей хромосоме. При этом последовательность ДНК в этих участках хромосом не содержит каких-либо специфических элементов.

Эти факты позволили успешно провести важный эксперимент: исследователи встроили ген Xist в 21-ю хромосому (лишняя хромосома, встречающаяся при синдроме Дауна), и она инактивировалась. Пока результат получен только на культуре клеток, что, однако, не исключает возможности применения данного открытия в практической медицине [56].

Роль lncRNA в развитии онкопатологии и некоторых других заболеваний. Анализ экспрессии генов опухолевых и нормальных клеток выявил изменения в экспрессии lncRNA при нескольких формах рака. Например, при опухоли простаты одной из двух сверхэкспрессирующихся РНК была lncRNA – PCGEM1, коррелирующая с повышенной пролиферацией и образованием колоний, что предполагает ее участие в регуляции роста клеток [57]. MALAT1 (известный так же как NEAT2) был впервые обнаружен как lncRNA, активирующаяся во время метастазирования на ранних стадиях немелкоклеточного рака легкого, и его избыточная экспрессия является ранним прогностическим маркером для пациентов [57]. Несмотря на то что ряд lncRNA аномально экспрессируются при раке, их функции и потенциальная роль в опухолеобразовании почти не изучены. Например, lncRNA His-1 вовлечена в процесс онкогенеза и контроля роста, но их функция в нормальных клетках неизвестна. В дополнение к роли при развитии онкологических заболеваний lncRNA также демонстрируют аномальную экспрессию при других болезненных состояниях. Избыточная экспрессия PRINS связана с восприимчивостью к псориазу: в участках эпидермиса, пораженных псориазом, по сравнению с участками, не имеющими признаков поражения, экспрессия PRINS повышается [58]. Изучение их экспрессии показало, что многие расшифрованные участки ДНК, которые не кодируют белки, по-разному экспрессируются на различных стадиях онкозаболеваний у человека [59]. Анализ хронического лимфолейкоза, колоректального рака и гепатоцеллюлярной карциномы выявил, что все три типа рака имеют похожие профили экспрессии lncRNA по сравнению с нормальными клетками. Дальнейший анализ одной из lncRNA показал, что она вела себя как онкоген, блокируя апоптоз и приводя к увеличению числа злокачественных клеток [59]. Вполне вероятно, что эти lncRNA, проявляющие аномальный уровень экспрессии при онкотрансформации, выполняют важные функции на ранних этапах эмбриогенеза.

Исследования одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), ассоциированных с болезненными состояниями, показали, что locus восприимчивости к инфаркту миокарда связан с lncRNA, названной Miat [60]. Кроме того, геномные исследования выявили ассоциированный с болезнью коронарной артерии вариант lncRNA – ANRIL, который также экспрессируется в тканях, пораженных атеросклерозом, и с изменением его экспрессии связан гаплотип высокого риска ишемической болезни сердца. Аналогичным образом антисмысловая lncRNA, регулирующая экспрессию смысловой цепи гена *BACE1*, важного фермента этиологии болезни Альцгеймера, имеет повышенную экспрессию в нескольких областях мозга у лиц с указанным заболеванием.

Роль lncRNA в регуляции длины теломер. Теломеры – участки нуклеопротеинового комплекса на концах хромосом млекопитающих. Они имеют важное значение для поддержания стабильности генома, участвуют в репликативном старении и играют центральную роль при таких заболеваниях, как рак. Теломеры уже давно считались транскрипционно инертными ДНК-белковыми комплексами, пока не было установлено, что с них могут транскрибироваться теломерные РНК [61] или содержащие теломерные повторы РНК [62]. Эти нкРНК неоднородны по длине, транскриби-

руются с нескольких субтеломерных локусов. Образование комплекса их с хроматином подавляется SMG белками, которые защищают концы хромосом от укорачивания. Это предполагает участие SMG в регуляции длины теломер [62]. Кроме того, TelRNA подавляют активность теломеразы в опытах *in vitro* и, следовательно, могут участвовать в регуляции активности теломеразы [61].

Роль lncRNA в тканях нервной системы. Во время выполнения проекта GENCODE проведены сопоставление и анализ последовательностей lncRNA человека и их локализации в геноме, модификации и разницы профилей экспрессии в тканях. В результате обнаружено, что в тканях мозга и центральной нервной системы экспрессируется большее количество lncRNA, чем в ткани любого другого типа [63].

Другое исследование выявило, что конститутивно экспрессирующихся lncRNA не так много, и их меньше, чем конститутивно экспрессирующихся мРНК, а также что экспрессия lncRNA более разнообразна в разных областях мозга [64].

Одним из примеров lncRNA, участвующей в регуляции работы нервной системы, является TUNA – эволюционно консервативный транскрипт, способствующий поддержанию пролиферативной способности нейрональных стволовых клеток. TUNA расположен на 12-й хромосоме, транскрибируется в противоположном направлении к Tel1 и локализуется в ядре и цитоплазме. TUNA повышено экспрессируется в центральной нервной системе позвоночных и играет роль во время дифференциации нейрональной ткани. Нокдаун TUNA приводит к неспособности эмбриональных клеток мыши к дифференцировке. Следует отметить, что TUNA экспрессируется на высоком уровне в таламусе и полосатом теле в человеческом мозге и может играть определенную роль в патофизиологии болезни Хантингтона. TUNA активирует транскрипцию генов плюрипотентности и играет важную роль в нейральной дифференцировке эмбриональных стволовых клеток у позвоночных животных [65].

Заключение. Таким образом, lncRNA лежат в основе тонкой регуляции сложных генных сетей на уровне эпигенетических изменений, транскрипции и посттранскрипционных преобразований, передавая и координируя информационные потоки, необходимые для функционирования сигнальных путей эукариотических клеток.

Список использованных источников

1. Mattick, J. S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity / J. S. Mattick // *EMBO Rep.* – 2001. – Vol. 2, N 11. – P. 986–991.
2. Perkel, J. M. Visiting “noncodarnia” / J. M. Perkel // *BioTechniques.* – 2013. – Vol. 54, N 6. – P. 301, 303–304.
3. Lafontaine, D. L. Ribosomal RNA / D. L. Lafontaine, D. Tollervy [Electronic resource] / Wiley Online Library. – 2001. – Mode of access: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000877/abstract>. – Date of access: 19.04.2017.
4. Ullu, E. Alu sequences are processed 7SL RNA genes / E. Ullu, C. Tschudi // *Nature.* – 1984. – Vol. 312, N 5990. – P. 171–172.
5. Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes / S. J. Sharp [et al.] // *CRC Critical Rev. Biochem.* – 1985. – Vol. 19, N 2. – P. 107–144.
6. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system / S. Gottesman [et al.] // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12, N 9. – P. 1338–1347.
7. Hadjiolov, A. A. Ribonucleic acids fractionation by density-gradient centrifugation and by agar gel electrophoresis: a comparison / A. A. Hadjiolov, P. V. Venkov, R. G. Tsanev // *Anal. Biochem.* – 1966. – Vol. 17, N 2. – P. 263–267.
8. Maden, B. E. Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem / B. E. Maden, J. M. Hughes // *Chromosoma.* – 1997. – Vol. 105, N 7–8. – P. 391–400.
9. Sno/scaRNAbase: a curated database for small nucleolar RNAs and cajal body-specific RNAs / J. Xie [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35, Suppl. 1 (Database issue). – P. D183–D187.
10. A survey of nematode SmY RNAs / T. A. Jones [et al.] // *RNA Biol.* – 2009. – Vol. 6, N 1. – P. 5–8.
11. Jády, B. E. A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA / B. E. Jády, T. Kiss // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20, N 3. – P. 541–551.
12. Kinetoplastid RNA editing: complexes and catalysts / K. Stuart [et al.] // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1997. – Vol. 1, N 3. – P. 340–346.
13. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme / C. Guerrier-Takada [et al.] // *Cell.* – 1983. – Vol. 35, N 3, pt. 2. – P. 849–857.
14. Kiss, T. 7-2/MRP RNAs in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus / T. Kiss, C. Marshallsay, W. Filipowicz // *EMBO J.* – 1992. – Vol. 11, N 10. – P. 3737–3746.
15. Hall, A. E. Y RNAs: recent developments / A. E. Hall, C. Turnbull, T. Dalmay // *Biomol. Concepts.* – 2013. – Vol. 4, N 2. – P. 103–110.

