

# ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

---

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2019. Т. 64, № 2

---

# ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

---

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2019. Т. 64, № 2

---

Журнал основан в 1956 г. как «Весці Акадэміі навук БССР. Серыя біялагічных навук»,  
с 1992 г. – «Весці Акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук»,  
с 1998 г. – современное название

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,  
свидетельство о регистрации № 395 от 18.05.2009

*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. Евтушенков** – 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. Шалыго** – 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: biolvesti@mail.ru  
Сайт: vestibio.belnauka.by*

---

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2019. Т. 64, № 2.

*Выходит на русском, белорусском и английском языках*

---

Редактор *В. Г. Колосовская*

Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 04.04.2010. Выход в свет 29.04.2019. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 80 экз. Заказ 71.

Цена номера: индивидуальная подписка – 11,74 руб., ведомственная подписка – 28,19 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, 2019

# PROCEEDINGS

## OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

---

BIOLOGICAL SERIES. 2019, vol. 64, no. 2

---

The Journal was founded in 1956 under the title  
“Proceedings of the Academy of Sciences of BSSR. Biological series”,  
since 1992 – “Proceedings of the Academy of Sciences of Belarus. Biological series”,  
since 1998 it comes under its actual title

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

**Igor D. Volotovskii** (*Associate Editor-in-Chief*) – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National  
Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**Viktor I. Parfyonov** (*Associate Editor-in-Chief*) – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the  
National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**Valentina G. Kolosovskaya** – *Managing Editor*

**Sergey N. Cherenkevich** – Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Anatoli N. Evtushenkov** – Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Lyubov V. Khotyleva** – Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus

**Alexander V. Kilchevsky** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**Emiliya I. Kolomiets** – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**Nikolai A. Laman** – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences  
of Belarus, Minsk, Belarus

**Anatoli G. Lobanok** – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**Vladimir E. Padutov** – Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus

**Vladimir N. Reshetnikov** – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
**Nikolai V. Shalygo** – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
**Vladimir M. Shkumatov** – Belarusian State University, Minsk, Belarus  
**Vladimir 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  
**Vasilii 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 of the 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: biolvesti@mail.ru  
Website: vestibio.belnauka.by*

---

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series, 2019, vol. 64, no. 2.

*Printed in Russian, Belarusian and English languages*

---

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

Sent for press 04.04.2019. Output 29.04.2019. Format 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Offset paper.  
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 80 copies. Order 71.  
Number price: individual subscription – 11,74 byn., departmental subscription – 28,19 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, 2019

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)

### ЗМЕСТ

<b>Абрамчык Л. М., Доманская И. Н., Макаров В. Н., Сердюченко Е. В., Бачище Т. С., Кондратьева В. В., Шпилевский С. Н., Довбнюк Ю. Н., Кабашникова Л. Ф.</b> Влияние индукторов иммунитета на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата и окислительный статус растений огурца ( <i>Cucumis sativus</i> L.), инфицированных <i>Fusarium oxysporum</i> .....	135
<b>Коваленко Н. А., Суличенко Г. Н., Леонтьев В. Н., Шутова А. Г.</b> Состав эфирных масел растений рода <i>Agastache</i> , интродуцированных в Беларуси .....	147
<b>Заводник И. Б., Кравчук Р. И., Ильич Т. В., Лапшина Е. А., Вейко А. Г., Заводник Л. Б., Островская О. Б., Курбат М. Н.</b> Морфологические изменения митохондрий и клеток млекопитающих, индуцируемые гипохлорной кислотой .....	156
<b>Кныш Н. В., Ермохин М. В.</b> Влияние климатических факторов на прирост дуба черешчатого ( <i>Quercus robur</i> L.) в южных регионах Беларуси .....	169
<b>Козел Н. В., Радюк М. С., Самович Т. В., Дремук И. А., Габриелян Л. С.</b> Накопление белка и экспрессия гена нитратредуктазы в клетках <i>Spirulina platensis</i> в зависимости от спектрального состава светодиодного излучения .....	180
<b>Босякова Е. В., Титовец Э. П.</b> Компьютерное моделирование аквапорин4-зависимого переноса воды через гематоэнцефалический барьер .....	190
<b>Сусло Д. С., Халин А. В., Волкова Т. В.</b> <i>Aedes mercurator</i> Dyar, 1920 – новый вид кровососущих комаров (Diptera: Culicidae) в фауне Беларуси .....	198
<b>Левый А. В., Агеева А. С.</b> Получение мужски фертильных межвидовых гибридов культурного картофеля с ценным для селекции аллотетраплоидным видом <i>Solanum stoloniferum</i> .....	202
<b>Келько А. Ф.</b> Особенности роста привитых растений можжевельника китайского ‘Blaauw’ ( <i>Juniperus chinensis</i> ‘Blaauw’) .....	210
<b>Кушнерова Е. В., Пахомова И. В., Пролесковская И. В.</b> Оценка экспрессии генов <i>TH</i> и <i>RHOX2B</i> с использованием ПЦР в режиме реального времени для диагностики метастатического поражения костного мозга при нейроblastоме .....	216
<b>Королевич В. М., Блажинска П., Сыкула А., Лодыга-Хрущинска Е.</b> ДНК-связывающие свойства 2'-гидроксифлаванона и его производного на основе модификации Шиффа .....	222
<b>Ильина В. Н., Андреева И. З., Абрамова Л. М.</b> Структура ценоотических популяций <i>Adenophora lilifolia</i> (L.) A. DC. на Южном Урале и в Среднем Поволжье .....	229
<b>Вознячук И. П., Власова А. Б., Степанович И. М., Годнева А. Т., Решетников В. Н.</b> Формирование устойчивых придорожных растительных сообществ высокой ботанической и эстетической ценности: основные положения концепции и экспериментальное обоснование .....	238

### ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ

<b>Эмилия Ивановна Коломиец</b> (К юбилею) .....	255
--	-----

**CONTENTS**

<b>Abramchik L. M., Domanskaya I. N., Makarov V. N., Serdiuchenko E. V., Bachyshcha T. S., Kondratieva V. V., Shpilevski S. N., Daubniuk Yu. N., Kabashnikova L. F.</b> Effect of immunity inductors on the structural and functional state of photosynthetic apparatus and oxidative status of cucumber plants ( <i>Cucumis sativus</i> L.) infected by <i>Fusarium oxysporum</i> .....	135
<b>Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Leontiev V. N., Shutova A. G.</b> Composition of essential oil of plants some species of the genus <i>Agastache</i> L. introduced in Belarus .....	147
<b>Zavodnik I. B., Kravchuk R. I., Ilyich T. V., Lapshina E. A., Vejko A. G., Zavodnik L. B., Astrowskaja O. B., Kurbat M. N.</b> Morphological changes of mitochondria and mammalian cells, induced by hypochlorous acid .....	156
<b>Knysh N. V., Yermokhin M. V.</b> The effects of climatic factors in forming increment of english oak ( <i>Quercus robur</i> L.) in south regions of Belarus .....	169
<b>Kozel N. V., Radyuk M. S., Samovich T. V., Dremuk I. A., Gabrielyan L. S.</b> Protein accumulation and expression of the nitrate reductase gene in <i>Spirulina platensis</i> cells depending on the spectral composition of led radiation .....	180
<b>Basiakova K. V., Titovets E. P.</b> Computer simulation of aquaporin4-dependent water transfer across the hematoencephalic barrier .....	190
<b>Suslo D. S., Khalin A. V., Volkova T. V.</b> <i>Aedes mercurator</i> Dyar, 1920 as a new species of the mosquito (Diptera: Culicidae) in fauna of Belarus.....	198
<b>Levy A. V., Ageeva A. S.</b> Production of male fertile interspecific hybrides between cultivated potatoes and valuable for breeding allotetraploid species <i>Solanum stoloniferum</i> .....	202
<b>Kelko H. F.</b> Growth features of grafted plants of <i>Juniperus chinensis</i> 'Blaauw' .....	210
<b>Kushniarova L. V., Pakhomava I. V., Praliaskouskaya I. V.</b> Evaluation of <i>TH</i> and <i>PHOX2B</i> gene expression by real time PCR for diagnostic of bone marrow metastatic lesion in neuroblastoma patients .....	216
<b>Korolevich V. M., Blazinska P., Sykula A., Lodyga-Chruscinska E.</b> DNA binding properties of 2'-hydroxyflavanon and Schiff base derivative .....	222
<b>Ilina V. N., Andreeva I. Z., Abramova L. M.</b> Structure of cenothic populations of <i>Adenophora lilifolia</i> (L.) A. DC. in the Southern Urals and the Middle Volga region.....	229
<b>Voznyachuk I. P., Vlasava N. B., Stepanovich I. M., Godneva A. T., Reshetnikov V. N.</b> Establishing sustainable roadside vegetation communities of high botanical and aesthetic value: the basic concept statement and experimental justification .....	238

**SCIENTISTS OF BELARUS**

<b>Emilia Ivanovna Kolomiets</b> (To the Anniversary) .....	255
---	-----

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.4:635.63:577.352.38

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-135-146>

Поступила в редакцию 23.08.2018

Received 23.08.2018

**Л. М. Абрамчик, И. Н. Доманская, В. Н. Макаров, Е. В. Сердюченко, Т. С. Бачище,  
В. В. Кондратьева, С. Н. Шпилевский, Ю. Н. Довбнюк, Л. Ф. Кабашникова**

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

**ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРОВ ИММУНИТЕТА  
НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО  
АППАРАТА И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ ОГУРЦА  
(*CUCUMIS SATIVUS L.*), ИНФИЦИРОВАННЫХ *FUSARIUM OXYSPORUM***

**Аннотация.** Исследовано влияние индукторов иммунного ответа  $\beta$ -аминомасляной кислоты (АМК),  $\beta$ -1,3-глюкана (ГК), салициловой кислоты (СК) и их смеси на структурно-функциональное состояние и окислительный статус растений огурца в условиях инфицирования грибным патогеном *Fusarium oxysporum*. Установлено, что дезорганизирующее влияние патогенного гриба *Fusarium oxysporum* в растениях огурца проявляется в подавлении синтеза фотосинтетических пигментов и функциональной активности фотосистемы 2 хлоропластных мембран, а также в изменении характера перераспределения поглощенной световой энергии, что приводит к снижению интенсивности фотохимической конверсии ( $qP$ ) и усилению нефотохимического тушения ( $qN$ ) флуоресценции хлорофилла. При этом интенсивность процессов перекисного окисления липидов усиливается. Применение иммуномодуляторов АМК, ГК и СК способствует формированию адаптивных свойств фотосинтетического аппарата, а также снижению активности окислительных процессов в инфицированных листьях огурца, что свидетельствует о защитной роли препаратов против фузариозного увядания, вызванного *Fusarium oxysporum*.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -аминомасляная кислота,  $\beta$ -1,3-глюкан, салициловая кислота, *Fusarium oxysporum*, хлорофилл, каротиноиды, фотосистема 2, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода

**Для цитирования:** Влияние индукторов иммунитета на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата и окислительный статус растений огурца (*Cucumis sativus L.*), инфицированных *Fusarium oxysporum* / Л. М. Абрамчик [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 135–146. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-135-146>

**L. M. Abramchik, I. N. Domanskaya, V. N. Makarov, E. V. Serdiuchenko, T. S. Bachyshcha,  
V. V. Kondratieva, S. N. Shpilevski, Yu. N. Daubniuk, L. F. Kabashnikova**

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

**EFFECT OF IMMUNITY INDUCTORS ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE  
OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS AND OXIDATIVE STATUS OF CUCUMBER PLANTS  
(*CUCUMIS SATIVUS L.*) INFECTED BY *FUSARIUM OXYSPORUM***

**Abstract.** The effect of inductors of the immune response of  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA),  $\beta$ -1.3-glucan (GK), salicylic acid (SA) and their mixture on the structural and functional state of photosynthetic apparatus and the oxidative status of cucumber plants under infection by fungal pathogen *Fusarium oxysporum* was studied. It was found that the disorganizing effect of the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* in cucumber plants caused the suppression of the synthesis of photosynthetic pigments and the functional activity of the photosystem 2 in chloroplast membranes, as well as in changing the character of the redistribution of absorbed light energy, leading to a decrease in the photochemical energy conversion ( $qP$ ) and enhancing non-photochemical quenching ( $qN$ ) of chlorophyll. In this conditions intensification of lipid peroxidation processes was observed. The use of immunomodulators such as BABA, GK and SA promotes the improvement of the adaptive properties of the photosynthetic apparatus, and the reduction of oxidative processes activity in infected cucumber leaves, which indicates the protective role of these substances against the fusariosis wilt caused by *Fusarium oxysporum*.

**Keywords:**  $\beta$ -aminobutyric acid,  $\beta$ -1.3-glucan, salicylic acid, *Fusarium oxysporum*, chlorophyll, carotenoids, photosystem 2, lipid peroxidation, reactive oxygen species

**For citation:** Abramchik L. M., Domanskaya I. N., Makarov V. N., Serdiuchenko E. V., Bachyshcha T. S., Kondratieva V. V., Shpilevski S. N., Daubniuk Yu. N., Kabashnikova L. F. Effect of immunity inductors on the structural and functional state of photosynthetic apparatus and oxidative status of cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) infected by *Fusarium oxysporum*. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 135–146 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-135-146>

**Введение.** В постоянно изменяющихся условиях внешней среды растения подвергаются воздействию различных факторов биотической и абиотической природы, к негативному влиянию которых они адаптируются, формируя механизмы противодействия. К объективным причинам значительного снижения урожая важнейших продовольственных культур можно отнести заражение возбудителями грибных болезней. Огромное разнообразие грибных патогенов, их высокая вариабельность и колоссальная способность приспосабливаться к растению-хозяину представляет собой серьезную проблему в защите растений. Одним из опаснейших патогенов является грибок *Fusarium oxysporum*.

Фузариозы – болезни множества культурных и дикорастущих растений, вызываемые несовершенными грибами рода *Fusarium* и распространенные во всех климатических зонах. Широко распространено фузариозное увядание на томатах и других пасленовых культурах [1]. Ущерб, наносимый сельскому хозяйству вредоносными фитопатогенами, огромен, поэтому снижение уровня заболеваемости растений (особенно в закрытом грунте), вызываемой микроорганизмами разной природы, является важнейшим резервом увеличения продуктивности культур и повышения качества урожая. В связи с этим весьма актуальным является поиск наиболее радикальных и эффективных методов снижения потерь, наносимых различными грибными, вирусными и бактериальными патогенами [2]. В настоящее время разрабатывается и применяется на практике множество методов борьбы с грибной инфекцией на сельскохозяйственных культурах, однако наиболее перспективным направлением является поиск средств повышения общей неспецифической устойчивости растений (иммунного статуса) к неблагоприятным факторам биотической природы путем индукции природных защитных механизмов. В последнее десятилетие интенсивно проводятся работы по созданию индукторов устойчивости растений на основе метаболитов иммунного ответа. В отличие от фунгицидов, иммуномодуляторы не вызывают привыкания к возбудителям болезней, не токсичны для человека и безопасны для окружающей среды, в связи с чем они являются идеальным средством для профилактики большинства заболеваний растений.