16. The RNA component of human telomerase / J. Feng [et al.] // *Science*. – 1995. – Vol. 269, N 5228. – P. 1236–1241.
17. Dassanayake, R. S. Trans-spliced leader RNA, 5S-rRNA genes and novel variant orphan spliced-leader of the lymphatic filarial nematode *Wuchereria bancrofti*, and a sensitive polymerase chain reaction based detection assay / R. S. Dassanayake, N. V. Chandrasekharan, E. H. Karunanayake // *Gene*. – 2001. – Vol. 269, N 1–2. – P. 185–193.
18. Mizuno, T. A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA) / T. Mizuno, M. Y. Chou, M. Inouye // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1984. – Vol. 81, N 7. – P. 1966–1970.
19. Transcriptional interferences in cis natural antisense transcripts of humans and mice / N. Osato [et al.] // *Genetics*. – 2007. – Vol. 176, N 12. – P. 1299–1306.
20. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III / E. Deltcheva [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 471, N 7340. – P. 602–607.
21. Ma, L. On the classification of long non-coding RNAs / L. Ma, V. B. Bajic, Z. Zhang // *RNA Biol*. – 2014. – Vol. 10, N 6. – P. 924–933.
22. Chen, K. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs / K. Chen, N. Rajewsky // *Nat. Rev. Genet*. – 2007. – Vol. 8, N 2. – P. 93–103.
23. Seto, A. G. The coming of age for Piwi proteins / A. G. Seto, R. E. Kingston, N. C. Lau // *Mol. Cell*. – 2007. – Vol. 26, N 5. – P. 603–609.
24. Kim, V. N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function / V. N. Kim // *Mol. and Cells*. – 2005. – Vol. 19, N 1. – P. 1–15.
25. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs / F. Vazquez [et al.] // *Mol. Cell*. – 2004. – Vol. 16, N 1. – P. 69–79.
26. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis* / A. Peragine [et al.] // *Genes and Dev*. – 2004. – Vol. 18, N 19. – P. 2368–2379.
27. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline / A. A. Aravin [et al.] // *Curr. Biol*. – 2001. – Vol. 11, N 13. – P. 1017–1027.
28. Diribarne, G. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor / G. Diribarne, O. Bensaude // *RNA Biol*. – 2009. – Vol. 6, N 2. – P. 122–128.
29. Francia, S. Non-coding RNA: Sequence-specific guide for chromatin modification and DNA damage signaling / S. Francia // *Front. Genet*. – 2015. – Vol. 6. – P. 320.
30. Quinodoz, S. Long non-coding RNAs: An emerging link between gene regulation and nuclear organization / S. Quinodoz, M. Guttman // *Trends Cell Biol*. – 2014. – Vol. 24, N 11. – P. 651–663.
31. Kapranov, P. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization / P. Kapranov, A. T. Willingham, T. R. Gingeras // *Nat. Rev. Genet*. – 2007. – Vol. 8, N 6. – P. 413–423.
32. Expression of Xist RNA is sufficient to initiate macrochromatin body formation / T. P. Rasmussen [et al.] // *Chromosoma*. – 2001. – Vol. 110, N 6. – P. 411–420.
33. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment / C. A. Klattenhoff [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 152, N 3. – P. 570–583.
34. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin / T. Nagano [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 322, N 5908. – P. 1717–1720.
35. Neuron-specific relaxation of *Igf2r* imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript Air / Y. Yamasaki [et al.] // *Hum. Mol. Genet*. – 2005. – Vol. 14, N 17. – P. 2511–2520.
36. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis / R. A. Gupta [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464. – P. 1071–1076.
37. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions / C. Chu [et al.] // *Mol. Cell*. – 2011. – Vol. 344, N 4. – P. 667–678.
38. LincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation / M. Guttman [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 477, N 7364. – P. 295–300.
39. Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development / M. Sauvageau [et al.] // *Elife*. – 2013. – Vol. 2. – e01749.
40. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution / I. Ulitsky [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 147, N 7. – P. 1537–1550.
41. Kulinski, T. M. Imprinted silencing is extended over broad chromosomal domains in mouse extra-embryonic lineages / T. M. Kulinski, D. P. Barlow, Q. J. Hudson // *Curr. Opin. Cell. Biol*. – 2013. – Vol. 25, N 3. – P. 297–304.
42. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes / S. Carpenter [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 341, N 6147. – P. 789–792.
43. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy / P. Han [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 514, N 7520. – P. 102–106.
44. The STAT3-binding long noncoding RNA *lnc-DC* controls human dendritic cell differentiation / P. Wang [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 344, N 6181. – P. 310–313.
45. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells / T. Gutschner [et al.] // *Cancer Res*. – 2013. – Vol. 73, N 3. – P. 1180–1189.
46. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response / M. Huarte [et al.] // *Cell*. – 2010. – Vol. 142, N 3. – P. 409–419.
47. Genome-wide mapping and characterization of notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia / T. Trimarchi [et al.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 158, N 3. – P. 593–606.

48. LncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs / L. Yang [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 500, N 7464. – P. 598–602.
49. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression / K. C. Wang [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 472, N 7341. – P. 120–124.
50. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs / J. L. Rinn [et al.] // *Cell*. – 2007. – Vol. 129, N 7. – P. 1311–1323.
51. Activating RNAs associate with mediator to enhance chromatin architecture and transcription / F. Lai [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 494, N 7438. – P. 497–501.
52. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation / K. Plath [et al.] // *Annu. Rev. Genet.* – 2002. – Vol. 36. – P. 233–278.
53. PNA interference mapping demonstrates functional domains in the noncoding RNA Xist / A. Beletskii [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol. 98, N 16. – P. 9215–9220.
54. Wutz, A. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA / A. Wutz, T. P. Rasmussen, R. Jaenisch // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 30, N 2. – P. 167–174.
55. Disruption of a conserved region of Xist exon 1 impairs Xist RNA localisation and X-linked gene silencing during random and imprinted X chromosome inactivation / C. E. Senner [et al.] // *Development*. – 2011. – Vol. 138, N 8. – P. 1541–1550.
56. Translating dosage compensation to trisomy 21 / J. Jiang [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 500. – P. 296–300.
57. Regulation of apoptosis by a prostate-specific and prostate cancer-associated noncoding gene, PCGEM1 / X. Fu [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2006. – Vol. 25, N 3. – P. 135–141.
58. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS / E. Sonkoly [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, N 25. – P. 24159–24167.
59. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas / G. A. Calin [et al.] // *Cancer Cell*. – 2007. – Vol. 12, N 3. – P. 215–229.
60. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction / N. Ishii [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 51, N 12. – P. 1087–1099.
61. Schoeftner, S. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II / S. Schoeftner, M. A. Blasco // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 10, N 2. – P. 228–236.
62. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends / C. M. Azzalin [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 318, N 5851. – P. 798–801.
63. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression / T. Derrien [et al.] // *Genome Res.* – 2012. – Vol. 22, N 9. – P. 1775–1789.
64. RNA sequencing of transcriptomes in human brain regions: protein-coding and non-coding RNAs, isoforms and alleles / A. Webb [et al.] // *BMC Genomics*. – 2015. – Vol. 16. – P. 990.
65. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment / N. Lin [et al.] // *Mol. Cell*. – 2014. – Vol. 53, N 6. – P. 1005–1019.

References

1. Mattick J. S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports*, 2001, vol. 2, no. 11, pp. 986–991. DOI: 10.1093/embo-reports/kve230
2. Perkel J. M. Visiting “noncodarnia”. *BioTechniques*, 2013, vol. 54, no. 6, pp. 301, 303–304. DOI: 10.2144/000114037
3. Lafontaine D. L., Tollervey D. *Ribosomal RNA*. *Wiley Online Library*, 2001. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000877/abstract> (accessed 19 April 2017).
4. Ullu E., Tschudi C. Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature*, 1984, vol. 312, no. 5990, pp. 171–172. DOI: 10.1038/312171a0
5. Sharp S. J., Schaack J., Cooley L., Burke D. J., Söll D. Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 1985, vol. 19, no. 2, pp. 107–144. DOI: 10.3109/10409238509082541
6. Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R. T. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes and Development*, 1998, vol. 12, no. 9, pp. 1338–1347.
7. Hadjiolov A. A., Venkov P. V., Tsanev R. G. Ribonucleic acids fractionation by density-gradient centrifugation and by agar gel electrophoresis: a comparison. *Analytical Biochemistry*, 1966, vol. 17, no. 2, pp. 263–267. DOI: 10.1016/0003-2697(66)90204-1
8. Maden B. E., Hughes J. M. Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma*, 1997, vol. 105, no. 7–8, pp. 391–400.
9. Xie J., Zhang M., Zhou T., Hua X., Tang L., Wu W. Sno/scaRNAbase: a curated database for small nucleolar RNAs and cajal body-specific RNAs. *Nucleic Acids Research*, 2007, vol. 35, suppl. 1 (database issue), pp. 183–187. DOI: 10.1093/nar/gkl873
10. Jones T. A., Otto W., Marz M., Eddy S. R., Stadler P. F. A survey of nematode SmY RNAs. *RNA Biology*, 2009, vol. 6, no. 1, pp. 5–8.
11. Jády B. E., Kiss T. A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *The EMBO journal*, 2001, vol. 20, no. 3, pp. 541–551. DOI: 10.1093/emboj/20.3.541
12. Stuart K., Allen T. E., Kable M. L., Lawson S. Kinetoplastid RNA editing: complexes and catalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1997, vol. 1, no. 3, pp. 340–346.
13. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 1983, vol. 35, no. 3, pt 2, pp. 849–857. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90117-4