Одним из веществ, которые в последние годы привлекают пристальное внимание исследователей в связи с их способностью индуцировать системную приобретенную устойчивость (СПУ) растений к разнообразным возбудителям болезней является салициловая кислота (СК) [3]. Согласно современным представлениям, СК – гормоноподобное соединение фенольной природы, являющееся эндогенным регулятором роста и обладающее функциями сигнального интермедиата при инфицировании растений фитопатогенами [4]. В последние годы появилось достаточно большое количество сообщений о том, что  $\beta$ -аминоасляная кислота (АМК), а также ряд других карбоновых кислот индуцируют устойчивость растений ко многим стрессам, в том числе к тепловому шоку, засухе, засолению, биотрофным и некротрофным грибам [5]. Показано, что способность АМК повышать устойчивость растений к болезням не связана с прямым фунгицидным или бактерицидным действием, но обусловлена возможностью АМК вызывать развитие СПУ. При этом данный процесс сопровождается повышением активности протеинкиназ, усилением генерации активных форм кислорода (АФК), отложением каллозы, лигнина, накоплением защитных PR-белков и усилением биосинтеза вторичных метаболитов, а также индукцией синтеза ферментов, катализирующих эти защитные реакции [6].

К препаратам нового поколения, которые используются при разработке индукторов болезнестойкости растений, можно отнести и глюконы, которые выполняют роль сигнальных молекул, обладают элиситорными свойствами и способны активировать гены, что приводит к синтезу глюконаз и других фитоалексинов, повышая устойчивость и продуктивность многих сельскохозяйственных культур [7–9].

Несмотря на интенсивные работы по изучению роли указанных соединений в качестве модуляторов иммунитета растений, остается еще много белых пятен в определении характера их воздействия на растительные клетки, особенно на клеточном уровне реализации защитных механизмов.



Цель данного исследования – изучение эффективности действия новых иммуномодулирующих агентов на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата и окислительный статус растений огурца сорта Кураж при фузариозном увядании, вызванном грибным патогеном *Fusarium oxysporum*.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования служили растения огурца сорта Кураж, выращенные в почвенной культуре до 40-дневного возраста и затем перенесенные для испытаний на водопроводную воду. На протяжении всего эксперимента их выращивали в климаточкамере при температуре 24 °С и освещенности 100  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  с фотопериодом 14 ч. Растения огурца обрабатывали иммуномодулирующими препаратами, содержащими водорастворимый полимер (ВРП) (0,4 %-ный водный раствор) и один из иммуномодуляторов (СК,  $\times 10^{-4}$  М; АМК,  $\times 10^{-4}$  М;  $\beta$ -1,3-глюкан (ГК), 0,01 %) или их смесь. Растения обрабатывали методом опрыскивания, исходя из нормы расхода препарата (5 мл/раст.). В качестве контроля анализировали растения, обработанные дистиллированной водой. Искусственное инфицирование грибным патогеном *Fusarium oxysporum*, вызывающим фузариозное увядание растений, проводили через 48 ч после обработки иммуномодулирующим препаратом путем внесения суспензионной культуры гриба, содержащей  $10^6$  спор/мл, через корни в водную среду (50 мл/раст.). Гриб *Fusarium oxysporum* предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение 2 недель. Анализ проводили через 72 ч после инокуляции патогеном.

Для экстракции пигментов использовали высечки из мезофилла листа. Экстракцию хлорофиллов (Хл) и каротиноидов производили 99,5 %-ным ацетоном в трехкратной биологической повторности. Количество пигментов в экстрактах определяли по спектрам поглощения на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Содержание пигментов рассчитывали по формулам, предложенным в работе [10]:

$$\begin{aligned} C_a &= 9,784E_{662} - 0,99E_{644}, \\ C_b &= 21,426E_{644} - 4,65E_{662}, \\ C_{car} &= 4,695E_{440,5} - 0,268(C_a + C_b), \end{aligned}$$

где  $C_a$  – концентрация Хл *a*, мкг/мл;  $C_b$  – концентрация Хл *b*, мкг/мл;  $C_{car}$  – концентрация каротиноидов, мкг/мл;  $E$  – экстинкция при соответствующей длине волны.

Содержание фотосинтетических пигментов рассчитывали на 1 г сырой массы листа.

Для определения содержания фенольных соединений 0,5 г растительной ткани растирали в фарфоровой ступке с 2 мл 1 %-ного раствора HCl и проводили серию центрифугирований по 10 мин при 7000 об/мин до полного обесцвечивания осадка. Полученные экстракты объединяли, добавляли 95 %-ный раствор этанола до общего объема 20 мл и выдерживали 12–15 ч при температуре 4 °С, затем вновь центрифугировали. Для спектрофотометрического определения фенольных соединений к 250 мкл супернатанта приливали 1,5 мл воды и 125 мкл реактива Фолина. Через 3 мин приливали 250 мкл насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 375 мкл воды. После 1 ч инкубации измеряли оптическую плотность при 765 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC [11].

Для оценки фотохимической активности фотосистемы 2 (ФС 2) использовали метод импульсно-модулированной флуоресцентной спектроскопии (РАМ, pulse-amplitude modulated fluorometry), позволяющий проводить прижизненно регистрацию кинетической кривой индукции флуоресценции Хл *a*. Параметры флуоресценции Хл *a* ФС 2 измеряли на флуориметре Dual-РАМ 100 (Walz, Германия) по методам, предложенным в работе [12]. Листья предварительно адаптировали к темноте в течение 15 мин. Модулированный с низкой частотой (32 Гц) свет ( $\lambda = 650$  нм) очень низкой интенсивности (0,04 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>·с) возбуждал флуоресценцию, повышая ее минимальный уровень ( $F_0$ ). Повышение выхода флуоресценции до уровня  $F_m$  инициировали включением света ( $\lambda = 665$  нм) высокой интенсивности (3500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>·с). Параметры флуоресценции измеряли с использованием актиничного света (120 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>·с) и рассчитывали по формулам

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m,$$

$$F_v = F_m - F_0,$$

$$qP = (F'_m - F)/(F'_m - F'_0),$$

$$qN = (F_m - F'_m)/(F_m - F_0),$$

где  $F_0$  и  $F'_0$  – минимальный уровень флуоресценции Хл  $a$  в листьях, адаптированных к темноте и свету соответственно;  $F_v$  – переменная флуоресценция Хл  $a$ ;  $F_m$  и  $F'_m$  – максимальный уровень флуоресценции Хл  $a$  в листьях, адаптированных к темноте и свету соответственно;  $F_v/F_m$  – потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС 2;  $qP$  и  $qN$  – фотохимическое и нефотохимическое тушение флуоресценции Хл  $a$  соответственно.

Для анализа активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли количество ТБК-активных продуктов по методу, приведенному в работе [13]. Растительный материал гомогенизировали в 5 мМ фосфатном буфере (рН 7,2). К гомогенату добавляли равный объем 0,5 % тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 20 %-ной трихлоруксусной кислоте. Полученные образцы нагревали на кипящей бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали при 3000 об/мин. Супернатант измеряли фотометрически при 532 нм. Количество малонового диальдегида (МДА) рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА-ТБК, который с поправкой на неспецифическое поглощение при  $\lambda = 600$  нм ( $1,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) составил  $155 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [14].

Общий уровень АФК оценивали с помощью флуоресцентного теста, в основе которого лежит образование дихлорфлуоресцеина (ДХФ) из нефлуоресцирующего дихлорфлуоресцеин-диацетата (ДХФДА) в экстрактах листьев. Навески листьев по 0,25 г гомогенизовали в 2 мл 0,2 н  $\text{HClO}_4$ . Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 г. Для нейтрализации кислотности к 500 мкл суспензии добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение рН – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 г. Для определения АФК к 950 мкл 0,15 М Трис-НСl буфера (рН 7,5) последовательно добавляли 25 мкл нейтрализованного супернатанта и 25 мкл 0,15 мМ раствора ДХФДА. Контролем служит проба, состоящая из 975 мкл 0,15 М Трис-НСl буфера и 25 мкл 0,15 мМ ДХФДА. Все пробы инкубировали в течение 20 мин в термостате при 37 °С в темноте. Уровень АФК определяли, регистрируя флуоресценцию ДХФ ( $\lambda_{\text{воз}} = 496$ ,  $\lambda_{\text{рег}} = 524$ ) с помощью спектрофлуориметра «СОЛАР СМ 2203» («СОЛАР», Беларусь) [15].

Содержание пероксида водорода в экстрактах листьев определяли с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ , катализируемая пероксидазой хрена [16]. Навески листьев по 0,3 г растирали в фарфоровой ступке в жидком азоте до порошка. Затем приливали 1 мл 0,2 н  $\text{HClO}_4$ , растирали до гомогената и переносили в центрифужные пробирки, смывая ступку еще 1 мл 0,2 н  $\text{HClO}_4$ . Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 г. Для нейтрализации кислотности к 500 мкл супернатанта добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение рН – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 г. Для определения содержания пероксида водорода к 930 мкл 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 7,0) последовательно добавляли 10 мкл раствора пероксидазы хрена (200 ед/мл) и 10 мкл 0,1 мМ раствора скополетина. Реакцию запускали путем добавления 50 мкл супернатанта. Контролем служила проба, состоящая из 950 мкл 0,1 М Трис-НСl буфера и 50 мкл супернатанта. Вторым контролем служила проба, состоящая из 980 мкл 0,1 М Трис-НСl буфера, 10 мкл раствора пероксидазы хрена (2500 ед/мл) и 10 мкл 0,1 мМ раствора скополетина. Содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяли, регистрируя флуоресценцию скополетина ( $\lambda_{\text{воз}} = 370$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 464$  нм) на спектрофлуориметре «СОЛАР СМ 2203» («СОЛАР», Беларусь) [16].

Все исследования проводили в 3–6-кратной биологической повторности. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи методов параметрической и непараметрической статистики. Достоверность различий средних значений определяли по  $t$ -критерию Стьюдента и критерию Манна–Уитни с использованием компьютерных программ Statistica 10.0 (StatSoft) и Excel 2010.

**Результаты и их обсуждение.** Проведено исследование влияния иммуномодулирующих агентов АМК, ГК, СК и их смеси на содержание фотосинтетических пигментов в инфицированных *Fusarium oxysporum* листьях огурца. Этот показатель, как правило, рассматривается в качестве интегрального для оценки эффективности поглощения солнечной энергии поверхностью листа и является индикатором физиологического состояния растения. Установлено, что инфицирование растений огурца патогеном путем внесения суспензии спор гриба через корни оказывает негативное действие на метаболизм фотосинтетических пигментов, что приводит к снижению суммарного содержания Хл и каротиноидов в листьях огурца на 22 и 17 % соответственно (табл. 1). При этом величины соотношения Хл *a*/Хл *b*, характеризующие размеры светособирающих антенн, связанных с фотосистемами, в зараженных растениях были сопоставимы с контролем (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние индукторов иммунитета АМК, ГК, СК и их смеси на содержание фотосинтетических пигментов и полифенольных соединений (мг/г сырого веса) в листьях огурца, инфицированных *Fusarium oxysporum*

Table 1. Influence of immunity inductors BABA, GK, SA and their mixture on the photosynthetic pigments and phenols content (mg/g of wet weight) in cucumber leaves infected by *Fusarium oxysporum*

Вариант опыта	Хл <i>a</i> , мг/г сырой массы	Хл <i>b</i> , мг/г сырой массы	Хл ( <i>a</i> + <i>b</i> ), мг/г сырой массы	Каротиноиды, мг/г сырой массы	Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>	Фенолы, мг/г сырой массы
Контроль	1,053 ± 0,044	0,358 ± 0,017	1,366 ± 0,004	0,335 ± 0,004	2,96 ± 0,05	2,02 ± 0,02
<i>F. oxysporum</i>	0,835 ± 0,080	0,274 ± 0,022	1,033 ± 0,047*	0,259 ± 0,012*	3,01 ± 0,05	2,06 ± 0,02*
ВРП + АМК + <i>F. oxysporum</i>	1,211 ± 0,108	0,405 ± 0,034	1,509 ± 0,069*	0,376 ± 0,024	3,01 ± 0,01	2,91 ± 0,37*
ВРП + ГК + <i>F. oxysporum</i>	1,344 ± 0,079	0,429 ± 0,023	1,85 ± 0,006*	0,440 ± 0,006*	3,15 ± 0,02*	1,83 ± 0,11*
ВРП + СК + <i>F. oxysporum</i>	1,456 ± 0,111	0,477 ± 0,038	1,821 ± 0,034*	0,429 ± 0,008*	3,02 ± 0,02	2,93 ± 0,07*
ВРП + (АМК + СК + ГК) + <i>F. oxysporum</i>	1,229 ± 0,058	0,429 ± 0,024	1,721 ± 0,064*	0,423 ± 0,014*	2,91 ± 0,01	3,27 ± 0,06*

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2, а также на рис. 1–4 звездочка указывает на достоверные различия между средними значениями при  $p < 0,05$ .

При предварительной обработке растений огурца перед инфицированием составами, содержащими АМК, ГК, СК и их смесь, отмечалось повышение уровня Хл и каротиноидов, сниженных под действием патогена (табл. 1). Причем наиболее существенный стимулирующий эффект оказал состав, включающий ГК, после обработки которым количество хлорофилловых пигментов увеличилось на 79 % по отношению к инфицированному контролю. Установлено стимулирующее действие препаратов, содержащих иммуномодуляторы АМК, СК, а также смеси (АМК + ГК + СК) на количество фенольных соединений в инфицированных растениях огурца. В то же время ГК не проявлял такого эффекта (табл. 1).

Изучено влияние иммуномодуляторов на эффективность протекания фотохимических реакций в реакционных центрах ФС 2, отражающих структурно-функциональное состояние фотосинтетической электрон-транспортной цепи и реагирующих на различные стрессовые воздействия [17, 18]. Показано, что заражение растений огурца *Fusarium oxysporum* приводит к некоторому снижению (на 14 %) максимального уровня флуоресценции Хл *a* (с 3,11 отн. ед. у здоровых до 2,65 отн. ед. у инфицированных растений), что свидетельствует о нарушении процесса переноса электронов в электрон-транспортной цепи хлоропластов огурца. Опрыскивание растений составами, содержащими иммуномодуляторы АМК, ГК, СК и их смесь, приводило к повышению уровня  $F_m$  по сравнению с контрольным вариантом, причем наиболее активная стимуляция происходила под действием АМК и ГК (рис. 1).

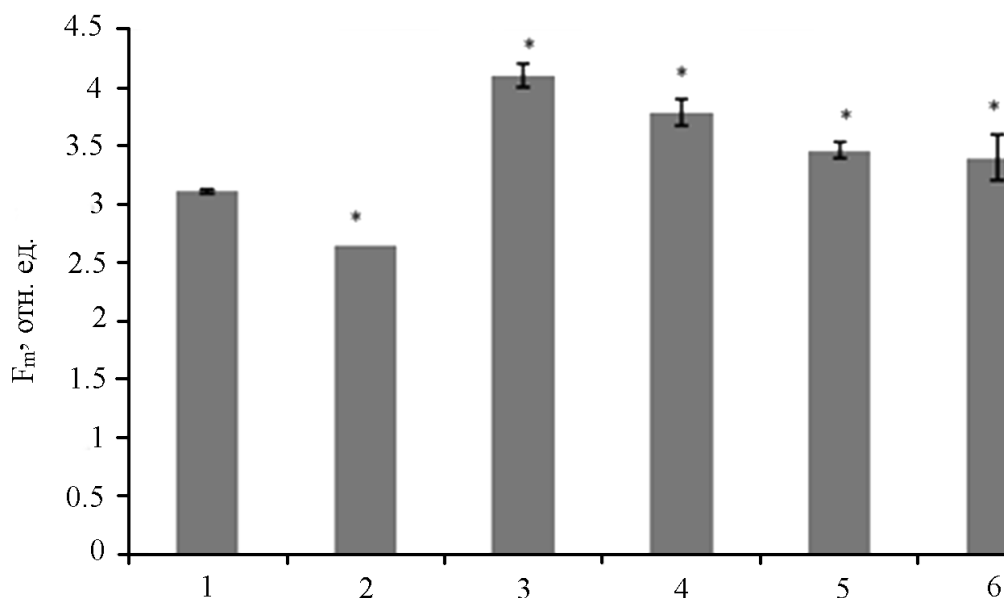


Рис. 1. Влияние иммуномодуляторов на уровень максимальной флуоресценции Хл *a* в листьях огурца, инфицированных патогенным грибом *F. oxysporum*: 1 – контроль (без обработки); 2 – контроль, зараженный *F. oxysporum*; 3 – ВПИ + АМК + *F. oxysporum*; 4 – ВПИ + ГК + *F. oxysporum*; 5 – ВПИ + СК + *F. oxysporum*; 6 – ВПИ + (АМК + ГК + СК) + *F. oxysporum*

Fig. 1. Effect of immune modulators on the level of maximum chlorophyll fluorescence in cucumber leaves infected with pathogenic fungus *F. oxysporum*: 1 – control (without treatment); 2 – control infected with *F. oxysporum*; 3 – WSP + BABA + *F. oxysporum*; 4 – WSP + GK + *F. oxysporum*; 5 – WSP + SA + *F. oxysporum*; 6 – WSP + (BABA + GK + SA) + *F. oxysporum*

Потенциальный квантовый выход фотохимических реакций в реакционных центрах ФС 2, тестируемый по параметру  $F_v/F_m$ , существенно возрастал у растений, предварительно обработанных иммуномодулирующими составами, содержащими АМК, ГК и СК (рис. 2).

Согласно представленным на рис. 3 результатам исследования фотоиндуцированных изменений фотохимического тушения флуоресценции Хл *a* ( $qP$ ) в листьях огурца, в условиях патогенного заражения его величина значительно снижалась по сравнению с контрольным вариантом. Следовательно, воздействие патогена на растения огурца приводит к снижению способности хлоропластных мембран к фотохимическому преобразованию поглощенных квантов света, что связано с увеличением восстановленности первичного акцептора электронов  $Q_A$ , обусловленным, как предполагается, денатурацией белковых компонентов реакционного центра ФС 2 хлоропластных мембран [19].

Кроме того, есть сведения о том, что действие грибной и вирусной инфекции является причиной не только разрушения Хл в листьях, но и подавления активности ферментов хлоропластов, связанных с транспортом электронов и фиксацией  $CO_2$  [20], в результате чего происходит нарушение световых и темновых стадий фотосинтеза, приводящее к снижению  $qP$  – доли энергии, используемой в фотохимических процессах. Иммуномодуляторы АМК, ГК, СК оказывали защитный эффект, который проявлялся в повышении уровня фотохимической конверсии поглощенных квантов света в инфицированных листьях огурца (рис. 3).

Установлено, что ответной реакцией растений огурца на инфицирование является повышение количества поглощенной энергии возбуждения, рассеивающейся в виде тепла, что приводит к росту уровня нефотохимического тушения флуоресценции Хл *a* ( $qN$ ) (рис. 4).

Известно, что одним из факторов, обуславливающих нефотохимическое тушение, является перераспределение энергии возбуждения между фотосистемами в пользу ФС 1 (spillover) при фосфорилировании белков светособирающего комплекса, что вызывает уменьшение количества квантов света, поглощаемых антенной ФС 2, и приводит к повышению  $qN$ . Однако, если бы это

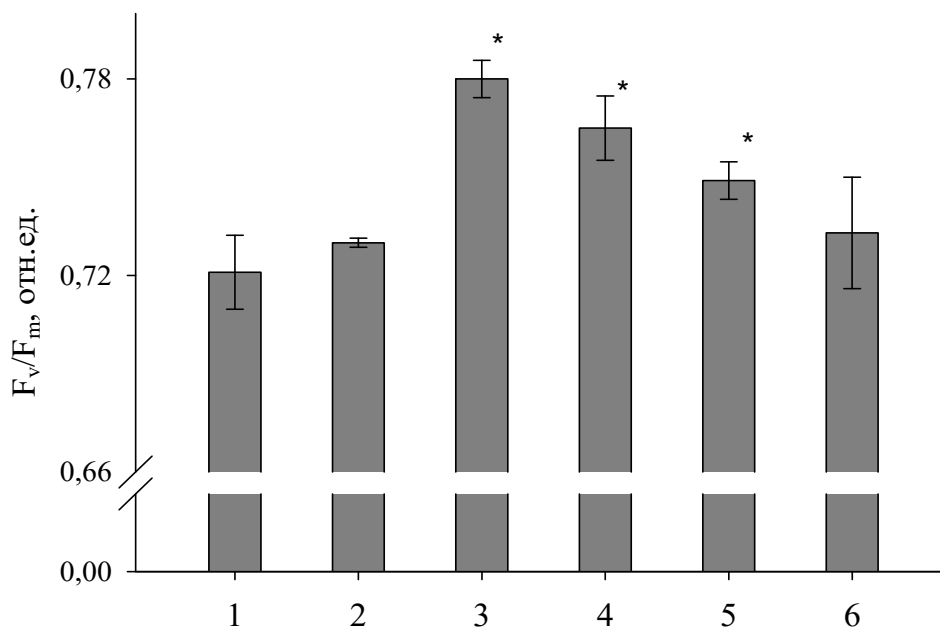


Рис. 2. Влияние иммуномодуляторов на уровень потенциального квантового выхода фотохимических реакций ФС 2 в листьях огурца, инфицированных патогенным грибом *F. oxysporum*: 1, 2 – контроль (1 – без обработки, 2 – *F. oxysporum*); 3 – ВПИ + АМК + *F. oxysporum*; 4 – ВПИ + ГК + *F. oxysporum*; 5 – ВПИ + СК + *F. oxysporum*; 6 – ВПИ + (АМК + ГК + СК) + *F. oxysporum*

Fig. 2. Influence of immune modulators on the level of a potential quantum yield of PhS 2 photochemical reactions in the cucumber leaves infected with a pathogenic fungus of *F. oxysporum*: 1, 2 – control (1 – without treatment, 2 – infected with *F. oxysporum*); 3 – WSP + BABA + *F. oxysporum*; 4 – WSP + GK + *F. oxysporum*; 5 – WSP + SA + *F. oxysporum*; 6 – WSP + (BABA + GK + SA) + *F. oxysporum*

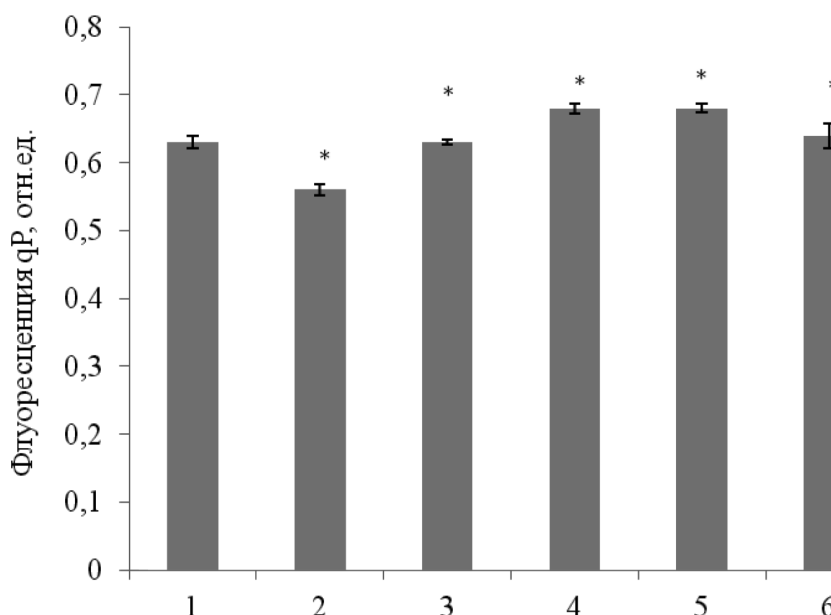


Рис. 3. Влияние иммуномодуляторов на фотохимическое тушение флуоресценции (*qP*) в листьях огурца, инфицированных патогенным грибом *F. oxysporum*: 1 – контроль; 2 – *F. oxysporum*; 3 – ВПИ + АМК + *F. oxysporum*; 4 – ВПИ + ГК + *F. oxysporum*; 5 – ВПИ + СК + *F. oxysporum*; 6 – ВПИ + (АМК + ГК + СК) + *F. oxysporum*

Fig. 3. Influence of immune modulators on photochemical quenching of fluorescence in cucumber leaves infected with pathogenic fungus *F. oxysporum*: 1 – control (without treatment); 2 – control infected with *F. oxysporum*; 3 – WSP + BABA + *F. oxysporum*; 4 – WSP + GK + *F. oxysporum*; 5 – WSP + SA + *F. oxysporum*; 6 – WSP + (BABA + GK + SA) + *F. oxysporum*

имело место при поражении растений огурца *Fusarium oxysporum*, следовало бы ожидать увеличения базовой флуоресценции Хл *a* ( $F_0$ ) из антенных комплексов, чего в данном эксперименте не обнаружено. Поэтому можно предположить, что уменьшение доли энергии, используемой в фотохимических реакциях, связано, скорее, со снижением активности транспорта электронов через ФС 2, чем с тушением энергии возбуждения Хл в антенных комплексах. Естественно, нельзя исключить и регуляторную роль  $\Delta pH$  в этом процессе. Возможно, что фактором, способствующим увеличению параметра  $qN$ , является также вызванное действием патогенного токсина резкое увеличение проницаемости клеточных мембран, приводящее к изменению рН внутритилакоидного пространства [21]. В инфицированных растениях, предварительно обработанных иммуномодуляторами ГК и СК, наблюдалось статистически достоверное ослабление нефотохимического тушения флуоресценции Хл *a* (рис. 4). Вместе с тем не выявлено статистически достоверных различий по уровню  $qN$  между инфицированными растениями и растениями, обработанными АМК и смесью иммуномодуляторов. Данный результат указывает на защитную роль ГК и СК в поддержании стабильности фотосинтетических мембран, что обеспечивает нормальное протекание фотохимических реакций ФС 2 в инфицированных листьях огурца.

Для характеристики развития окислительных процессов в растениях огурца в условиях биотического стресса определяли содержание МДА, количество которого характеризует интенсивность ПОЛ и является одним из важнейших показателей устойчивости растений. Вместе с тем продукты ПОЛ могут являться как индикаторами, так и первичными медиаторами стресса как особого состояния клетки, которое может привести к увеличению ее резистентности. Показано, что в условиях инфицирования *Fusarium oxysporum* интенсивность ПОЛ в растениях огурца повышалась на 35 % по сравнению с контрольным уровнем (табл. 2). Предобработка листьев огурца препаратами, содержащими модуляторы иммунного ответа АМК, ГК и смесь (СК + АМК + ГК) перед заражением *Fusarium oxysporum*, способствовала снижению уровня ПОЛ по отношению к инфицированному контролю, однако активность протекания процессов перекисления липидов оставалась на высоком уровне, превышающем контрольные значения

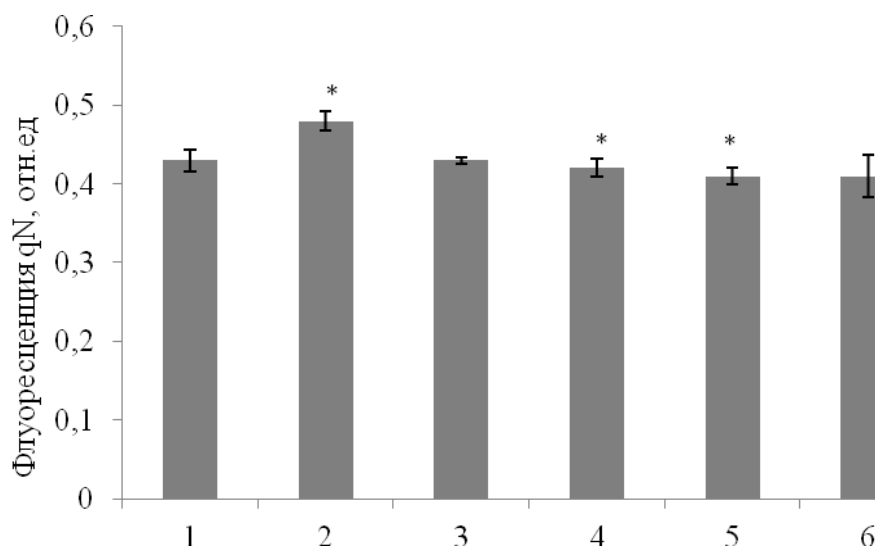


Рис. 4. Влияние иммуномодуляторов на нефотохимическое тушение флуоресценции ( $qN$ ) в листьях огурца, инфицированных патогенным грибом *F. oxysporum*: 1 – контроль; 2 – *F. oxysporum*; 3 – ВПИ + АМК + *F. oxysporum*; 4 – ВПИ + ГК + *F. oxysporum*; 5 – ВПИ + СК + *F. oxysporum*; 6 – ВПИ + (АМК + ГК + СК) + *F. oxysporum*

Fig. 4. Influence of immune modulators on non-photochemical quenching of fluorescence in cucumber leaves infected with pathogenic fungus *F. oxysporum*: 1 – control (without treatment); 2 – control infected with *F. oxysporum*; 3 – WSP + BABA + *F. oxysporum*; 4 – WSP + GK + *F. oxysporum*; 5 – WSP + SA + *F. oxysporum*; 6 – WSP + (BABA + GK + SA) + *F. oxysporum*

(табл. 2). В случае предобработки растений огурца СК происходило увеличение количества конечных продуктов ПОЛ в инфицированных растениях огурца (табл. 2).