14. Kiss T., Marshallsay C., Filipowicz W. 7-2/MRP RNAs in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus. *The EMBO journal*, 1992, vol. 11, no. 10, pp. 3737–3746.
15. Hall A. E., Turnbull C., Dalmay T. Y RNAs: recent developments. *Biomolecular concepts*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 103–110. DOI: 10.1515/bmc-2012-0050
16. Feng J., Funk W. D., Wang S. S., Weinrich S. L., Avilion A. A., Chiu C. P., Adams R. R., Chang E., Allsopp R. C., Yu J., et al. The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995, vol. 269, no. 5228, pp. 1236–1241. DOI: 10.1126/science.7544491
17. Dassanayake R. S., Chandrasekharan N. V., Karunanayake E. H. Trans-spliced leader RNA, 5S-rRNA genes and novel variant orphan spliced-leader of the lymphatic filarial nematode *Wuchereria bancrofti*, and a sensitive polymerase chain reaction based detection assay. *Gene*, 2001, vol. 269, no. 1–2, pp. 185–193. DOI: 10.1016/S0378-1119(01)00438-3
18. Mizuno T., Chou M. Y., Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, vol. 81, no. 7, pp. 1966–1970. DOI: 10.1073/pnas.81.7.1966
19. Osato N., Suzuki Y., Ikeo K., Gojobori T. Transcriptional interferences in cis natural antisense transcripts of humans and mice. *Genetics*, 2007, vol. 176, no. 12, pp. 1299–1306. DOI: 10.1534/genetics.106.069484
20. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M. R., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, vol. 471, no. 7340, pp. 602–607. DOI: 10.1038/nature09886
21. Ma L., Bajic V. B., Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*, 2014, vol. 10, no. 6, pp. 924–933. DOI: 10.4161/rna.24604.
22. Chen K., Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature reviews. Genetics*, 2007, vol. 8, no. 2, pp. 93–103. DOI: 10.1038/nrg1990
23. Seto A. G., Kingston R. E., Lau N. C. The coming of age for Piwi proteins. *Molecular Cell*, 2007, vol. 26, no. 5, pp. 603–609. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.021
24. Kim V. N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules and Cells*, 2005, vol. 19, no. 1, pp. 1–15.
25. Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Lepers C., Gasciolli V., Mallory A. C., Hilbert J. L., Bartel D. P., Crété P. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular Cell*, 2004, vol. 16, no. 1, pp. 69–79. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.09.028
26. Peragine A., Yoshikawa M., Wu G., Albrecht H. L., Poethig R. S. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes and Development*, 2004, vol. 18, no. 19, pp. 2368–2379. DOI: 10.1101/gad.1231804
27. Aravin A. A., Naumova N. M., Tulin A. V., Vagin V. V., Rozovsky Y. M., Gvozdev V. A. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology: CB*, 2001, vol. 11, no. 13, pp. 1017–1027.
28. Diribarne G., Bensaude O. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biology*, 2009, vol. 6, no. 2, pp. 122–128.
29. Francia S. Non-coding RNA: Sequence-specific guide for chromatin modification and DNA damage signaling. *Frontiers in Genetics*, 2015, vol. 6, p. 320. DOI: 10.3389/fgene.2015.00320
30. Quinodoz S., Guttman M. Long non-coding RNAs: An emerging link between gene regulation and nuclear organization. *Trends in Cell Biology*, 2014, vol. 24, no. 11, pp. 651–663. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.08.009
31. Kapranov P., Willingham A. T., Gingeras T. R. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nature reviews. Genetics*, 2007, vol. 8, no. 6, pp. 413–423. DOI: 10.1038/nrg2083
32. Rasmussen T. P., Wutz A. P., Pehrson J. R., Jaenisch R. R. Expression of Xist RNA is sufficient to initiate macrochromatin body formation. *Chromosoma*, 2001, vol. 110, no. 6, pp. 411–420. DOI: 10.1007/s004120100158
33. Klattenhoff C. A., Scheuermann J. C., Surface L. E., Bradley R. K., Fields P. A., Steinhauser M. L., Ding H., Butty V. L., Torrey L., Haas S., Abo R., Tabebordbar M., Lee R. T., Burge C. B., Boyer L. A. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 2013, vol. 152, no. 3, pp. 570–583. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.003
34. Nagano T., Mitchell J. A., Sanz L. A., Pauley F. M., Ferguson-Smith A. C., Feil R., Fraser P. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science*, 2008, vol. 322, no. 5908, pp. 1717–1720. DOI: 10.1126/science.1163802
35. Yamasaki Y., Kayashima T., Soejima H., Kinoshita A., Yoshiura K., Matsumoto N., Ohta T., Urano T., Masuzaki H., Ishimaru T., Mukai T., Niikawa N., Kishino T. Neuron-specific relaxation of Igf2r imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript Air. *Human Molecular Genetics*, 2005, vol. 14, no. 17, pp. 2511–2520. DOI: 10.1093/hmg/ddi255
36. Gupta R. A., Shah N., Wang K. C., Kim J., Horlings H. M., Wong D. J., Tsai M. C., Hung T., Argani P., Rinn J. L., Wang Y., Brzoska P., Kong B., Li R., West R. B., van de Vijver M. J., Sukumar S., Chang H. Y. Long non-coding RNA reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7291, pp. 1071–1076. DOI: 10.1038/nature08975
37. Chu C., Qu K., Zhong F. L., Artandi S. E., Chang H. Y. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Molecular Cell*, 2011, vol. 344, no. 4, pp. 667–678. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.027
38. Guttman M., Donaghey J., Carey B. W., Garber M., Grenier J. K., Munson G., Young G., Lucas A. B., Ach R., Bruhn L., Yang X., Amit I., Meissner A., Regev A., Rinn J. L., Root D. E., Lander E. S. LincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*, 2011, vol. 477, no. 7364, pp. 295–300. DOI: 10.1038/nature10398
39. Sauvageau M., Goff L. A., Lodato S., Bonev B., Groff A. F., Gerhardinger C., Sanchez-Gomez D. B., Hacisuleyman E., Li E., Spence M., Liapis S. C., Mallard W., Morse M., Swerdel M. R., D’Ecclesiss M. F., Moore J. C., Lai V., Gong G.,

Yancopoulos G. D., Frenthewey D., Kellis M., Hart R. P., Valenzuela D. M., Arlotta P., Rinn J. L. Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development. *Elife*, 2013, vol. 2, e01749. DOI: 10.7554/eLife.01749

40. Ulitsky I., Shkumatava A., Jan C. H., Sive H., Bartel D. P. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*, 2011, vol. 147, no. 7, pp. 1537–1550. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.055

41. Kulinski T. M., Barlow D. P., Hudson Q. J. Imprinted silencing is extended over broad chromosomal domains in mouse extra-embryonic lineages. *Current Opinion in Cell Biology*, 2013, vol. 25, no. 3, pp. 297–304. DOI: 10.1016/j.ccb.2013.02.012

42. Carpenter S., Aiello D., Atianand M. K., Ricci E. P., Gandhi P., Hall L. L., Byron M., Monks B., Henry-Bezy M., Lawrence J. B., O'Neill L. A., Moore M. J., Caffrey D. R., Fitzgerald K. A. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science*, 2013, vol. 341, no. 6147, pp. 789–792. DOI: 10.1126/science.1240925

43. Han P., Li W., Lin C. H., Yang J., Shang C., Nurnberg S. T., Jin K. K., Xu W., Lin C. Y., Lin C. J., Xiong Y., Chien H. C., Zhou B., Ashley E., Bernstein D., Chen P. S., Chen H. S., Quertermous T., Chang C. P. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*, 2014, vol. 514, no. 7520, pp. 102–106. DOI: 10.1038/nature13596

44. Wang P., Xue Y., Han Y., Lin L., Wu C., Xu S., Jiang Z., Xu J., Liu Q., Cao X. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science*, 2014, vol. 344, no. 6181, pp. 310–313. DOI: 10.1126/science.1251456

45. Gutschner T., Hämmerle M., Eissmann M., Hsu J., Kim Y., Hung G., Revenko A., Arun G., Stentrup M., Gross M., Zörnig M., MacLeod A. R., Spector D. L., Diederichs S. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Research*, 2013, vol. 73, no. 3, pp. 1180–1189. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850