Известно, что важную роль в регуляции взаимоотношений в системе растение – патоген играют АФК, которые рассматриваются одновременно и как маркеры стрессового состояния, и как сигнальные посредники, необходимые для развития адаптивного ответа [22]. Определение общего уровня АФК в листьях огурца в условиях биотического стресса проводили флуоресцентным методом с помощью ДХФ, который дает представление о суммарном содержании АФК без идентификации их отдельных форм. Из табл. 2 видно, что в условиях инфицирования происходит повышение содержания АФК в листьях на 12 %. Все иммуномодуляторы способствовали усилению генерации АФК в инфицированных растениях огурца (табл. 2).

Таблица 2. Влияние индукторов иммунитета АМК, ГК, СК и их смеси на показатели окислительного стресса в листьях огурца, инфицированных *Fusarium oxysporum*

Table 2. Influence of immunity inductors BABA, GK, SA and their mixture on oxidative stress parameters in cucumber leaves infected with *Fusarium oxysporum*

Вариант опыта	Содержание МДА, нмоль/мг сырой массы	Флуоресценция ДХФ, отн. ед/г сырой массы	Содержание H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , отн. ед.
Контроль	3,49 ± 0,3	435,18 ± 27,02	2,60 ± 0,05
<i>F. oxysporum</i>	5,52 ± 0,37*	487,68 ± 24,28	3,03 ± 0,01*
АМК + <i>F. oxysporum</i>	4,95 ± 0,06*	695,74 ± 15,46*	2,26 ± 0,09*
ГК + <i>F. oxysporum</i>	4,89 ± 0,08*	745,96 ± 6,915*	2,26 ± 0,09*
СК + <i>F. oxysporum</i>	5,95 ± 0,15*	915,46 ± 168,31*	2,30 ± 0,09*
(АМК + ГК + СК) + <i>F. oxysporum</i>	4,99 ± 0,05*	927,7 ± 98,05*	–

По всей видимости, повышение содержания АФК под действием иммуномодуляторов в инфицированных растениях огурца является одним из звеньев в цепи событий, приводящих к возрастанию устойчивости растений к фузариозной инфекции, так как известно, что кроме деструктивной роли АФК могут выполнять сигнальную функцию, необходимую для формирования системной устойчивости, а также оказывать прямое подавляющее действие на развитие патогенных микроорганизмов [22, 23]. Известно, что развитие или подавление защитных реакций в растительном организме зависит в первую очередь от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в зоне контакта двух противоборствующих организмов. Уровень пероксида водорода повышался в листьях, зараженных патогенным грибом *Fusarium oxysporum* растений огурца (табл. 2). В результате предобработки растений огурца иммуномодуляторами наблюдали снижение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до контрольного уровня (табл. 2). Таким образом, защитный эффект иммуномодуляторов проявлялся также по показателям, характеризующим интенсивность окислительного стресса в инфицированных листьях огурца.

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что дезорганизирующее влияние патогенного гриба *Fusarium oxysporum* в растениях огурца проявляется в снижении содержания фотосинтетических пигментов и функциональной активности ФС 2 в мембранах хлоропластов, а также в изменении характера распределения поглощенной световой энергии, что приводит к снижению интенсивности фотохимической конверсии и усилению нефотохимического тушения флуоресценции Хл. При этом интенсивность процессов ПОЛ усиливается. Применение иммуномодуляторов АМК, ГК и СК способствует усилению адаптивных свойств фотосинтетического аппарата, а также снижению активности окислительных процессов в инфицированных листьях огурца, что свидетельствует о защитной роли этих препаратов и создает научную основу для их использования с целью повышения иммунного статуса растений огурца при инфицировании грибом *Fusarium oxysporum*.

## Список использованных источников

1. Пересыпкин, В. Ф. Сельскохозяйственная фитопатология / В. Ф. Пересыпкин. – М. : Агропромиздат, 1989. – 480 с.
2. Препараты нового поколения для защиты растений / Л. Ф. Горовой [и др.]. – М. : Наука, 2010. – 45 с.
3. Поликсенова, В. Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) / В. Д. Поликсенова // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2009. – № 1. – С. 48–60.
4. Молодченкова, О. О. Предполагаемые функции салициловой кислоты в растениях / О. О. Молодченкова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2001. – Т. 33, № 6. – С. 463–473.
5. Тютюрев, С. Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам / С. Л. Тютюрев // Вестн. защиты растений. – 2015. – № 1. – С. 3–13.
6. Cohen, Y. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by dl-3-amino-n-butanolic acids / Y. Cohen // Phytopathology. – 1994. – Vol. 84, N 1. – P. 55–59. <https://doi.org/10.1094/phyto-84-55>
7. A cell wall glucan elicitor induces resistance in taro against phytophthora leaf blight / S. Sriram [et al.] // J. Plant Dis. Protect. – 2003. – Vol. 110, N 1. – P. 17–26.
8. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco / O. Klarzynski [et al.] // Plant Physiol. – 2000. – Vol. 124, N 3. – P. 1027–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1027>
9. Дьяков, Ю. Т. Фундаментальная фитопатология / Ю. Т. Дьяков. – М. : Красанд, 2012. – 512 с.
10. Шлык, А. А. Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений : сб. ст. / отв. ред. О. А. Павлинова. – М., 1971. – С. 154–170.
11. Кабашникова, Л. Активация синтеза фенольных соединений в каллусной культуре красной фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) с помощью экзогенной салициловой кислоты / Л. Кабашникова, В. Н. Макаров, Г. Е. Савченко // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира : материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 85-летию Центр. ботан. сада НАН Беларуси (Минск, 6–8 июня 2017 г.) / Центр. ботан. сад НАН Беларуси ; ред. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2017. – С. 218–221.
12. Krause, G. H. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics / G. H. Krause, E. Weis // Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol. – 1991. – Vol. 42, N 1. – P. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
13. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М. Н. Мерзляк. – М. : ВИНТИ, 1989. – 168 с. – (Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений ; Т. 6).
14. Heath, R. L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation / R. L. Heath, L. Packer // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – Vol. 125, N 1. – P. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
15. LeBel, C. P. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress / C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy // Chem. Res. Toxicol. – 1992. – Vol. 5, N 2. – P. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
16. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dehydroxyphenoxazine derivative / J. G. Mohanty [et al.] // J. Immunol. Meth. – 1997. – Vol. 202, N 2. – P. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
17. Карапетян, Н. В. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений / Н. В. Карапетян, Н. Г. Бухов // Физиология растений. – 1986. – Т. 33, № 5. – С. 1013–1026.
18. Кабашникова, Л. Ф. Фотосинтетический аппарата и стресс у растений / Л. Ф. Кабашникова. – Минск : Беларуская навука, 2014. – 267 с.
19. Maxwell, K. Chlorophyll fluorescence – a practical guide / K. Maxwell, G. N. Johnson // J. Exp. Bot. – 2000. – Vol. 51, N 345. – P. 659–668. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
20. Тукеева, М. И. Фотохимические реакции хлоропластов табака при вирусной инфекции / М. И. Тукеева, И. А. Перова, К. Чомор // Физиология и химия здорового и больного растения / Моск. гос. ун-т. – М., 1970. – С. 331–349.
21. Тарчевский, И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М. : Наука, 2002. – 294 с.
22. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В. Д. Креславский [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163–178.
23. Тютюрев, С. Л. Научные основы индуцированной болезнеустойчивости растений / С. Л. Тютюрев. – СПб. : б. и., 2002. – 328 с.

## References

1. Peresyipkin V. F. *Agricultural Phytopathology*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1989. 480 p. (in Russian).
2. Gorovoi L. F., Koshevskii I. I., Teslyuk V. V., Red'ko V. V. *Preparations of a new generation for plant protection*. Moscow, Nauka Publ., 2010. 45 p. (in Russian).
3. Poliksenova V. D. The induced resistance of plants to pathogens and abiotic stressful factors (by sample of tomato). *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya* [Bulletin of the Belarusian State University. Series 2, Chemistry. Biology. Geography], 2009, no. 1, pp. 48–60 (in Russian).
4. Molodchenkova O. O. Assumed functions of salicylic acid in plants. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants], 2001, vol. 33, no. 6, pp. 463–473 (in Russian).



5. Tyuterev S. L. *Ecologically safe inductors of plant resistance to diseases and physiological stresses*. *Vestnik zashchity rastenii* [Bulletin of plant protection], 2015, no. 1, pp. 3–13 (in Russian).
6. Cohen Y. local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by dl-3-amino-n-butanoic acids. *Phytopathology*, 1994, vol. 84, no. 1, pp. 55–59. <https://doi.org/10.1094/phyto-84-55>
7. Sriram S., Misra R. S., Sahu A. K., Maheswari S. K. A cell wall glucan elicitor induces resistance in taro against phytophthora leaf blight. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2003, vol. 110, no. 1, pp. 17–26.
8. Klarzynski O., Plesse B., Joubert J. M., Yvin J.-C., Kopp M., Kloareg B., Fritig B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, 2000, vol. 124, no. 3, pp. 1027–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1027>
9. D'yakov Yu. T. *Fundamental phytopathology*. M., Krasand Publ., 2012. 512 p. (in Russian).
10. Shlyk A. A. Determination of chlorophylls and carotenoids in extracts of green leaves. *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii: sbornik statei* [Biochemical methods in plant physiology: a collection of articles]. Moscow, Nauka Publ., 1971, pp. 154–170 (in Russian).
11. Kabashnikova L., Makarov B., Savchenko G. Activation of the synthesis of phenolic compounds in the callus culture of red beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by means of exogenous salicylic acid. *Rol' botanicheskikh sadov i dendrariyev v sokhraneni, izucheni i ustoychivom ispol'zovanii raznoobraziya rastitel'nogo mira: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu Tsentral'nogo botanicheskogo sada Natsional'noi akademii nauk Belarusi (Minsk, 6–8 iyunya 2017 g.)* [The role of botanical gardens and arboreta in the conservation, study and sustainable use of plant world diversity: proceedings of the International scientific conference dedicated to the 85th anniversary of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (Minsk, June 6–8, 2017)]. Minsk, 2017, pp. 218–221 (in Russian).
12. Krause G. H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, vol. 42, no. 1, pp. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
13. Merzlyak M. N. *Free radical oxidation and degradation of lipids in membranes of plants*. Moscow, All-Russian Institute of Scientific and Technical Information of the Russian Academy of Sciences, 1989. 168 p. (in Russian).
14. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, vol. 125, no. 1, pp. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
15. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 1992, vol. 5, no. 2, pp. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
16. Mohanty J. G., Jaffe J. S., Schulman E. S., Raible D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dehydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*, 1997, vol. 202, no. 2, pp. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
17. Karapetyan N. V., Bukhov N. G. Variable fluorescence of a chlorophyll as indicator of a physiological condition of plants. *Fiziologiya rastenii* [Physiology of Plants], 1986, vol. 33, no. 5, pp. 1013–1026 (in Russian).
18. Kabashnikova L. F. *Photosynthetic apparatus and stress in plants*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2014. 267 p. (in Russian).
19. Maxwell K., Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, vol. 51, no. 345, pp. 659–668. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
20. Tukeeva M. I., Perova I. A., Chomor K. Photochemical reactions of chloroplasts of tobacco at a viral infection. *Fiziologiya i khimiya zdorovogo i bol'nogo rasteniya* [Physiology and chemistry of a healthy and sick plant]. Moscow, 1970, pp. 331–349 (in Russian).
21. Tarchevskii I. A. *The signal systems of plant cells*. Moscow, Nauka Publ., 2002. 294 p. (in Russian).
22. Kreslavski V. D., Allakhverdiev S. I., Los D. A., Kuznetsov V. V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, vol. 59, no. 2, pp. 141–154. <https://doi.org/10.1134/s1021443712020057>
23. Tyuterev S. L. *Scientific basis of induced disease resistance of plants*. St. Petersburg, s. n., 2002. 328 p. (in Russian).

## Информация об авторах

*Абрамчик Лариса Михайловна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [lmabramchik@mail.ru](mailto:lmabramchik@mail.ru)

*Доманская Ирина Николаевна* – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [domanino7@mail.ru](mailto:domanino7@mail.ru)

*Макаров Владимир Николаевич* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

*Сердюченко Елена Викторовна* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [temporo@mail.ru](mailto:temporo@mail.ru)

## Information about the authors

*Larisa M. Abramchik* – 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: [lmabramchik@mail.ru](mailto:lmabramchik@mail.ru)

*Irina N. Domanskaya* – 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: [domanino7@mail.ru](mailto:domanino7@mail.ru)

*Vladimir N. Makarov* – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

*Elena V. Serdiuchenko* – 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: [temporo@mail.ru](mailto:temporo@mail.ru)

*Бачище Татьяна Сергеевна* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatsiana.bachyshch@gmail.com

*Кондратьева Виктория Викторовна* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vislika@mail.ru

*Шпилевский Святослав Николаевич* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: metanova@mail.ru

*Довбнюк Юлия Николаевна* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: y.dovbniyk@gmail.com

*Кабашникова Людмила Федоровна* – 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: kabashnikova@ibp.org.by

*Tatsiana S. Bachyshcha* – 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: tatsiana.bachyshch@gmail.com

*Viktoria V. Kondratyeva* – 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: vislika@mail.ru

*Sviatoslav N. Shpilevski* – 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: metanova@mail.ru

*Yulia N. Dovbniuk* – 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: y.dovbniyk@gmail.com

*Luidmila F. Kabashnikova* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Assistant 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: kabashnikova@ibp.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 547.913:543.544.32

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-147-155>

Поступила в редакцию 13.08.2018

Received 13.08.2018

Н. А. Коваленко<sup>1</sup>, Г. Н. Супиченко<sup>1</sup>, В. Н. Леонтьев<sup>1</sup>, А. Г. Шутова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

## СОСТАВ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ РАСТЕНИЙ РОДА *AGASTACHE*, ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ

**Аннотация.** Методом паровой дистилляции получены образцы эфирных масел растений рода *Agastache* L., интродуцированных в Республике Беларусь. С помощью газожидкостной хроматографии в эфирных маслах растений *Agastache pallidiflora* ssp. *neomexicana* L., *Agastache aurantiaca* L., *Agastache mexicana* L., *Agastache foeniculum* L. идентифицировано и определено более 20 компонентов.

Основными компонентами являются лимонен, 1,8-цинеол, ментон, изоментон, метилхавикол, метилэвгенол. Количественный состав образцов эфирных масел зависит от вида растительного сырья. Главным компонентом эфирных масел *Agastache pallidiflora* ssp. *neomexicana* L. и *Agastache aurantiaca* L. является ментон (40–65 %). Эфирное масло *Agastache foeniculum* L. обогащено пулегоном и изоментоном, а в эфирном масле *Agastache mexicana* L. преобладают метилхавикол и метилэвгенол. Показаны особенности распределения энантиомеров лимонена, ментона и пулегона. Независимо от вида растений исследованные образцы являются оптически чистыми по (+)-пулегону. Распределение энантиомеров лимонена и ментона является индивидуальной характеристикой исследованных эфирных масел *Agastache* L.

**Ключевые слова:** *Agastache* L., эфирные масла, энантиомеры, газожидкостная хроматография

**Для цитирования:** Состав эфирных масел растений рода *Agastache*, интродуцированных в Беларуси / Н. А. Коваленко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 147–155. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-147-155>

N. A. Kovalenko<sup>1</sup>, G. N. Supichenko<sup>1</sup>, V. N. Leontiev<sup>1</sup>, A. G. Shutova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

## COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF PLANTS SOME SPECIES OF THE GENUS *AGASTACHE* L. INTRODUCED IN BELARUS

**Abstract.** The steam distillation method was used to obtain samples of essential oil of some species of genus *Agastache* L. introduced in Belarus. More than 20 components have been identified and determined in the essential oils of *Agastache pallidiflora* ssp. *neomexicana* L., *Agastache aurantiaca* L., *Agastache mexicana* L., *Agastache foeniculum* L. by gas liquid chromatography.

The quantitative composition of the samples of essential oils depends on the type of plant material. The main its components are limonene, 1,8-cineol, mentone, isomentone, methyl chavicol, methyleugenol. The main component of essential oils *Agastache pallidiflora* ssp. *neomexicana* L. и *Agastache aurantiaca* L. is mentone (40–65 %). Essential oil *Agastache foeniculum* L. is enriched with pulegone and isomentone. Methyl chavicol and methyleugenol dominate in *Agastache mexicana* essential oil. Distribution of the enantiomers of limonene, menthone and pulegone are shown. Regardless of the plant species, the samples are optically pure in the (+)-pulegone. The nature of the distribution of the enantiomers of limonene and menthone is an individual characteristic of the studied *Agastache* L. essential oils.

**Keywords:** *Agastache* L., essential oils, enantiomers, gas-chromatography

**For citation:** Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Leontiev V. N., Shutova A. G. Composition of essential oil of plants some species of the genus *Agastache* L. introduced in Belarus. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 147–155 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-147-155>

**Введение.** В настоящее время при лечении многих хронических заболеваний наряду с высокоэффективными синтетическими лекарственными средствами широко используются препараты растительного происхождения. Белорусский рынок фармацевтических препаратов наводнен различными лекарствами зарубежных фирм. Вместе с тем на территории Республики Беларусь возможно культивирование лекарственных и эфиромасличных растений, обладающих антими-

кробными, фунгицидными, противовирусными и рядом других свойств. Задача расширения ассортимента фитопрепаратов для профилактики и лечения различных заболеваний может быть успешно решена путем использования доступного отечественного растительного сырья.

Перспективным фитосырьем в почвенно-климатических условиях Республики Беларусь являются пряно-ароматические растения рода *Agastache* L. [1–3].

Растения рода *Agastache*, насчитывающего в настоящее время 29 таксонов, относятся к семейству Губоцветные (Lamiaceae). К наиболее изученным представителям рода *Agastache* относятся *A. foeniculum* (Pursh) Kuntze (syn.: *Lophanthus foeniculum* Fisch. & C. A. Mey, *Lophanthus anisatus* (Nutt.) Benth.), *A. rugosa* (Fisch. & C. A. Mey.) Kuntze (syn.: *Lophanthus rugosus* Fisch. & C. A. Mey, *Elsholtzia monostachys* H. Lev. & Vaniot) [2–8]. Большая часть видов распространена в умеренных регионах Северной Америки и Юго-Восточной Азии. *Agastache foeniculum* L. (многоколосник фенхельный) происходит из Северной Америки (север США, юг Канады) и в природе практически не встречается, но сохранился в культуре по всему миру. Растения распространены на Дальнем Востоке, в Ставропольском крае, Саратовской и Астраханской областях, в Молдавии и на Украине. На территории южной части США и Мексики произрастают многоколосник золотистый (*Agastache aurantiaca* L.) и многоколосник мексиканский (*Agastache mexicana* L.).

Многоколосники являются неприхотливыми растениями и практически не поражаются вредителями и болезнями. Они относятся к многолетникам, однако некоторые виды, в частности *Agastache aurantiaca* L., в связи с недостаточной морозостойкостью плохо зимуют в условиях Беларуси. Поскольку растения рода *Agastache* в большинстве случаев в середине первого года своего развития вступают в генеративный период, многоколосники могут выращиваться в однолетней культуре с получением достаточного количества цветущих растений для заготовки и выделения эфирного масла.

В связи с тем, что за исключением многоколосника морщинистого другие представители рода *Agastache* не являются фармакопейными, их эфирные масла недостаточно изучены как по компонентному составу, так и в плане стандартизации растительного сырья.

В литературе имеются немногочисленные сведения о компонентном составе эфирных масел растений рода *Agastache*, интродуцированных на территории Беларуси и ряда европейских стран. Наиболее изученным является многоколосник морщинистый *Agastache rugosa* L. [4–7, 9]. Изучение в Центральном ботаническом саду (ЦБС) НАН Беларуси многоколосника морщинистого в качестве перспективного лекарственного сырья показало, что в плане приспособления к почвенно-климатическим условиям Беларуси он обладает хорошими адаптационными возможностями, сохраняя при этом высокие биопродукционные показатели и репродуктивные способности [10, 11].

Растения рода *Agastache* являются источником биологически активных соединений, обладающих рядом значимых полезных свойств. Так, эфирное масло *Agastache foeniculum* L. оказывает противовоспалительное, обезболивающее, противосудорожное, противоспазматическое, иммуностимулирующее, радиопротекторное, стимулирующее кроветворение, противомикробное действие. Оно обладает фунгицидной активностью, используется в парфюмерной и пищевой промышленности [12–15]. Многоколосник морщинистый (*Agastache rugosa*) является мощным иммуностимулятором с мягким пролонгированным действием, поэтому его называют северным женьшенем. Эфирные масла *Agastache rugosa* обладают бактерицидными, иммуномоделирующими, гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами. Их используют для нормализации кровяного давления, лечения заболеваний органов дыхания, сердечно-сосудистой дистонии, нейродермита [16, 17].

Сведения о компонентном составе и биологической активности эфирных масел других представителей рода *Agastache* (*Agastache pallidiflora*, *Agastache mexicana*, *Agastache aurantiaca*) из различных географических зон произрастания противоречивы и носят отрывочный характер [4–7, 18].

В настоящее время в публикациях, посвященных компонентному составу летучих вторичных метаболитов растений, особое внимание уделяется оптической активности входящих в их состав соединений, поскольку оптические изомеры органических соединений проявляют раз-

личную биологическую и фармакологическую активность [19–23]. Таких данных по растениям рода *Agastache* в литературе практически не представлено.

Цель настоящей работы – изучение состава и характера распределения энантиомеров компонентов эфирных масел некоторых представителей рода *Agastache*, культивируемых в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси.

**Материалы и методы исследования.** Объектами исследования являлись эфирные масла растений рода *Agastache*, представленные в табл. 1. Эфиромасличное сырье было получено на интродукционном участке отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси. Образцы надземной части растений в фазе массового цветения были собраны в 2017 г.

Таблица 1. Характеристика образцов эфирных масел *Agastache* L.

Table 1. Characteristics of the *Agastache* essential oil samples

№ образца	Таксон	Латинское название таксона	Сорт
1	Многоколосник бледноцветковый	<i>Agastache pallidiflora</i> ssp. <i>neomexicana</i> L.	‘Rose Mint’
2	Многоколосник золотистый	<i>Agastache aurantiaca</i> L.	‘Tango’
3	Многоколосник золотистый	<i>Agastache aurantiaca</i> L.	‘Fragrant Delight’
4	Многоколосник мексиканский	<i>Agastache mexicana</i> L.	‘Sangria’
5	Многоколосник фенхельный	<i>Agastache foeniculum</i> L.	‘Снежок’

Выделение эфирного масла из измельченного свежего растительного сырья проводили методом перегонки с водяным паром по ГОСТу 24027.2-80 с последующей сушкой образцов безводным сульфатом натрия.

Разделение компонентов эфирного масла выполняли на хроматографе «Цвет 800», оснащенном пламенно-ионизационным детектором и оборудованном капиллярной колонкой Cyclosil B (длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, неподвижная фаза – β-циклодекстрин 0,25 мкм), в следующем температурном режиме: изотерма при 70 °С в течение 5 мин, подъем температуры до 115 °С со скоростью 3°/мин, изотерма в течение 20 мин, затем подъем температуры со скоростью 4°/мин до 200 °С, изотерма в течение 10 мин в токе газа-носителя азота. Линейная скорость азота – 16,2 см/с, величина сброса – 1:26, объем вводимой пробы – 0,1 мкл. Временем удерживания несорбирующегося газа считали время выхода пика метана.

Идентификацию энантиомеров компонентов эфирных масел проводили путем сравнения времени удерживания компонентов эфирного масла со временем удерживания эталонных соединений. В отдельных случаях для идентификации компонентов использовали «метод метки».

Количественные определения основных компонентов и их оптических изомеров в эфирных маслах осуществляли методом внутренней нормализации без использования поправочных коэффициентов.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты хроматографического разделения образцов эфирных масел *Agastache* представлены в табл. 2.

Исследованные образцы эфирных масел близки по качественному составу, однако их количественный состав существенно различается и зависит от вида растительного сырья.

По литературным данным [24], у растений рода *Agastache* распространены хемотипы, эфирное масло которых отличается по компонентному составу. Различают четыре хемотипа многоколосника фенхельного, эфирные масла которых обладают запахами мяты, гвоздики, аниса. По результатам наших исследований основными компонентами эфирного масла многоколосника фенхельного (сорт Снежок), являются пулегон, изоментон и лимонен, что позволяет отнести его к изоментонно-пулегоновому хемотипу.

Главным компонентом эфирного масла многоколосника золотистого (‘Tango’ и ‘Fragrant Delight’) является ментон (50–65 %), в меньшей концентрации в масле этих растений присутствует пулегон (25–35 %). Полученные данные позволяют отнести растения *Agastache aurantiaca* L. из коллекции ЦБС НАН Беларуси к ментонно-пулегоновому хемотипу.

Таблица 2. Компонентный состав эфирных масел *Agastache* L.Table 2. Composition of *Agastache* essential oils

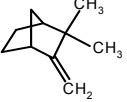
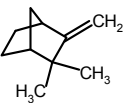


Соединение	Содержание в образцах, %				
	1	2	3	4	5
$\alpha$ -Пинен	1,8	<0,1	<0,1	0,1	–
Камфен	4,0	0,4	0,2	1,0	1,1
Сабинен	1,3	0,4	0,2	0,2	0,2
$\beta$ -Пинен	3,5	<0,1	<0,1	0,2	<0,1
Лимонен	3,1	2,5	4,0	6,5	13,9
1,8-Цинеол	5,3	0,2	0,2	0,2	0,40
Линалоол	–	0,1	<0,1	12,7	<0,1
Ментон	39,7	53,3	65,0	2,0	4,3
Изоментон	0,3	2,9	1,8	0,5	27,2
Камфора	<0,1	0,4	0,3	0,5	–
Метилхавикол	0,1	1,3	1,0	15,1	0,9
Пулегон	8,4	36,3	25,3	1,4	43,3
$\alpha$ -Терпинеол	1,6	0,1	0,1	0,1	–
Карвон	5,9	0,1	0,1	8,5	0,3
Терпенилацетат	–	0,1	0,1	6,1	0,2
Цитраль	–	0,1	–	10,7	0,2
Гераниол	0,3	–	–	1,8	0,2
Метилэвгенол	–	0,2	<0,1	20,8	<0,1
Геранилацетат	0,2	0,2	0,2	–	–
$\beta$ -Кариофиллен	0,7	0,2	0,2	<0,1	0,9
Эвгенол	0,1	<0,1	0,1	0,1	0,2
Кариофиллен-оксид	0,3	<0,1	<0,1	0,1	0,2

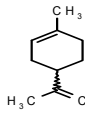
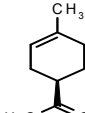

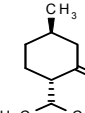
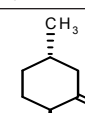
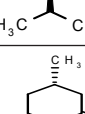
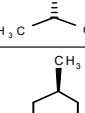
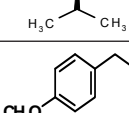
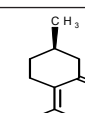
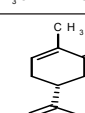
Многоколосник бледноцветковый сорта Rose Mint относится к ментонному хемотипу, так как его эфирное масло обогащено ментоном ( $\approx 40\%$ ), в меньшей концентрации в нем присутствует пулегон ( $\approx 8\%$ ). Однако присутствие  $\alpha$ -терпинеола, геранилацетата и минорных соединений придает запаху эфирного масла оттенок аромата розы.

Существенно отличается по количественному составу эфирное масло *Agastache mexicana* L. (сорт Sangria), мажорными компонентами которого являются метилхавикол (14–16%), метилэвгенол (19–22%) и линалоол (11–13%). По сравнению с эфирными маслами других видов *Agastache* масло многоколосника мексиканского содержит небольшие количества (1–3%) пулегона.

Формулы основных компонентов эфирных масел растений рода *Agastache* представлены в табл. 3.

Таблица 3. Основные идентифицированные компоненты эфирных масел *Agastache* L.Table 3. The main identified components of *Agastache* essential oils

Идентифицированное соединение	Формула	Время выхода из колонки, мин
(–)-Камфен		15,5
(+)-Камфен		15,8
(+)- $\beta$ -Пинен		16,8
(–)- $\beta$ -Пинен		17,3

Идентифицированное соединение	Формула	Время выхода из колонки, мин
(-)-Лимонен		19,2
(+)-Лимонен		19,7
1,8-Цинеол, эвкалиптол		20,2
(-)-Ментон		30,8
(+)-Ментон		31,1
(-)-Изоментон		31,3
(+)-Изоментон		32,3
Метилхавикол, эстрагол		37,1
(+)-Пулегон		43,7
(-)-Карвон		47,5

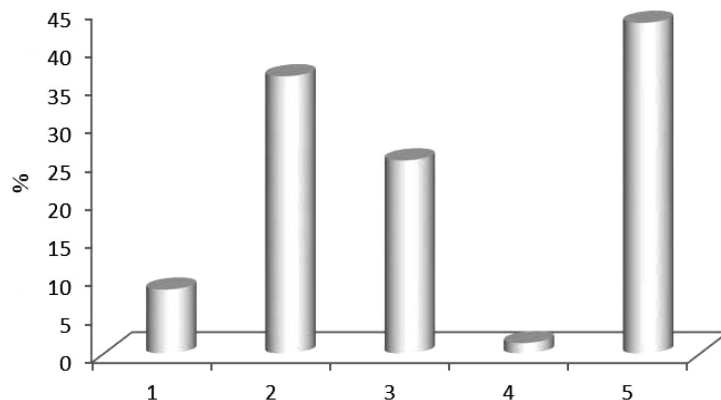
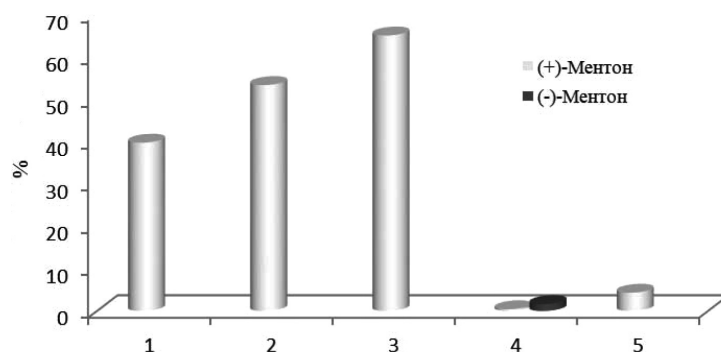
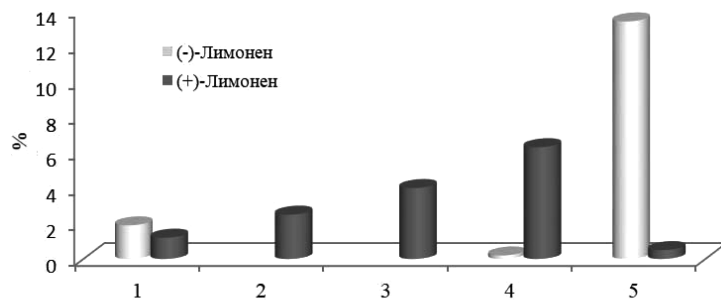
Поскольку оптическая активность входящих в состав эфирных масел веществ оказывает существенное влияние на их биологическую активность, нами изучен характер распределения энантиомеров основных компонентов эфирных масел растений *Agastache*.