46. Huarte M., Guttman M., Feldser D., Garber M., Koziol M. J., Kenzelmann-Broz D., Khalil A. M., Zuk O., Amit I., Rabani M., Attardi L. D., Regev A., Lander E. S., Jacks T., Rinn J. L. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 2010, vol. 142, no. 3, pp. 409–419. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.040

47. Trimarchi T., Bilal E., Ntziachristos P., Fabbri G., Dalla-Favera R., Tsirigos A., Aifantis I. Genome-wide mapping and characterization of notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell*, 2014, vol. 158, no. 3, pp. 593–606. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.049

48. Yang L., Lin C., Jin C., Yang J. C., Tanasa B., Li W., Merkurjev D., Ohgi K. A., Meng D., Zhang J., Evans C. P., Rosenfeld M. G. LncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature*, 2013, vol. 500, no. 7464, pp. 598–602. DOI: 10.1038/nature12451

49. Wang K. C., Yang Y. W., Liu B., Sanyal A., Corces-Zimmerman R., Chen Y., Lajoie B. R., Protacio A., Flynn R. A., Gupta R. A., Wysocka J., Lei M., Dekker J., Helms J. A., Chang H. Y. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, 2011, vol. 472, no. 7341, pp. 120–124. DOI: 10.1038/nature09819

50. Rinn J. L., Kertesz M., Wang J. K., Squazzo S. L., Xu X., Bruggmann S. A., Goodnough L. H., Helms J. A., Farnham P. J., Segal E., Chang H. Y. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 7, pp. 1311–1323. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022

51. Lai F., Orom U. A., Cesaroni M., Beringer M., Taatjes D. J., Blobel G. A., Shiekhattar R. Activating RNAs associate with mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature*, 2013, vol. 494, no. 7438, pp. 497–501. DOI: 10.1038/nature11884

52. Plath K., Mlynarczyk-Evans S., Nusinow D. A., Panning B. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annual Review of Genetics*, 2002, vol. 36, pp. 233–278. DOI: 10.1146/annurev.genet.36.042902.092433

53. Beletskii A., Hong Y. K., Pehrson J., Egholm M., Strauss W. M. PNA interference mapping demonstrates functional domains in the noncoding RNA Xist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, no. 16, pp. 9215–9220. DOI: 10.1073/pnas.161173098

54. Wutz A., Rasmussen T. P., Jaenisch R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. *Nature Genetics*, 2002, vol. 30, no. 2, pp. 167–174. DOI: 10.1038/ng820

55. Senner C. E., Nesterova T. B., Norton S., Dewchand H., Godwin J., Mak W., Brockdorff N. Disruption of a conserved region of Xist exon 1 impairs Xist RNA localisation and X-linked gene silencing during random and imprinted X chromosome inactivation. *Development*, 2011, vol. 138, no. 8, pp. 1541–1550. DOI: 10.1242/dev.056812

56. Jiang J., Jing Y., Cost G. J., Chiang J. C., Kolpa H. J., Cotton A. M., Carone D. M., Carone B. R., Shivak D. A., Guschin D. Y., Pearl J. R., Rebar E. J., Byron M., Gregory P. D., Brown C. J., Urnov F. D., Hall L. L., Lawrence J. B. Translating dosage compensation to trisomy 21. *Nature*, 2013, vol. 500, no. 7462, pp. 296–300. DOI: 10.1038/nature12394

57. Fu X., Ravindranath L., Tran N., Petrovics G., Srivastava S. Regulation of apoptosis by a prostate-specific and prostate cancer-associated noncoding gene, PCGEM1. *DNA and Cell Biology*, 2006, vol. 25, no. 3, pp. 135–141. DOI: 10.1089/dna.2006.25.135

58. Sonkoly E., Bata-Csorgo Z., Pivarcsi A., Polyanka H., Kenderessy-Szabo A., Molnar G., Szentpali K., Bari L., Megyeri K., Mandi Y., Dobozy A., Kemeny L., Szell M. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 25, pp. 24159–24167. DOI: 10.1074/jbc.M501704200

59. Calin G. A., Liu C. G., Ferracin M., Hyslop T., Spizzo R., Sevignani C., Fabbri M., Cimmino A., Lee E. J., Wojcik S. E., Shimizu M., Tili E., Rossi S., Taccioli C., Pichiorri F., Liu X., Zupo S., Herlea V., Gramantieri L., Lanza G., Alder H., Rassenti L., Volinia S., Schmittgen T. D., Kipps T. J., Negrini M., Croce C. M. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*, 2007, vol. 12, no. 3, pp. 215–229. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.07.027

60. Ishii N., Ozaki K., Sato H., Mizuno H., Saito S., Takahashi A., Miyamoto Y., Ikegawa S., Kamatani N., Hori M., Saito S., Nakamura Y., Tanaka T. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *Journal of Human Genetics*, 2006, vol. 51, no. 12, pp. 1087–1099. DOI: 10.1007/s10038-006-0070-9

61. Schoeftner S., Blasco M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology*, 2008, vol. 10, no. 2, pp. 228–236. DOI: 10.1038/ncb1685

62. Azzalin C. M., Reichenbach P., Khoraiuli L., Giulotto E., Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, 2015, vol. 318, no. 5851, pp. 798–801. DOI: 10.1126/science.1147182

63. Derrien T., Johnson R., Bussotti G., Tanzer A., Djebali S., Tilgner H., Guernec G., Martin D., Merkel A., Knowles D. G., Lagarde J., Veeravalli L., Ruan X., Ruan Y., Lassmann T., Carninci P., Brown J. B., Lipovich L., Gonzalez J. M., Thomas M., Davis C. A., Shiekhattar R., Gingeras T. R., Hubbard T. J., Notredame C., Harrow J., Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 2012, vol. 22, no. 9, pp. 1775–1789. DOI: 10.1101/gr.132159.111

64. Webb A., Papp A. C., Curtis A., Newman L. C., Pietrzak M., Seweryn M., Handelman S. K., Rempala G. A., Wang D., Graziosa E., Tyndale R. F., Lerman C., Kelsoe J. R., Mash D. C., Sadee W. RNA sequencing of transcriptomes in human brain regions: protein-coding and non-coding RNAs, isoforms and alleles. *BMC Genomics*, 2015, vol. 16, p. 990. DOI: 10.1186/s12864-015-2207-8

65. Lin N., Chang K. Y., Li Z., Gates K., Rana Z. A., Dang J., Zhang D., Han T., Yang C. S., Cunningham T. J., Head S. R., Duester G., Dong P. D., Rana T. M. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Molecular Cell*, 2014, vol. 53, no. 6, pp. 1005–1019. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.021

Інфармацыя аб аўтарах

Балашенка Ніна Александровна – магистр біол. навук, аспірант. Інстытут генетыкі і цыталогіі НАН Беларусі (ул. Акадэміцкая, 27, 220072, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: ninabalashenko@tut.by.

Дромашко Сергей Евгеньевич – д-р біол. навук, прафесар, заведуючы лабараторыяй. Інстытут генетыкі і цыталогіі НАН Беларусі (ул. Акадэміцкая, 27, 220072, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: s.dromashko@igc.by.

Information about the authors

Nina A. Balashenko – Master of Biology, Postgraduate student. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ninabalashenko@tut.by.

Sergey E. Dromashko – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: s.dromashko@igc.by.

А. П. Яцына

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

ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ И ИНСЕРАЦИЯ БЕЛОРУССКИХ ОБРАЗЦОВ ЛИШАЙНИКОВ ПЕРВОЙ ЧЕТВЕРТИ XX в. В ГЕРБАРИИ БОТАНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА им. В. Л. КОМАРОВА РАН (LE)

Аннотация. Гербарий является основным инструментом изучения биологического разнообразия и надежным источником информации при систематической обработке видов любой территории. В связи с этим инвентаризация белорусских гербарных образцов первой четверти XX в. позволит дополнить фундаментальный труд «Флора лишайников Беларуси».

Объектами исследования служили белорусские гербарные образцы, хранящиеся в коллекции лишайников лаборатории лихенологии и бриологии Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук. В результате ревизии белорусских образцов в лихенологическом гербарии (LE) установлено общее количество гербарных пакетов – 1502, относящихся к 260 видам лишайников и близкородственных грибов. На территории Беларуси виды собраны из 67 локалитетов, 4 областей и 31 административного района. Наибольшее число гербарных пакетов собрал В. П. Савич – 839. Впервые для лихенобиоты Беларуси приводятся 4 новых вида: лишайники *Biatora helvola* и *Leptogium teretiusculum*, лихенофильные грибы *Abrothallus peyritschii* и *Plectocarpon lichenum*. В ходе инвентаризации гербарных сборов лишайников первой четверти XX в. выявлено 25 новых локалитетов 11 видов лишайников, занесенных в 4-е издание Красной книги Беларуси. Полученные сведения позволят уточнить и дополнить данные о распространении видов в пределах Беларуси.