Для всех изученных образцов характерна энантиомерная чистота по (+)-пулегону (рис. 1), однако концентрация этого соединения зависит от вида растительного сырья.

Содержание (+)-пулегона в эфирном масле многоколосника фенхельного (сорт Снежок) более чем в 5 раз превышает концентрацию этого компонента в масле многоколосника бледноцветкового ('Rose Mint') и в 25 раз – в образце *Agastache mexicana* (сорт Sangria).

Каждое из исследованных эфирных масел растений *Agastache* характеризуется свойственным ему соотношением энантиомеров ментона. На рис. 2 представлены данные о концентрации энантиомеров ментона в эфирных маслах многоколосников из коллекции ЦБС НАН Беларуси.

В исследованных образцах отмечены существенные различия в характере распределения и концентрации оптических изомеров лимонена (рис. 3).

Рис. 1. Содержание (+)-пулегона в эфирных маслах *Agastache* L.Fig. 1. Content of (+)-pulegone in *Agastache* essential oilsРис. 2. Распределение энантимеров ментона в эфирных маслах *Agastache* L.Fig. 2. Distribution of menthone enantiomers in *Agastache* essential oilsРис. 3. Распределение энантимеров лимонена в эфирных маслах *Agastache* L.Fig. 3. Distribution of limonene enantiomers in essential oils *Agastache*

Масло многоколосника бледноцветкового содержит близкие концентрации право- и левовращающих форм лимонена с небольшим преобладанием S(-)-лимонена. Для эфирных масел многоколосника золотистого ('Tango' и 'Fragrant Delight') характерна энантиомерная чистота по R(+)-лимонену. В то же время характер распределения оптических изомеров лимонена в эфирных маслах многоколосника мексиканского и фенхельного другой. Так, в многоколоснике фенхельном практически весь лимонен представлен левовращающими формами, а для масла многоколосника мексиканского характерно существенное преобладание правовращающих (+)-форм.

**Заключение.** Проведенные с помощью метода газожидкостной хроматографии исследования позволили установить компонентный состав и характер распределения энантиомеров основных компонентов в эфирных маслах некоторых представителей рода *Agastache* из коллекции ЦБС НАН Беларуси.



Особенности распределения энантиомеров лимонена, пулегона и ментона являются индивидуальной характеристикой исследованных эфирных масел *Agastache*.

Полученные данные могут быть использованы для стандартизации и контроля качества эфирных масел лекарственных растений, перспективных для культивирования в Республике Беларусь.

### Список использованных источников

1. Кухарева, Л. В. Ассортимент лекарственных растений перспективных для выращивания в условиях Беларуси / Л. В. Кухарева // Вестн. фармации. – 2007. – № 1. – С. 99–101.
2. Логвиненко, Л. А. Ароматические растения семейства Lamiaceae для фитотерапии / Л. А. Логвиненко, Л. А. Хлыпенко, Н. В. Марко // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4, № 4. – С. 34–47.
3. Применение эфирных масел традиционных растений и нового для России растения – лофанта анисового (*Lophanthus anisatus* Benth.) / Х. А. А. Абделаал [и др.] // Естеств. науки. – 2009. – № 3. – С. 78–86.
4. Zielińska, S. Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae) / S. Zielińska, A. Matkowski // Phytochem Rev. – 2014. – Vol. 13, N 2. – P. 391–416. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9349-1>
5. Charles, D. J. Characterization of essential oil of *Agastache* spp. / D. J. Charles, J. E. Simon, M. P. Widrlechner // J. Agric. Food Chem. – 1991. – Vol. 39, N 11. – P. 1946–1949. <https://doi.org/10.1021/jf00011a011>
6. Wilson, L. A. Headspace analysis of the volatile oils of *Agastache* / L. A. Wilson, N. P. Senechal, M. P. Widrlechner // J. Agric. Food Chem. – 1992. – Vol. 40, N 8. – P. 1362–1366. <https://doi.org/10.1021/jf00020a015>
7. Omidhaigi, R. Essential oil composition of *Agastache* / R. Omidhaigi, F. Sefidkon // J. Ess. Oil Res. – 2003. – Vol. 15, N 1. – P. 52–53. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712265>
8. Биологически активные вещества и антиоксидантная активность растений рода *Agastache* Clayton ex Gron. (Lamiaceae L.), культивируемых в условиях Среднего Урала / М. А. Мяделец [и др.] // Химия раст. сырья. – 2014. – № 4. – С. 147–152.
9. Динамика накопления и компонентный состав эфирного масла *Agastache rugosa* L. / Н. А. Коваленко [и др.] // Тр. Белорус. гос. технол. ун-та. Сер. 4. Химия и технология орган. веществ. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 30–33.
10. Особенности сезонного накопления фенольных соединений в лекарственном сырье многоколосника морщинистого *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey) в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 1997. – № 3. – С. 25–31.
11. Особенности сезонного накопления органических кислот и терпеноидов в лекарственном сырье многоколосника морщинистого *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey) / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 1998. – № 1. – С. 5–11.
12. Изучение химического состава и противогрибковой активности эфирного масла *Lophanthus anisatum* Benth. / А. В. Великородов [и др.] // Химия раст. сырья. – 2010. – № 2. – С. 143–146.
13. Phytochemical, antibacterial, antifungal and antioxidant properties of *Agastache foeniculum* essential oil / M. Hashemil [et al.] // J. Chem. Health Risks. – 2017. – Vol. 7, N 2. – P. 95–104.
14. Ebadollahi, A. Chemical constituents and toxicity of *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze essential oil against two stored-product insect pests / A. Ebadollahi // Chil. J. Agric. Res. – 2011. – Vol. 71, N 2. – P. 212–217. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392011000200005>
15. Toxicity of essential oil of *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze to *Oryzaephilus surinamensis* L. and *Lasioderma serricornis* F. / A. Ebadollahi [et al.] // J. Plant Protection Res. – 2010. – Vol. 50, N 2. – P. 215–219. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0037-x>
16. Shin, S. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole / S. Shin, C.-A. Kang // Lett. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 36, N 2. – P. 111–115. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01271.x>
17. Chemical composition and nematocidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita* / H. Li [et al.] // Molecules. – 2013. – Vol. 18, N 4. – P. 4170–4180. <https://doi.org/10.3390/molecules18044170>
18. Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens / Z. N. Juárez [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2015. – Vol. 74. – P. 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.058>
19. Смирнова, Н. Г. Оптическая изомерия и биологическая активность лекарственных средств / Н. Г. Смирнова, Г. Н. Гильдеева, В. Г. Кукес // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, Химия. – 2012. – Т. 53, № 3. – С. 147–156.
20. Ткачев, А. В. Проблемы качественного и количественного анализа летучих веществ растений / А. В. Ткачев // Химия раст. сырья. – 2017. – № 3. – С. 5–37.
21. Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils / D. P. de Sousa [et al.] // Z. Naturforsch C. – 2011. – Vol. 66, N 7–8. – P. 353–359. <https://doi.org/10.5560/znc.2011.66c0353>
22. Ruiz del Castillo, M. L. Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita* / M. L. Ruiz del Castillo, G. P. Blanch, M. Herraiz // J. Chromatogr. A. – 2004. – Vol. 1054, N 1–2. – P. 87–93. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(04\)01405-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(04)01405-0)
23. Christensson, J. B. Fragrance allergens, overview with a focus on recent developments and understanding of abiotic and biotic activation / J. B. Christensson, L. Hagvall, A. T. Karlberg // Cosmetics. – 2016. – Vol. 3, N 2. – Art. 19. <https://doi.org/10.3390/cosmetics3020019>
24. Хлыпенко, Л. А. Итоги интродукции рода *Agastache* в условиях Южного берега Крыма / Л. А. Хлыпенко, Т. И. Орел // Сб. науч. тр. Гос. Никит. ботан. сада. – 2011. – № 133. – С. 230–236.

## References

1. Kukhareva L. V. Assortment of medicinal plants that are promising for growing in Belarus. *Vestnik farmatsii = Bulletin of Pharmacy*, 2007, no. 1, pp. 99–101 (in Russian).
2. Logvinenko L. A., Khlypenko L. A., Marko N. V. Aromatic plants of the family Lamiaceae for phytotherapy. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy and Pharmacology*, 2016, vol. 5, no. 4, pp. 34–47 (in Russian).
3. Abdelaal Kh. A. A., Velikorodov A. V., Tyrkov A. G., Fursov V. N. The use of essential oils of traditional plants and the new plant for Russia – lophanth anisate (*Lophanthus anisatus* Benth.). *Estestvennye nauki = Natural Sciences*, 2009, no. 3, pp. 78–86 (in Russian).
4. Zielińska S., Matkowski A. Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochemistry Reviews*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 391–416. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9349-1>
5. Charles D. J., Simon J. E., Widrlechner M. P. Characterization of essential oil of *Agastache* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, vol. 39, no. 11, pp. 1946–1949. <https://doi.org/10.1021/jf00011a011>
6. Wilson L. A., Senechal N. P., Widrlechner M. P. *Headpace analysis of the volatile oils of Agastache*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, vol. 40, no. 8, pp. 1362–1366. <https://doi.org/10.1021/jf00020a015>
7. Omidhaigi R., Sefidkon F. Essential oil composition of *Agastache*. *Journal of Essential Oil Research*, 2003, vol. 15, no. 1, pp. 52–53. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712265>
8. Myadelets M. A., Kukushkina T. A., Vorob'eva T. A., Shaldaeva T. M. Biologically active substances and antioxidant activity of plants of the genus *Agastache* Clayton ex Gron. (*Lamiaceae* L.) cultivated in the Middle Urals. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2014, no. 4, pp. 147–152 (in Russian).
9. Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Leont'ev V. N., Shutova A. G. Dynamics of accumulation and component composition of essential oil *Agastache rugosa* L. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya 4. Khimiya i tekhnologiya organicheskikh veshchestv* [Proceedings of the Belarusian State Technological University. Series 4. Chemistry and technology of organic substances], 2008, vol. 1, no. 4, pp. 30–33 (in Russian).
10. Rupasova Zh. A., Sidorovich E. A., Kukhareva L. V., Plenina L. V., Khlyustov S. V., Ignatenko V. A., Vasilevskaya T. I. Peculiarities of seasonal accumulation of phenolic compounds in the medicinal raw material of the wrinkled *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey) in the conditions of Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 1997, no. 3, pp. 25–31 (in Russian).
11. Rupasova Zh. A., Sidorovich E. A., Kukhareva L. V., Plenina L.V., Khlyustov S. V., Varavina N. P. [et al.]. Peculiarities of seasonal accumulation of organic acids and terpenoids in the medicinal raw material of the wrinkled *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey) in the conditions of Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 1998, no. 1, pp. 5–11 (in Russian).
12. Velikorodov A. V., Kovalev V. B., Tyrkov A. G., Degtyarev O. V. Study of the chemical composition and antifungal activity of essential oil *Lophanthus anisatum* Benth. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2010, no. 2, pp. 143–146 (in Russian).
13. Hashemi M., Ehsani A., Hassani A., Afshari A., Aminzare M., Sahranavard T., Azimzadeh Z. Phytochemical, antibacterial, antifungal and antioxidant properties of *Agastache foeniculum* essential oil. *Journal of Chemical Health Risks*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 95–104.
14. Ebadollahi A. Chemical constituents and toxicity of *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze essential oil against two stored-product insect pests. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2011, vol. 71, no. 2, pp. 212–217. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392011000200005>
15. Ebadollahi A., Safaralizadeh M. H., Pourmirza A. A., Gheibi S. Toxicity of essential oil of *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze to *Oryzaephilus surinamensis* L. and *Lasioderma serricornis* F. *Journal of Plant Protection Research*, 2010, vol. 50, no. 2, pp. 215–219. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0037-x>
16. Shin S., Kang C.-A. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, vol. 36, no. 2, pp. 111–115. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01271.x>
17. Li H., Liu Q., Liu Z., Du S., Deng Z. Chemical composition and nematicidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita*. *Molecules*, 2013, vol. 18, no. 4, pp. 4170–4180. <https://doi.org/10.3390/molecules18044170>
18. Juárez Z. N., Hernández L. R., Bach H., Sánchez-Arreola E., Bach H. Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Industrial Crops and Products*, 2015, vol. 74, pp. 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.058>
19. Smirnova N. G., Gil'deeva G. N., Kukes V. G. Optical isomerism and biological activity of pharmaceutical preparations. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2012, vol. 67, no. 3, pp. 95–102. <https://doi.org/10.3103%2FS002713141203008X>
20. Tkachev A. V. Problems of qualitative and quantitative analysis of volatile plant substances. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2017, no. 3, pp. 5–37 (in Russian).
21. De Sousa D. P., Nóbrega F. F. F., de Lima M. R. V., de Almeida R. N. Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2011, vol. 66, no. 7–8, pp. 353–359. <https://doi.org/10.5560/znc.2011.66c0353>
22. Ruiz del Castillo M. L., Blanch G. P., Herraiz M. Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1054, no. 1–2, pp. 87–93. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(04\)01405-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(04)01405-0)

23. Christensson J. B., Hagvall L., Karlberg A. T. Fragrance allergens, overview with a focus on recent developments and understanding of abiotic and biotic activation. *Cosmetics*, 2016, vol. 3, no. 2, art. 19. <https://doi.org/10.3390/cosmetics3020019>

24. Khlypenko L. A., Orel T. I. The results of introduction of genus *Agastache* Horsemint in conditions of a Southern coast of Crimea. *Sbornik nauchnykh trudov Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada* [Collection of scientific works of the State Nikitsky Botanical Garden], 2011, no. 133, pp. 230–236 (in Russian).