Ключевые слова: лишайник, гербарий, образец, биоразнообразие, Беларусь

Для цитирования: Яцына, А. П. Инвентаризация и инсерация белорусских образцов лишайников первой четверти XX в. в гербарии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE) / А. П. Яцына // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. навук. – 2017. – № 4. – С. 120–128.

A. P. Yatsyna

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

THE INVENTORY AND INSERATION BELARUSIAN LICHEN SAMPLES OF THE FIRST QUARTER OF THE XX CENTURY IN THE HERBARIUM OF THE BOTANICAL INSTITUTE V. L. KOMAROVA RAS (LE)

Abstract. Herbarium is the main tool in the study of biological diversity and reliable source of information for systematic processing species of any territory. In this regard, the inventory Belarusian herbarium specimens of the first quarter of the 20th century, will allow to start and complement the fundamental work «Flora of lichens Belarus»

The objects of study were Belarusian herbarium specimens stored in the collections of lichens laboratory lichenology and bryology BIN RAS. A result of processing in herbarium specimens lichenological herbarium (LE) found that the total number of samples is 1502, relating to 260 the lichen species and closely related fungi. On the territory of Belarus species collected from 67 localities, 4 regions and 31 administrative districts. The largest number of samples collected V. P. Savic – 839. For the first time Belarus are 4 new taxons, lichens: *Biatora helvola* and *Leptogium teretiusculum*, lichenicolous fungi: *Abrothallus peyritschii* and *Plectocarpon lichenum*. During the inventory of lichens first quarter of the 20th century herbarium collections found 25 new localities of 11 species of lichens recorded in the 4-th edition of the Red Book of Belarus. The data obtained clarify distribution of species within Belarus.

Keywords: lichen, herbarium, samples, biodiversity, Belarus

For citation: Yatsyna A. P. The inventory and inseration belarusian lichen samples of the first quarter of the XX century in the herbarium of the Botanical institute V. L. Komarova RAS (LE). *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 120–128 (in Russian).

Введение. История лихенологических исследований в Беларуси начинается с конца XVIII в. В период с 1901 по 1925 г. на территории современной республики работали известные российские ученые В. П. Савич, К. Г. Крейер, Л. И. Любичкая, А. Н. Данилов и др. Собранные ими гербарные образцы хранятся в гербарии лишайников лаборатории лихенологии и бриологии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE). В белорусских коллекциях количество гербарных образцов лишайников первой четверти XX в. исчисляется несколькими десятками. Часть белорусских гербарных материалов по лишайникам в гербарии (LE) представляли собой не обработанные учеными коллекции. Предварительный просмотр образцов показал, что они представляют значительный интерес для лихенобиоты республики. Так как гербарные образцы являются надежным источником информации о виде, инвентаризация гербарных образцов из Беларуси в гербарии (LE) позволит расширить и дополнить сведения о распространении лишайников в республике.

Цель работы – инвентаризация белорусских образцов лишайников, собранных в первой четверти XX в. и хранящихся в гербарии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE), как части лихенологических исследований в Беларуси.

Объекты и методы исследования. Работа по определению и инсерации гербарных образцов проходила по общепринятым методикам. При определении видов лишайников использовали бинокулярный микроскоп с 16–20-кратным увеличением, при изучении микроанатомических признаков объекта – микроскоп проходящего света с основным набором объективов ($\times 10$, $\times 40$, $\times 60$, $\times 100$). Изучение биохимических характеристик осуществляли с помощью ряда химических реактивов, в частности 10 %-ного раствора КОН. Гербарные образцы вводили в базу данных, которая разработана автором в Access, и каждому из них присваивали индивидуальный номер.

Результаты и их обсуждение. В результате ревизии белорусских образцов лишайников и близкородственных грибов в лихенологическом гербарии (LE) установлено общее количество гербарных пакетов – 1502, которые относятся к 260 видам лишайников и близкородственных грибов. Все обнаруженные нами гербарные пакеты, помещенные в основной фонд гербария (LE), имеют этикетки. В ходе инвентаризации и восстановления сведений белорусских образцов первой четверти XX в. установлены современные административные структуры (область, район, населенный пункт) их распространения в Беларуси – 4 области и 31 административный район. Наибольшее число образцов отмечено для Могилевской области – 507, Витебской – 381, Минской – 349 и Гомельской – 264. Один образец лишайника, найденный на территории НП «Беловежская пушта», идентифицировать по административным районам и областям не удалось, так как на его этикетке населенный пункт не был указан. Наибольшее число видов лишайников первой четверти XX в. выявлено в следующих районах: Осиповичский – 145 видов, Оршанский – 134, Минский – 97, Мозырский – 75, Речицкий – 46, Солигорский – 42. По одному виду обнаружено в Бобруйском, Городокском, Климовичском, Костюковичском, Крупском, Лиозненском, Пуховичском, Червенском и Шумилинском районах. Более 100 образцов собрано лихенологами в следующих годах: в 1923 г. – 366 образцов, в 1924 г. – 284, в 1925 г. – 213, в 1910 г. – 180, в 1909 г. – 150.

В результате обработки информации о современных местонахождениях видов лишайников и близкородственных грибов, собранных различными коллекторами в Беларуси в первой четверти XX в., установлено, что виды были собраны из 67 локалитетов.

Витебская область, *Городокский район*, окр. д. Веречье – 1; *Лепельский район*, окр. д. Пострежье – 2; *Лиозненский район*, окр. д. Заверино – 3; *Оршанский район*, окр. д. Бобромыновичи – 4, окр. д. Вязьмицы – 5, окр. д. Копысь – 6, окр. г. Орша – 7, окр. д. Новоселки – 8, окр. д. Репухово – 9, окр. д. Смоляны – 10, окр. д. Спасское – 11, окр. д. Субочево – 12, окр. д. Тюльпин – 13, окр. д. Шибки – 14; *Сенненский район*, окр. д. Завожанье – 15, окр. д. Каковчино – 16, окр. д. Некрашэво – 17, окр. д. Шупляки – 18; *Толочинский район*, окр. д. Комли – 19, окр. д. Лесино – 20; *Шумилинский район*, окр. д. Красомай – 21; *Ушачский район*, окр. д. Завечелье – 22.

Гомельская область, *Гомельский район*, г. Гомель – 23; *Добрушский район*, окр. г. Добруш – 24; *Калинковичский район*, окр. г. Калинковичи – 25; *Мозырский район*, окр. д. Булавки – 26, окр. г. Мозырь – 27, окр. д. Пеньки – 28; *Петриковский район*, окр. д. Дорошевичи – 29, окр. д. Петриков – 30; *Речицкий район*, окр. д. Василевичи – 31, окр. г. Речица – 32; *Рогачевский район*, окр. д. Озераны – 33, окр. г. Рогачев – 34, окр. д. Стрельники – 35, окр. д. Турск – 36.

Минская область, *Борисовский район*, окр. д. Дедиловичи – 37; *Крупский район*, окр. д. Королево – 38; *Минский район*, окр. д. Банцеровщина – 39, окр. д. Дворище – 40, окр. д. Заболотье – 41, окр. г. Минск – 42, окр. д. Прилуки – 43, окр. д. Самуэлево – 44, окр. д. Сёмково – 45; *Пуховичский район*, окр. г. Марьина Горка – 46; *Солигорский район*, окр. д. Листопадовичи – 47, окр. д. Старобин – 48; *Узденский район*, окр. д. Магильно – 49; *Червенский район*, окр. д. Заборье – 50.

Могилевская область, *Бобруйский район*, окр. г. Бобруйск – 51; *Быховский район*, окр. д. Грудиновка – 52; *Кировский район*, окр. д. Харлаповичи – 53; *Климовичский район*, окр. д. Тимоново – 54; *Костюковичский район*, окр. д. Большая Крапивня – 55; *Осиповичский район*, окр. д. Аминовичи – 56, окр. д. Дуброва – 57, окр. д. Корытное – 58, окр. д. Лапичи – 59, окр. д. Погорелое – 60, окр. д. Жорновка – 61, окр. д. Цель – 62, окр. д. Уборок – 63; *Могилевский район*, окр. г. Могилев – 64; *Чечерский район*, окр. д. Пильня – 65; *Шкловский район*, окр. д. Александрия – 66, окр. г. Шклов – 67.

Гербарные пакеты собраны 18 коллекторами, более 50 гербарных пакетов собрали В. П. Савич – 839, Г. К. Крейер – 382, Л. И. Любичкая – 149 и А. И. Беляева – 57. Далее приводится аннотированный список видов лишайников и близкородственных грибов, выявленных в ходе ревизии в гербарии (LE), после каждого таксона указано место сбора согласно перечню локалитетов. Новые виды для Беларуси обозначены (!), нелихенизированные грибы – (#), лихенофильные грибы – (*). Названия видов приводятся согласно [1].

(!*) *Abrothallus peyritschii* (Stein) Kotte

Беларусь, Могилевская область, Осиповичский район, окр. д. Погорелое. 29.07.1924 г. Coll. Савич В. П. 24.08.2016 г. Det. Яцына А. П. В лесу. Сухая ветка ели на таллеме *Vulpicida pinastri*. Herbarium LE.

Acarospora fuscata (Nyl.) Arnold – 22, 27.

Acrocordia gemmata (Ach.) A. Massal. – 48, 60, 61, 63.

Alyxoria varia (Pers.) Ertz & Tehler – 10, 43, 47, 59, 61.

Amandinea punctata (Hoffm.) Coppins & Scheid. – 7, 10, 23, 24, 43, 47, 60.

Anaptychia ciliaris (L.) Körb. ex A. Massal. – 22, 27, 43, 45, 47, 60.

Arthonia arthonioides (Ach.) A. L. Sm. – 47, 60, 61.

Arthonia byssacea (Weigel) Almq. – 31, 47, 56, 61.

Arthonia dispersa (Schrader) Nyl. – 44.

Arthonia punctiformis Ach. – 10, 27, 44.

Arthonia radiata (Pers.) Ach. – 10, 16, 27, 43, 44, 60, 61.

Arthonia vinosa Leight. – 47.

Arthrosporum populorum A. Massal. – 10.

Aspicilia cinerea (L.) Körb. – 16, 22.

Athallia cerinella (Nyl.) Arup, Frödén & Søchting – 27, 56, 61.

Athallia pyracea (Ach.) Arup et al. – 13, 22, 27, 61.

Bacidia bagliettoana (A. Massal. & De Not.) Jatta – 26.

Bacidia herbarum (E. Hepp) Arnold – 66.

Bacidia laurocerasi (Delise ex Duby) Zahlbr. – 10, 12, 13, 16, 22.

Bacidia polychroa (Th. Fr.) Körb. – 3, 61.

Bacidia rubella (Hoffm.) A. Massal. – 10, 25, 32, 33, 47, 60, 61.

Bacidia vermifera (Nyl.) Th. Fr. – 27.

Bacidina inundata (Fr.) Vězda – 10.

Bacidina phacodes (Körb.) Vězda – 66.

Bactrospora dryina (Ach.) A. Massal. – 60.

Baeomyces rufus (Huds.) Rabent. – 10, 42, 43.

(!) *Biatora helvola* Hellb.

Беларусь, Витебская область, Оршанский район, окр. д. Смольяны. 1910 г. Coll. Крейер Г. К. 28.07.2016 г. Det. Яцына А. П. На коре *Picea abies* (L.) Karst. Herbarium LE; окр. д. Субочево. 03.09.1909 г. Coll. Крейер Г. К. 28.07.2016 г. Det. Яцына А. П. На коре *Alnus incana* (L.) Moench. Herbarium LE.

Biatora ocelliformis (Nyl.) Arnold – 63.

- Bilimbia sabuletorum* (Schreb.) Arnold. – 10.
Brianaria sylvicola (Flot. ex Korb.) S. Ekman & M. Svensson – 6.
Brianaria tuberculata (Sommerf.) S. Ekman & M. Svensson – 27.
Bryoria capillaris (Ach.) Brodo & D. Hawksw. – 5, 9, 10, 27.
Bryoria fuscescens (Gyeln.) Brodo & D. Hawksw. – 9, 16, 27, 43.
Buellia disciformis (Fr.) Mudd – 60.
Buellia griseovirens (Turner & Borrer ex Sm) Alnb. – 31, 48.
Calicium adspersum Pers. – 60.
Calicium salicinum Pers. – 60, 61.
Calicium viride Pers. – 10, 43.
Calogaya decipiens (Arnold) Arup, Frödén & Søchting – 10, 23.
Caloplaca albolutescens (Nyl.) H.Olivier – 10.
Caloplaca cerina (Ehrh. ex Hedw.) Th. Fr. – 10, 26, 27, 47, 48, 56, 61.
Candelaria concolor (Dicks.) Stein – 27, 42.
Candelariella aurella (Hoffm.) Zahlbr. – 27, 44, 61.
Candelariella vitellina (Hoffm.) Müll. Arg. – 6, 10, 22, 27, 34, 57, 60.
Candelariella xanthostigma (Ach.) Lettau – 10, 31, 43, 59, 60, 61.
Catinaria atropurpurea (Schaer.) Vězda & Poelt – 27.
Cetraria aculeata (Schrad.) Fr. – 42.
Cetraria ericetorum Opiz – 6, 42, 64.
Cetraria islandica (L.) Ach. – 7, 8, 42, 47, 48, 51.
Cetraria sepincola (Ehrh.) Ach. – 10, 47, 48.
Cetrelia olivetorum (Nyl.) W. L. Culb. & C. F. Culb. – 10, 32, 43, 60, 61.
Chaenotheca chlorella (Ach.) Müll. Arg. – 60.
Chaenotheca chrysocephala (Turner ex Ach.) Th. Fr. – 10, 43, 60, 62.
Chaenotheca ferruginea (Turner ex Sm.) Mig. – 5, 42, 47, 60.
Chaenotheca furfuraceae (L.) Tibell – 11, 60.
Chaenotheca stemonea (Ach.) Müll. Arg. – 13, 60.
Chaenotheca trichialis (Ach.) Th. Fr. – 7, 14, 60, 62.
(#)*Chaenothecopsis nana* Tibell – 61.
Chrysothrix candelaris (L.) J.R. Laundon – 47, 60, 61.
Cladonia arbuscula (Wallr.) Hale & W. L. Culb. – 4, 16, 21, 31, 35, 42, 53, 60, 64, 65.
Cladonia botrytis (K. G. Hagen) Willd. – 10, 16, 31, 42, 61, 63.
Cladonia cariosa (Ach.) Spreng. – 42, 60.
Cladonia carneola (Fr.) Fr. – 42.
Cladonia cenotea (Ach.) E. A. Schaerer – 5, 13, 31, 42.
Cladonia cervicornis subsp. verticillata (Hoffm.) Ahti – 27, 42, 60.
Cladonia pyxidata (L.) Fr. – 60.
Cladonia coccifera (L.) Willd. – 2, 6, 25, 27, 42, 60.
Cladonia coniocraea (Flörke) Vain. – 6, 10, 16, 31, 42, 53, 60, 61, 64.
Cladonia cornuta (L.) Hoffm. – 13, 31, 42, 49, 61.
Cladonia crispata (Ach.) Flot. – 10, 13, 42, 31.
Cladonia deformis (L.) Hoffm. – 10, 31, 42, 64.
Cladonia digitata (L.) Hoffm. – 13, 16, 18, 42, 53, 61.
Cladonia floerkeana (Fr.) Sommerst. – 4, 31, 42.
Cladonia furcata (Huds.) Schrad. – 7, 10, 27, 31, 39, 42, 60.
Cladonia gracilis (L.) Willd. – 2, 10, 16, 25, 29, 31, 39, 42, 49, 55, 60.
Cladonia incrassata Flörke – 42.
Cladonia macilenta Hoffm. – 16, 17, 27, 31, 42, 60, 61.
Cladonia norvegica Tønsberg & Holien – 60.
Cladonia parasitica (Hoffm.) Hoffm. – 31, 60, 61.
Cladonia phyllophora Hoffm. – 10, 32, 42, 61.