### Информация об авторах

*Коваленко Наталья Александровна* – канд. хим. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: chembstu@rambler.ru

*Супиченко Галина Николаевна* – канд. хим. наук. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Supichenko@belstu.by

*Леонтьев Виктор Николаевич* – канд. хим. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by

*Шутова Анна Геннадьевна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna\_shutova@mail.ru

### Information about the authors

*Natalya A. Kovalenko* – Ph. D. (Chem.), Assistant professor, Head of the Department. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chembstu@rambler.ru

*Galina N. Supichenko* – Ph. D. (Chem.). Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Supichenko@belstu.by

*Victor N. Leontiev* – Ph. D. (Chem.), Assistant professor, Head of the Department. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

*Hanna G. Shutova* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna\_shutova@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 576.311.347.6:576.311.32

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-156-168>

Поступила в редакцию 06.07.2018

Received 06.07.2018

**И. Б. Заводник<sup>1</sup>, Р. И. Кравчук<sup>2</sup>, Т. В. Ильич<sup>1</sup>, Е. А. Лапшина<sup>1</sup>, А. Г. Вейко<sup>1</sup>,  
Л. Б. Заводник<sup>1</sup>, О. Б. Островская<sup>2</sup>, М. Н. Курбат<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

### **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ И КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ГИПОХЛОРНОЙ КИСЛОТОЙ**

**Аннотация.** Гипохлорная кислота, HOCl, является одним из наиболее сильных биологических окислителей и важнейшим медиатором воспалительных повреждений клеток и тканей. В настоящей работе изучен характер изменения морфологии митохондрий клеток печени крыс, эритроцитов крыс и клеток линии В14 при окислительном воздействии HOCl *in vitro*.

Внесение HOCl (300 мкМ) в суспензию митохондрий вызывало изменения органелл, незначительно снижало среднюю суммарную длину и среднее количество крист в одной митохондрии без изменения длины одной кристы, уменьшало среднюю площадь сечения митохондрии и удлиняло профили митохондрий, увеличивая число измененных митохондрий и гетерогенность популяции. Кроме того, наблюдалась деполяризация митохондриальных мембран, скорость и степень которой определялись концентрацией HOCl. Воздействие HOCl (25–150 мкМ) в течение 60–180 с индуцировало лизис эритроцитов крыс, которому предшествовало изменение формы и размеров клеток. Рассчитанная нами константа диссоциации HOCl с эритроцитарной мембраной составила  $140 \pm 25$  мкМ, кооперативность процесса взаимодействия (коэффициент Хилла) – 2,1. В клетках линии В14 воздействие HOCl (100 мкМ) вызывало потерю способности сорбироваться на субстрате, формировать ассоциаты и последующее сжатие клеток.

Таким образом, морфологические (и функциональные) перестройки митохондрий печени крыс вследствие воздействия HOCl могут служить одной из причин гибели клеток в очагах воспаления. На уровне целых клеток воздействие HOCl вызывает лизис эритроцитов и глубокие повреждения клеток линии В14.

**Ключевые слова:** митохондрии печени крыс, гипохлорная кислота, морфологические изменения, эритроциты, гемолиз, клетки линии В14

**Для цитирования:** Морфологические изменения митохондрий и клеток млекопитающих, индуцируемые гипохлорной кислотой / И. Б. Заводник [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 156–168. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-156-168>

**I. B. Zavodnik<sup>1</sup>, R. I. Kravchuk<sup>2</sup>, T. V. Ilyich<sup>1</sup>, E. A. Lapshina<sup>1</sup>, A. G. Vejko<sup>1</sup>, L. B. Zavodnik<sup>1</sup>,  
O. B. Astrowskaja<sup>2</sup>, M. N. Kurbat<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

<sup>2</sup>State Medical University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

### **MORPHOLOGICAL CHANGES OF MITOCHONDRIA AND MAMMALIAN CELLS, INDUCED BY HYPOCHLOROUS ACID**

**Abstract.** Hypochlorous acid, HOCl, is one of the most powerful biological oxidants and the most important mediator of inflammatory damage of cells and tissues. The purpose of this study was to characterize the morphological features of HOCl – induced oxidative impairment in rat liver mitochondria *in vitro* and to compare the processes of HOCl-induced oxidation in mitochondria, erythrocytes and B14 cells.

HOCl addition (300  $\mu$ M) to mitochondrial suspension resulted in mitochondrial structural changes with a decrease in the mean total length of the crista and the average number of cristae in one mitochondria with no change in the length of one crista. There was shown a slight decrease in the average cross-sectional area of one mitochondria, mitochondrial profile elongation, an increase in the number of altered mitochondria and the heterogeneity of the population. Simultaneously we observed depolarization of the mitochondrial membrane, the rate and degree of which were determined by the concentration of HOCl. HOCl addition (25–150  $\mu$ M) induced lysis of erythrocytes for 60–180 s, which was preceded by a change in the shape and size of cells. The apparent dissociation constant for the HOCl – membrane complex was estimated to be  $K_d = 140 \pm 25$   $\mu$ M, and the Hill coefficient was to be 2.1. The B14 cell exposure to HOCl (100  $\mu$ M) led to a loss of ability to sorb on the substrate, to form associates, and to subsequent shrinkage of cells.

Therefore, HOCl caused some morphological (and functional) changes in rat liver mitochondria, which may serve as one of the causes of cell death in inflammatory foci. At the level of the whole cells, the HOCl addition induced lysis of red blood cells and deep damage to B14 cells.

**Keywords:** rat liver mitochondria, hypochloric acid, morphological changes, erythrocytes, hemolysis, B14 cells

**For citation:** Zavodnik I. B., Kravchuk R. I., Ilyich T. V., Lapshina E. A., Vejko A. G., Zavodnik L. B., Astrowskaja O. B., Kurbat M. N. Morphological changes of mitochondria and mammalian cells, induced by hypochlorous acid. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 156–168 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-156-168>

**Введение.** Гипохлорная кислота (НОСІ) (в русскоязычной химической терминологии – хлорноватистая кислота – НСІО) синтезируется в реакции перекиси водорода и аниона  $\text{Cl}^-$ , катализируемой миелопероксидазой (МРО, КФ 1.11.1.7) нейтрофилов и моноцитов в условиях дыхательного взрыва. НОСІ путем диффузии проникает внутрь клеток, вызывая в них необратимую неферментативную химическую модификацию белков (путем образования долгоживущих хлораминов и хлортирозинов), нуклеиновых кислот, липидов [1, 2]. НОСІ принадлежит к широкому классу гипогалоидных кислот (НОХ, где Х – F, Cl, Br или I), образующихся при окислении галоген-ионов и обладающих высокой биологической активностью.

Гипохлорная кислота – один из наиболее сильных биологических окислителей и важнейший медиатор воспалительных повреждений клеток и тканей, а также основной бактерицидный агент [1]. В отличие от других окислителей она не является субстратом для ферментов антиоксидантной системы и в то же время способна взаимодействовать с многочисленными субклеточными структурами [3]. Инфильтрация моноцитов/макрофагов в ткани и повышенные экспрессия и, как следствие, секреция миелопероксидазы приводят к росту генерации НОСІ. Повышенная экспрессия миелопероксидазы и рост содержания 3-хлортирозина как биомаркера хлорирования гипохлорной кислотой показаны при ряде патологий [1]. Точные механизмы НОСІ-индуцированной клеточной гибели и адаптации к окислителю неизвестны. До 80 % генерируемого активированными нейтрофилами  $\text{H}_2\text{O}_2$  используется для производства НОСІ, локальная концентрация которой в тканях при патологических состояниях может достигать 20–400 мкМ в течение часа [3–5]. Хлорирование и окисление белков НОСІ как результат активации миелопероксидазы является одной из основных причин атеросклеротических повреждений тканей. Недавно обнаружено выраженное возрастание активности миелопероксидазы и степени хлорирования белков (уровня 3-хлортирозина) при атеросклерозе и ревматоидном артрите [6]. При невысоких, физиологических, концентрациях НОСІ (активная форма хлора) наряду с активными формами кислорода и азота может выступать как сигнальная молекула, регулируя пролиферацию, рост, дифференциацию клеток, апоптоз.

Механизмы модификации клеток и клеточных структур гипохлорной кислотой и физиологические следствия этой модификации исследуются достаточно давно. Показано, что НОСІ (50–200 мкМ) индуцирует гибель макрофагов человека по некротическому механизму, вызывая формирование митохондриальных пор высокой проницаемости, падение митохондриального мембранного потенциала и нарушение кальциевого гомеостаза [7]. Ранее нами были рассмотрены некоторые закономерности повреждения митохондрий клеток печени и эритроцитов гипохлорной кислотой. В митохондриях печени крыс НОСІ в концентрации 50–300 мкМ вызывала выраженное нарушение редокс-баланса (окисляла сульфгидрильные группы митохондриальных белков, восстановленный глутатион) и дыхательной активности митохондрий (увеличивала скорость субстрат-зависимого дыхания ( $V_2$ ), значительно снижала скорость потребления кислорода, сопряженного с фосфорилированием ( $V_3$ ), нарушала сопряжение дыхания и фосфорилирования), существенно ингибировала один из ключевых ферментов цикла Кребса –  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназу [8]. Нами показано, что в эритроцитах НОСІ *in vitro* индуцирует сложные изменения площади поверхности и микротекучести плазматической мембраны, морфологии (набухание, эхиноцитоз) и стабильности клеток, приводящие к лизису [9, 10]. Воздействие гипохлорной кислоты (100–1000 мкМ) на эритроциты приводит к быстрому окислению внутриэритроцитарного восстановленного глутатиона, не вызывая перекисного окисления липидов, к возрастанию осмотической хрупкости эритроцитов, формированию короткоживущих пор диаметром 0,7 нм в эритроцитарной

мембране [10]. Изучение механизмов и закономерностей взаимодействия клеток и клеточных органелл, в первую очередь митохондрий, с НОС1 позволит выяснить механизм воспалительных процессов. Лейкоцитарная инфильтрация и активация нейтрофилов в очагах воспаления в ткани печени, последующая гиперпродукция НОС1 представляют один из патобиохимических механизмов токсического поражения печени.

Цель настоящей работы – определить изменения морфологии (и функциональной активности) митохондрий клеток печени крыс, эритроцитов крыс и клеток линии В14 при окислительном воздействии гипохлорной кислоты *in vitro*.

**Материалы и методы исследования. Методика. Реактивы.** В работе использовали гипохлорит натрия (NaOCl, при pH 7,4 в растворе присутствуют в равновесии NaOCl и OCl<sup>-</sup>), сахарозу, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-HCl), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), аденозиндифосфат, трихлоруксусную кислоту (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США, или Steinheim, Германия), флуоресцентный зонд сафранин О (Molecular Probes, Inc., США), остальные реактивы аналитической степени чистоты (POCH, Poland, Реахим, Россия). Растворы готовили, используя воду, очищенную системой Milli-Q.

Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования [11]. Печень извлекали на холоду (4 °С), осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (тефлон-стекло) (600 об/мин, 1 мин) в охлажденной среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-HCl и 0,001 М ЭДТА, pH 7,2, при 4 °С. Ядерную фракцию удаляли путем центрифугирования при 600 g в течение 10 мин при 4 °С. Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали при 8500 g в течение 10 мин при 4 °С, далее митохондриальный осадок дважды промывали в среде выделения при 4 °С и ресуспендировали (концентрация белка 40–50 мг/мл). Для выяснения механизмов окислительного повреждения *in vitro* митохондрии экспонировали НОС1 в среде с 0,15 М KCl, 0,02 М KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5), не содержащей Трис-HCl и ЭДТА, с целью исключения взаимодействия последних с окислителем. Концентрацию белка определяли по методу Лоури с соавт. [12].

**Электронная микроскопия.** Митохондрии (5 мг белка/мл) инкубировали в присутствии окислителя, 300 мкМ гипохлорной кислоты (10 мин, 25 °С, pH 7,5), далее центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Митохондрии (осадок) фиксировали в двух порциях 1 %-ного раствора четырехоксида осмия на 0,1 М буфере Миллонига [13], pH 7,4, при 4 °С в течение 1,5 ч. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы (35 нм) изготавливали на микротоме Leica EM VC7, контрастировали солями тяжелых металлов [14, 15] и анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (Япония) при 5000–40 000-кратном увеличении и ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовали цифровую камеру Olympus Mega View III (Olympus, Германия) и пакет программ для обработки изображений iTEM (Olympus, Германия).

Показатели оценивали при 20 000-кратном увеличении микроскопа на 10 тестируемых площадях (полях зрения). При данном увеличении анализировали 250–500 профилей митохондрий репрезентативных микрофотографий. На этих же тестируемых площадях подсчитывали количество измененных митохондрий и рассчитывали их содержание на 1000 органелл. При 40 000-кратном увеличении микроскопа анализировали состояние внутренней мембраны митохондрий, средние величины общей длины крист, среднюю длину и количество крист в одной органелле.

Митохондриальный мембранный потенциал регистрировали, используя потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд сафранин О (8 мкМ) и спектрофлуориметр Perkin-Elmer LS55 (Великобритания) и регистрируя флуоресценцию зонда при  $\lambda_{ex}$  и  $\lambda_{em}$  495 и 586 нм соответственно [15]. Митохондрии (0,3 мг белка/мл) суспензировали при 25 °С в среде с 0,05 М сахарозы, 0,125 М KCl, 2,5 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ MgSO<sub>4</sub> (pH 7,4). В качестве субстрата дыхания использовали сукцинат (5 мМ). Мембранный потенциал (мВ) определяли, используя калибровочный график, представляющий зависимость интенсивности зонда от величины мембранного потенциала митохондрий, который рассчитывали согласно уравнению Нернста:  $\Delta\Psi = 60 \log [K^+]_{out} / [K^+]_{in}$  (мВ), где

$[K^+]_{in}$  – внутримитохондриальная концентрация ионов  $K^+$  (120 мМ),  $[K^+]_{out}$  – концентрация ионов  $K^+$  в среде, которую изменяли в диапазоне 0–20 мМ [15] в присутствии ионофора валиномицина (0,28 мкМ). Полную деполяризацию митохондриальной мембраны контролировали, внося протонифор FCCP (0,5 мкМ).

Эритроциты получали, центрифугируя гепаринизированную кровь крыс при 3000 об/мин для отделения плазмы. Эритроциты дважды промывали изотоническим раствором NaCl (145 мМ NaCl, 1,9 мМ  $NaH_2PO_4$ , 8,1 мМ  $Na_2HPO_4$ , pH 7,4, PBS). Лизис эритроцитов индуцировали гипохлорной кислотой, эритроциты (0,05 %-ный гематокрит в PBS) подвергали действию различных концентраций HOCl при 20 °С, скорость гемолиза регистрировали по изменению величины светорассеяния суспензии эритроцитов, измеряемой как оптическая плотность суспензии на длине волны 670 нм.