- Cladonia rangiferina* (L.) Weber ex F. H. Wigg. – 2, 10, 16, 29, 30, 31, 42, 53, 60, 64.
Cladonia rei E. A. Schaerer – 16.
Cladonia stellaris (Opiz) Pouzar & Vězda – 16, 42, 50, 58.
Cladonia stygia (Fr.) Ruoss. – 1, 42.
Cladonia subulata (L.) F. Weber ex F. H. Wigg. – 60.
Cladonia turgida Ehrh. ex Hoffm. – 4, 65, 67.
Cladonia uncialis (L.) F. Weber ex F. H. Wigg. – 31.
Cliostomum corrugatum (Ach.) Fr. – 47.
Collema limosum (Ach.) Ach. – 43.
Collema tenax (Sw.) Ach. em. Degel. – 7, 10, 43.
Cresponea chloroconia (Tuck.) Egea & Torrente. – 7.
Cyphelium tigillare (Ach.) Ach. – 34.
Dibaeis baeomyces (L.) Rambold & Hertel – 42.
Diploschistes scruposus (Schreb.) Norman – 27.
Evernia divaricata (L.) Ach. – 10, 12, 60, 66.
Evernia mesomorpha Nyl. – 13, 25, 32, 61.
Evernia prunastri (L.) Ach. – 10, 12, 22, 24, 27, 28, 32, 42, 61, 64.
Fellhanera bouteillei (Desm.) Vězda – 43, 44, 61.
Fellhanera gyrophorica Sérus., Coppins, Diederich & Scheid. – 61.
Flavoparmelia caperata (L.) Hale – 10, 24, 27, 32, 47, 60, 61.
Flavoplaca citrina (Hoffm.) Arup et al. – 23.
Graphis scripta (L.) Ach. – 10, 16, 27, 33, 43, 44, 47, 60, 61.
Gyalolechia flavovirescens (Wulfen) Søchting, Frödén & Arup – 10.
Heterodermia speciosa (Wulfen) Trevis. – 10.
Hypocenomyce friesii (Ach.) P. James & Gotth. Schneid. – 42.
Hypocenomyce scalaris (Ach.) M. Choisy – 16, 42, 43, 47, 48, 60.
Hypogymnia physodes (L.) Nyl. – 6, 10, 13, 24, 25, 32, 42, 43, 52, 60, 61, 66.
Hypogymnia tubulosa (E. A. Schaerer) Hav. – 27, 60.
Hypogymnia vittata (Ach.) Parrique – 61.
Icmadophila ericetorum (L.) Zahlbr. – 42, 47, 60, 61.
Imshaugia aleurites (Ach.) S.L.F. Mey. – 16, 42, 47.
Lecania cyrtella (Ach.) Th. Fr. – 10, 27, 44.
Lecania dubitans (Nyl.) A. L. Sm. – 10, 27, 60.
Lecania fuscella (Schaer.) A. Massal. – 10, 27.
Lecania koerberiana J. Lahm – 22, 27, 28, 60.
Lecania naegelii (Hepp) Diederich & Van den Boom – 27, 67.
Lecania prasinoides Elenkin – 42.
Lecanora albella (Pers.) Ach. – 10, 16, 28, 47, 60, 61.
Lecanora allophana Nyl. – 10, 25, 27, 32, 42, 43, 47, 56, 60, 61.
Lecanora carpinea (L.) Vain. – 10, 24, 27, 32, 36, 42, 43, 44, 47, 48, 60, 61.
Lecanora chlarotera Nyl. – 10, 16, 60, 61.
Lecanora crenulata Hook. – 10.
Lecanora dispersa (Pers.) Sommerst. – 28.
Lecanora glabrata (Ach.) Malme – 47, 60, 61.
Lecanora polytropa (Ehrh. ex Hoffm.) Rabenh. – 16, 60.
Lecanora populicola (DC. in Lam. & DC.) Duby – 10, 25, 27, 60, 61.
Lecanora pulicaris (Pers.) Ach. – 10, 16, 19, 24, 27, 28, 41, 42, 47, 60, 61.
Lecanora saligna (Schrad.) Zahlbr. – 43.
Lecanora sambuci (Pers.) Nyl. – 10.
Lecanora symmicta (Ach.) Ach. – 16, 24, 27, 31, 42, 47, 60, 61.
Lecanora thysanophora R. C. Harris – 60, 61.
Lecanora umbrina (Ach.) A. Massal. – 6, 10, 26, 56, 60.

- Lecanora varia* (Hoffm.) Ach. – 10, 27, 34, 42, 43, 47, 57, 60, 61.
Lecidella elaeochroma (Ach.) M. Choisy – 31, 60.
Lecidella euphorea (Floerke) Hertel – 10, 24, 27, 60.
Lepraria incana (L.) Ach. – 60.
Leptogium saturninum (Dicks.) Nyl. – 4, 10, 12, 43, 61.
Leptogium tenuissimum (Dicks.) Körb. – 6, 43.
(!) *Leptogium teretiusculum* (Flörke ex Wallr.) Arnold
Беларусь, Могилевская область, Осиповичский район, окр. д. Жорновка. 13.09.1924 г. Coll.
Савич В. П. 27.08.2016 г. Det. Яцына А. П. На древесине. Herbarium LE.
(#) *Leptorhaphis epidermidis* (Ach.) Th. Fr. – 10, 27, 43, 61, 67.
Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. – 2, 4, 20, 38, 43, 61.
Lobaria scrobiculata (Scop.) P. Gaertn. – 60, 61.
Montanelia sorediata (Ach.) Divakar, A. Crespo, Wedin & Essl. – 6, 16, 60.
Melanelixia glabratula (Lamy) Sandler & Arup – 43, 60.
Melanelixia subargentifera (Nyl.) O. Blanco, et al. – 42, 44, 60.
Melanelixia subaurifera (Nyl.) O. Blanco et al. – 7, 10, 24, 27, 42, 44, 48, 60, 61.
Melanohalea exasperata (De Not.) O. Blanco et al. – 10, 24, 27, 60.
Melanohalea exasperatula (Nyl.) O. Blanco et al. – 10, 24, 27, 32, 42, 43, 44, 60.
Melanohalea olivacea (L.) O. Blanco et al. – 13, 27, 31, 32, 46.
Menegazzia terebrata (Hoffm.) A. Massal. – 60.
Micarea nitschkeana (J. Lahm. in Rabenh.) Harm. – 42.
Micarea prasina Fr. – 66.
Microcalicium disseminatum (Ach.) Vain. – 61.
(*) *Muellerella hospitans* Stizenb. – 47.
Mycobilimia carnealbida (Mull. Arg.) Hafellner – 6.
(#) *Mycocalicium subtile* (Pers.) Szatala – 66.
Nephroma parile Ach. – 43.
Ochrolechia arbopea (Kreyer) Almb – 24.
Ochrolechia pallescens (L.) A. Massal. – 28.
Opegrapha rufescens Pers. – 61.
Pachyphiale fagicola (Hepp) Zwackh. – 61.
Parmelia sulcata Taylor – 7, 10, 13, 16, 24, 27, 32, 42, 43, 47, 52, 60, 64, 66.
Parmelina tiliacea (Hoffm.) Hale – 10, 42.
Parmeliopsis ambigua (Wulff) Nyl. – 16, 42, 60, 61.
Peltigera aphthosa (L.) Willd. – 18.
Peltigera canina (L.) Willd. – 18, 32, 42.
Peltigera didactyla (Wirt.) J. R. Laundon – 4, 10, 27, 42, 54.
Peltigera extenuata (Nyl. ex Vain.) Lojka – 47.
Peltigera lepidophora (Nyl. ex Vainio) Bitter – 10, 27.
Peltigera malacea (Ach.) Funck – 2, 4, 6, 10, 25, 30.
Peltigera membranacea (Ach.) Nyl. – 10.
Peltigera neopolydactyla (Gyeln.) Gyeln. – 2, 10, 33.
Peltigera polydactylon (Neck.) Hoffm. – 2, 10, 13, 27, 30, 33, 60.
Peltigera praetextata (Flörke ex Sommerf.) Zopf – 34, 43, 64.
Peltigera rufescens (Weiser) Humber – 2, 5, 6, 10, 26, 27, 32, 42, 64, 66.
Peltigera venosa (L.) Hoffm. – 64.
Pertusaria albescens (Huds.) M. Choisy & Werner – 10, 27, 47, 60.
Pertusaria alpina E. Hepp ex Ahles – 8, 61.
Pertusaria amara (Ach.) Nyl. – 5, 10, 12, 16, 25, 27, 32, 60, 61, 64.
Pertusaria coronata (Ach.) Th. Fr. – 60.
Pertusaria leioplaca (Ach.) DC. – 10, 13.
Pertusaria multipuncta (Turner) Nyl. – 60.

- Pertusaria pertusa* (Weigel) Tucker – 27, 60.
Phaeophyscia ciliata (Hoffm.) Moberg – 10, 27.
Phaeophyscia nigricans (Flörke) Moberg – 10, 27, 31, 44, 59.
Phaeophyscia orbicularis (Neck.) Moberg – 10, 22, 42, 56.
Phaeophyscia pusilloides (Zahlbr.) Essl. – 60.
Phaeophyscia sciastra (Ach.) Moberg – 6.
Phlyctis agelaea (Ach.) Flot. – 33, 60, 61.
Phlyctis argena (Spreng.) Flot. – 42, 60, 61.
Physcia adscendens (Fr.) H. Olivier – 10, 24, 27, 42, 44, 47, 56, 60.
Physcia aipolia (Ehrh. ex Humber) Fürnr. – 4, 10, 27, 42, 60.
Physcia caesia (Hoffm.) Fürnr. – 10, 27, 60, 66.
Physcia dubia (Hoffm.) Lettau – 34, 40.
Physcia stellaris (L.) Nyl. – 10, 24, 27, 34, 42, 44, 61.
Physcia tenella (Scop.) DC. – 60.
Physconia detersa (Nyl.) Poelt – 47, 60.
Physconia distorta (V. Wirth.) J. R. Laundon – 10, 24, 27, 32, 42, 44, 56, 60, 61, 64.
Physconia enteroxantha (Nyl.) Poelt – 32, 40, 42, 43, 60.
Physconia perisidiosa (Erichsen) Moberg – 60.
Placynthiella dasaea (Stirt.) Tonsberg – 6.
Placynthiella hyporhoda (Th. Fr.) Coppins – 6.
Placynthiella icmalea (Ach.) Coppins et P. James – 31, 42, 62, 63.
Placynthiella uliginosa (Schrad.) Coppins – 6, 42, 61, 62.
Platismatia glauca (L.) W. L. Culb. & C. F. Culb. – 10, 25, 27, 43, 47.
 (!*) *Plectocarpon lichenum* (Sommerf.) D. Hawksw.
 Беларусь, Минская область, Минский район, окр. д. Прилуки. 04.08.1925 г. Coll. Савич В. П.
 28.08.2016 г. Det. Яцына А. П. На талломе *Lobaria pulmonaria*. Herbarium LE.
Pleurosticta acetabulum (Neck.) Elix & Lumbsch – 10, 24, 27.
Polyscaulium candelaria (L.) Frödén et al. – 10, 42.
Polyscaulium polycarpa (Hoffm.) Frödén et al. – 10, 36, 44, 47.
Polyscaulium ucrainica (S.Y.Kondr.) Frödén et al. – 44, 61.
Porpidia crustulata (Ach.) Hertel & Knoph – 6, 16, 27.
Protoparmeliopsis muralis (Schreb.) M. Choisy – 6, 16, 22, 27.
Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf – 10, 22, 25, 27, 60, 32, 64.
Pyrenora sorophora (Vain.) Hafellner – 31.
Pyrenula coryli A. Massal. – 10.
Pyrenula laevigata (Pers.) Arnold – 15.
Pyrenula nitida (Wiegel) Ach. – 47, 60, 63.
Pyrenula nitidella (Flörke ex Schaer.) Müll. Arg. – 47, 60, 61, 63.
Ramalina dilacerata (Hoffm.) Hoffm. – 10, 12.
Ramalina farinacea (L.) Ach. – 10, 22, 43, 45, 60, 61.
Ramalina fraxinea (L.) Ach. – 10, 27, 61.
Ramalina pollinaria (Westr.) Ach. – 5, 10, 24, 27, 47, 56, 59, 64.
Ramalina sinensis Jatta – 10, 64.
Ramalina thrausta (Ach.) Nyl. – 10, 60.
Reichlingia leopoldii Diederich & Scheid. – 60.
Rhizocarpon distinctum Th. Fr. – 16.
Rhizocarpon grande (Flörke) Arnold – 16, 60.
Rhizocarpon lavatum (Ach.) Hazsl. – 27.
Rhizocarpon obscuratum (Ach.) A. Massal. – 6, 16.
Rinodina polyspora Th. Fr. – 27, 67.
Rinodina sophodes (Ach.) A. Massal. – 10, 27.
Rinodina turfacea (Wahlenb.) Körb. – 10.

- Rinodina vezdae* H. Mayrhofer – 7.
Sarcogyne regularis Körb. – 7.
 (#) *Sarea difformis* (Fr.) Fr. – 61.
 (#) *Sarea resinae* (Fr.) Kuntze. – 61.
Schismatomma periceleum (Ach.) Branth & Rostr. – 62.
Sclerophora amabilis (Tibell) Tibell – 60.
Sclerophora pallida (Pers.) Y. J. Yao & Spooner – 61.
 (*) *Sphinctrina turbinata* (Pers.) De Not. – 61.
Stereocaulon condensatum Hoffm. – 6.
Stereocaulon tomentosum Fr. – 4, 6, 16, 27, 32, 42.
Tephromela atra (Huds.) Hafellner – 16.
Thelocarpon laureri (Flot.) Nyl. – 10.
Thelotrema lepadium Ach. – 60.
Trapelia coarctata (Sm.) M. Choisy – 6, 27.
Trapeliopsis flexuosa (Fr.) Coppins & P. James – 31, 63.
Trapeliopsis granulosa (Hoffm.) Lumbsch – 31, 60, 61, 62.
Trapeliopsis viridescens (Schrad.) Copp. & P. James – 60, 61.
Tuckermanopsis chlorophylla (Willd.) Hale – 10, 27, 43, 66.
Usnea filipendula Stirt. – 60.
Usnea florida (L.) F. C. Weber ex F. H. Wigg. – 61, 62.
Usnea glabrescens (Nyl. ex Vain.) Vain. – 10.
Usnea subforidana Stirt. – 60.
Verrucaria muralis Ach. – 6, 7, 10.
Verrucaria sylvana Kreyer – 7.
Vulpicida pinastris (Scop.) Mattson & M. J. Lai – 10, 13, 27, 32, 60, 61.
Xanthoparmelia conspersa (Ehrh. ex Ach.) Hale – 6, 7, 60.
Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. – 10, 24, 27, 32, 42, 56, 61, 64.
Xylographa abietina (Pers.) Zahlbr. – 10.

В ходе ревизии белорусских образцов в гербарии LE обнаружены новые, редкие и слабоизученные виды. Впервые для лишенобиоты Беларуси приводятся два новых вида лишайников – *Biatora helvola* и *Leptogium teretiusculum* и два вида лишенофильных грибов – *Abrothallus peyritschii* и *Plectocarpon lichenum*. Такие виды, как *Arthonia arthonioides*, *A. vinosa*, *Bactrospora dryina*, *Caloplaca albolutescens*, *Chaenothecopsis nana*, *Cladonia norvegica*, *C. stygia*, *Muellerella hospitans*, *Pachyphiale fagicola*, *Phaeophyscia pusilloides*, *Pycnora sorophora* и *Reichlingia leopoldii*, являющиеся редкими для республики и впервые приводятся для лишенобиоты Беларуси только в XXI в. Кроме новых видов лишайников и лишенофильных грибов в лишенологическом гербарии (LE) обнаружен ряд видов лишайников из Беларуси, известных только из гербария (LE) и не представленных в гербариях республики: *Brianaria sylvicola*, *Brianaria tuberculata*, *Cresponea chloroconia*, *Lecania prasinoidea*, *Lobaria scrobiculata*, *Nephroma parile*, *Peltigera venosa*, *Rinodina vezdae* и *Verrucaria sylvana*. Большинство из вышеперечисленных видов лишайников найдены в начале XX в. и не упоминались для территории республики.

В ходе инвентаризации гербарных сборов лишайников первой четверти XX в. выявлено 25 новых локалитетов 11 видов лишайников, занесенных в 4-е издание Красной книги Беларуси: *Calicium adpersum* – Осиповичский р-н.; *Cetrelia olivetorum* – Минский, Оршанский, Осиповичский и Речицкий р-ны; *Chaenotheca chlorella* – Осиповичский р-н; *Evernia divaricata* – Оршанский, Осиповичский и Шкловский р-ны; *Lobaria pulmonaria* – Крупский, Лепельский, Минский, Оршанский и Осиповичский р-ны; *Montanelia sorediata* – Оршанский и Осиповичский р-ны; *Menegazzia terebrata* – Осиповичский р-н; *Peltigera aphthosa* – Сенненский р-н; *P. lepidophora* – Оршанский и Мозырский р-ны; *Ramalina thrausta* – Оршанский и Осиповичский р-ны и *Usnea florida* – Осиповичский р-н. Новые локалитеты охраняемых видов лишайников будут учтены при подготовке нового издания Красной книги Беларуси, а их местонахождения – при подготовке многотомного издания «Флора лишайников Беларуси».

Заключение. Таким образом, в ходе инвентаризации и инсерации белорусских образцов лишайников первой четверти XX в. в гербарии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН установлено, что в коллекции (LE) представлено 1502 гербарных пакетов, относящихся к 260 видам лишайников и близкородственных грибов. Впервые для лишайнобиоты Беларуси приводятся два новых вида лишайников и два вида лишайнофильных грибов. Полученные сведения позволят уточнить и дополнить данные о распространении видов в пределах Беларуси и Восточной Европы.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 16-34-50074).

Acknowledgements. The work was supported by the Russian Foundation for Fundamental Research (grant no. 16-34-50074).

Список использованных источников

1. Search Index Fungorum // Index Fungorum, 2017 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. – Date of access: 25.01.2017.

References

1. Search Index Fungorum. *Index Fungorum*, 2017. Available at: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (accessed 25.01.2017).

Информация об авторе

Яцына Александр Петрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lihenologs84@mail.ru.

Information about the author

Aleksander P. Yatsyna – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaja Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lihenologs84@mail.ru.