Клетки линии В14 китайского хомячка (коллекция клеточных линий Института биофизики, Университет в Лодзи, Польша) выращивали в монослое в сбалансированной солевой среде Хэнкса, содержащей 10 мМ глюкозы (HBSS–глюкоза), pH 7,4, и 10 %-ную сыворотку новорожденных телят, в увлажненной атмосфере воздуха, содержащей 5 %  $CO_2$ , при 37 °С. Перед экспериментом экспоненциально растущие прикрепленные клетки помещали в свежую среду HBSS–глюкоза (объем пробы – 1 мл). Клетки экспонировали различным концентрациям гипохлорной кислоты в течение 10 мин при 37 °С. Морфологию клеток линии В14 оценивали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse E400 (Japan) при 500-кратном увеличении.

Для статистической обработки данных использовали программу Microsoft Excel 2013 и пакет прикладных программ Statistica 6.0. Для малых выборок распределение оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка, результаты представляли как среднее значение 5–6 измерений  $\pm$  SEM. Для анализа результатов, демонстрирующих ненормальное распределение (согласно тесту Шапиро–Уилка), использовали тест Колмогорова–Смирнова. Уровень значимости различий считали достоверным при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** *Электронно-микроскопический анализ изменений ультраструктуры митохондрий при окислительном повреждении гипохлорной кислотой.* Электронно-микроскопические исследования позволяют получать новую информацию о структурно-функциональных изменениях при повреждающих воздействиях, что позволяет расширить представления о механизме патологических процессов. Полученные в нашем эксперименте репрезентативные электронные микрофотографии изолированных митохондрий печени интактных крыс представлены на рис. 1. Чистота фракции митохондрий составляла 90–95 %, примеси микросомальной фракции и лизосомоподобных структур – 5–10 %. В работе проанализировано 250–500 профилей митохондрий, представленных на нескольких репрезентативных микрофотографиях; поскольку электронные фотографии представляют образцы, полученные от одного животного, нами указывалась величина ошибки, а не степень достоверности различий.

Профили митохондрий отличались различными размерами, преимущественно округлой формой, матриксом умеренной электронной плотности и отчетливыми, неупорядоченно расположенными кристами. При этом кристы были не расширены и несколько укорочены. Такие митохондрии считаются промежуточными, ультраструктура которых соответствует их оптимальному энергетическому и биосинтетическому состоянию. Среди основной популяции митохондрий встречались единичные органеллы с матриксом пониженной электронной плотности и редуцированными низкоэнергетическими кристами (квалифицированы как измененные митохондрии) (см. таблицу).

На рис. 2 представлены репрезентативные электронные микрофотографии изолированных митохондрий, подвергшихся действию гипохлорной кислоты (300 мкМ, 10 мин, 25 °С). Чистота фракции митохондрий составляла 85–90 %. При повреждающем воздействии гипохлорной кислоты возрастало число измененных митохондрий, которые имели просветленный матрикс, укороченные и редуцированные кристы. В ультраструктуре основной популяции митохондрий не выявлено существенных деструктивных изменений по сравнению с контрольными митохондриями (рис. 2).

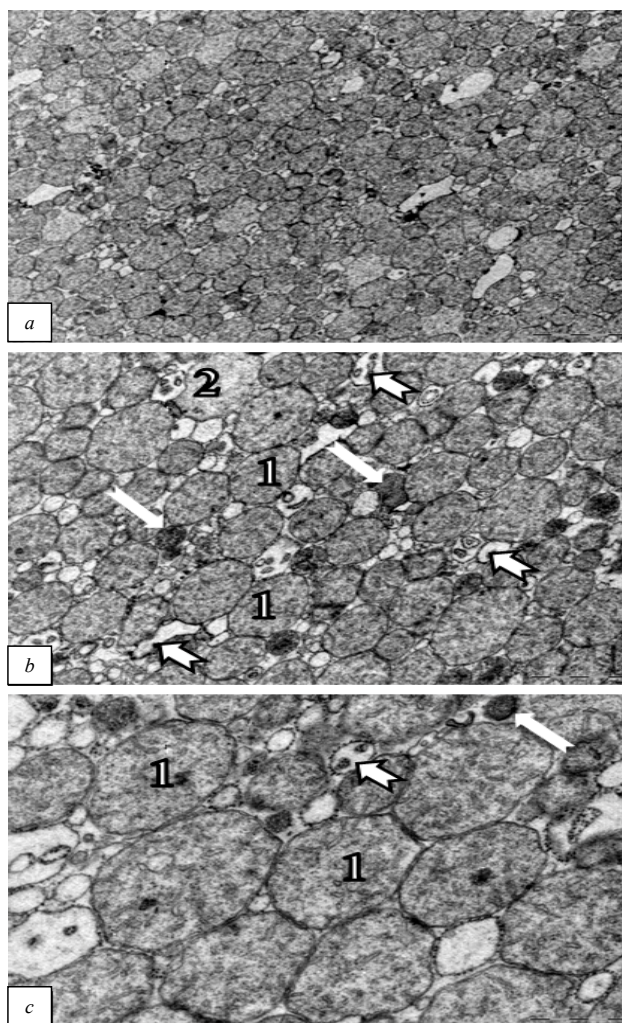


Рис. 1. Электронные микрофотографии митохондрий печени крыс (контроль): 1 – основная популяция митохондрий, отличающихся округлой формой, матриксом умеренной электронной плотности и укороченными, неупорядоченно расположенными кристами; 2 – измененная органелла, характеризующаяся электронно-светлым матриксом и редуцированными кристами; короткие стрелки – примеси микросомальной фракции, длинные стрелки – лизосомоподобные структуры ( $a - \times 10\,000$ ,  $b - \times 20\,000$ ,  $c - \times 40\,000$ ; масштабный отрезок – 2,0; 1,0 и 0,5 мкм соответственно)

Fig. 1. Electron micrographs of rat liver mitochondria (control): 1 – the main population of mitochondria characterized by a rounded shape, a matrix of moderate electron density, and shortened, disordered cristae; 2 – modified organelle, characterized by an electron-bright matrix and reduced cristae; short arrows – microsomal impurities; long arrows – lysosome-like structures ( $a - \times 10\,000$ ,  $b - \times 20\,000$ ,  $c - \times 40\,000$ ; scale length – 2.0; 1.0 and 0.5 microns respectively)

**Морфометрические показатели, характеризующие структуру изолированных митохондрий печени крыс**  
**Morphometric indicators characterizing the structure of isolated rat liver mitochondria**

Морфометрический параметр	Контроль	НОС1
Измененные митохондрии, %	2,14	4,00
Средняя площадь сечения одной митохондрии, мкм <sup>2</sup>	0,32	0,28
Средний периметр одной митохондрии, мкм	2,16	2,06
Соотношение сторон митохондрий	1,62	1,83
Фактор элонгации	1,63	1,83
Средняя относительная электронная плотность митохондрий,	127,51	117,84
Диаметр митохондрий:		
эквивалентного круга	0,61	0,57
макс.	0,79	0,79



Окончание таблицы

Морфометрический параметр	Контроль	НОС1
мин.	0,49	0,44
средн.	0,69	0,68
Сферичность	0,39	0,31
Фактор формы	0,79	0,77
Среднее к-во крист в одной митохондрии, шт.	4,20	3,60
Средняя длина одной кристы, мкм	0,119	0,114
Средняя суммарная длина крист в одной митохондрии, мкм	0,50	0,41

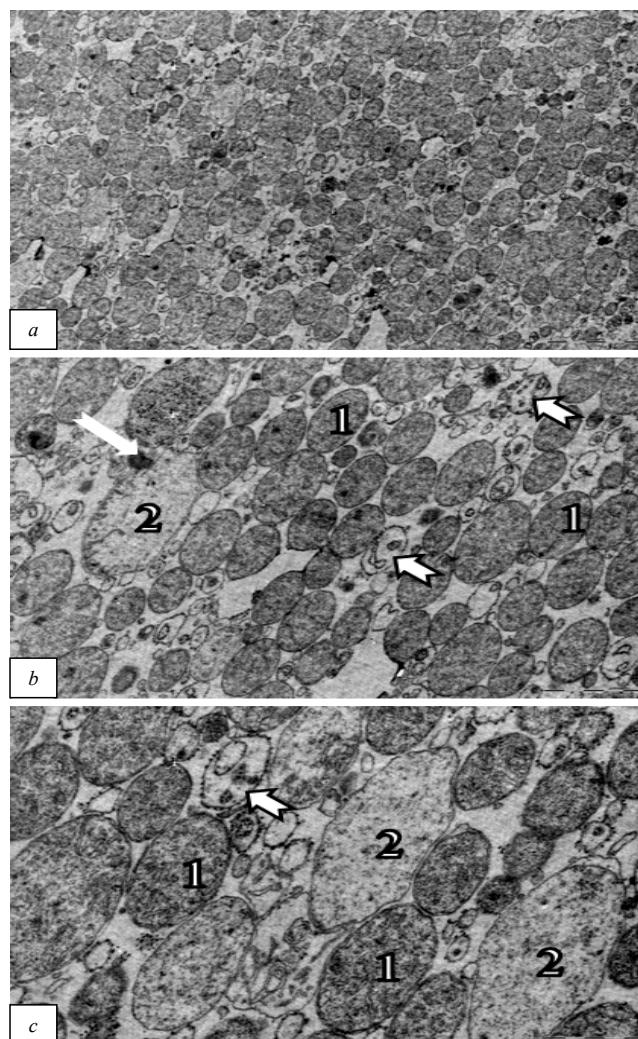


Рис. 2. Электронные микрофотографии митохондрий после воздействия гипохлорной кислоты (300 мкМ, 10 мин, 25 °С): 1 – основная популяция митохондрий, отличающихся овальной формой, матриком умеренной электронной плотности и укороченными, неупорядоченно расположенными кристами; 2 – измененные органеллы, характеризующиеся электронно-светлым матриком и редуцированными кристами; длинная стрелка – примеси микросомальной фракции, короткие стрелки – лизосомоподобные структуры (а –  $\times 10\,000$ , b –  $\times 20\,000$ , c –  $\times 40\,000$ ; масштабный отрезок – 2,0; 1,0 и 0,5 мкм соответственно)

Fig. 2. Electron micrographs of mitochondria after exposure to hypochlorous acid (300  $\mu\text{M}$ , 10 min, 250 °C): 1 – the main population of mitochondria, characterized by an oval shape, a matrix of moderate electron density and shortened, disordered cristae; 2 – modified organelles characterized by an electron-light matrix and reduced cristae; long arrow – microsomal fraction impurities; short arrows – lysosome-like structures (a –  $\times 10\,000$ , b –  $\times 20\,000$ , c –  $\times 40\,000$ ; scale length – 2.0; 1.0 and 0.5 microns respectively)

В этой связи морфометрические измерения показали некоторое уменьшение (на 7,6 %) электронной плотности матрикса митохондрий (арифметическая средняя оценка всех оттенков серого цвета изучаемого объекта). Профили митохондрий отличались различными размерами, преимущественно овальной формой, матриксом умеренной электронной плотности и отчетливыми, неупорядоченно расположенными кристами. При этом кристы были не расширены и характеризовались различной длиной. Морфометрический анализ внутренней структуры изолированных митохондрий показал, что при воздействии гипохлорной кислотой на 18 % снижается средняя суммарная длина крист и на 14 % – среднее количество крист в одной митохондрии по сравнению с контролем. В то же время средняя длина одной кристы не изменяется (см. таблицу).

Визуально профили митохондрий были несколько уменьшены в размерах и удлинены. Эти наблюдения подтверждались морфометрическими измерениями (см. таблицу). Средняя площадь сечения одной митохондрии уменьшалась на 14 %, при этом появлялись отдельные митохондрии, увеличенные в размерах. Об удлинении профилей митохондрий свидетельствовало увеличение фактора элонгации на 12 % и фактора соотношения сторон (Aspect ratio) на 13 %, а также соотношение максимального и минимального диаметров структур. Таким образом, экспонирование гипохлорной кислоте (300 мкМ) индуцирует морфологические трансформации митохондрий: возрастание гетерогенности популяции митохондрий и числа измененных митохондрий, которые имели просветленный матрикс, укороченные и редуцированные кристы, средняя площадь сечения одной органеллы незначительно уменьшалась и удлинялся их профиль.

Морфологическим трансформациям митохондрий сопутствуют выраженные функциональные нарушения органелл, индуцируемые гипохлорной кислотой. При том же соотношении  $[\text{HOCl}]/[\text{мг митохондриального белка}]$  наблюдалась протекающая во времени диссипация митохондриального мембранного потенциала, зависящая от концентрации окислителя (7–300 мкМ HOCl), что, вероятно, отражает повреждение митохондриальной мембраны (рис. 3). В то же время в митохондриях не выявлено формирования пор высокой проницаемости и сколько-нибудь

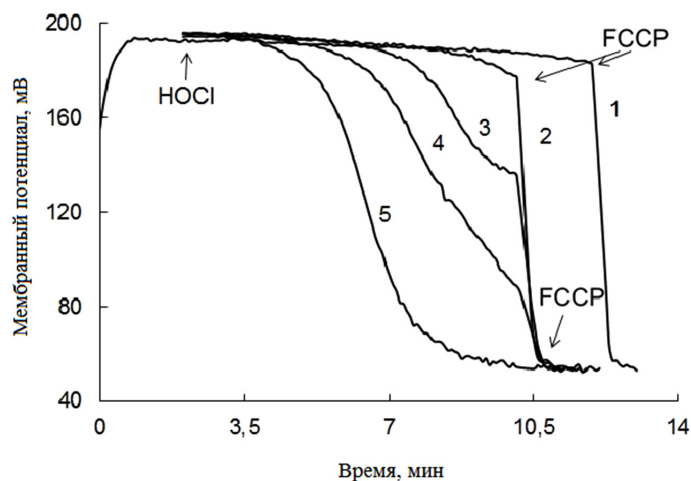


Рис. 3. Кинетические кривые деполяризации митохондриальной мембраны в присутствии различных концентраций гипохлорной кислоты (мкМ): 1 – 0 (контроль); 2 – 7; 3 – 30; 4 – 100; 5 – 300. Флуоресценцию сафранина О (8 мкМ) регистрировали при  $\lambda_{\text{ex}}$  и  $\lambda_{\text{em}}$  495 и 586 нм соответственно в суспензии митохондрий (0,3 мг белка/мл) в среде с 0,05 М сахарозы, 0,01 М Трис-НСl, 0,125 М КCl, 2,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 мМ  $\text{MgSO}_4$  (pH 7,4) при 25 °С. Стрелками указан момент внесения HOCl и FCCP (0,5 мкМ)

Fig. 3. Kinetic depolarization curves of the mitochondrial membrane in the presence of various concentrations of hypochlorous acid ( $\mu\text{M}$ ): 1 – 0 (control); 2 – 7; 3 – 30; 4 – 100; 5 – 300. Safranin O fluorescence (8  $\mu\text{M}$ ) was recorded at  $\lambda_{\text{ex}}$  and  $\lambda_{\text{em}}$  495 and 586 nm respectively in a suspension of mitochondria (0.3 mg protein/ml) in medium with 0.05 M sucrose, 0.01 M Tris-HCl, 0.125 M KCl, 2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgSO}_4$  (pH 7.4), 25 °C. The arrows indicate the moment of introduction of HOCl and FCCP (0.5  $\mu\text{M}$ )

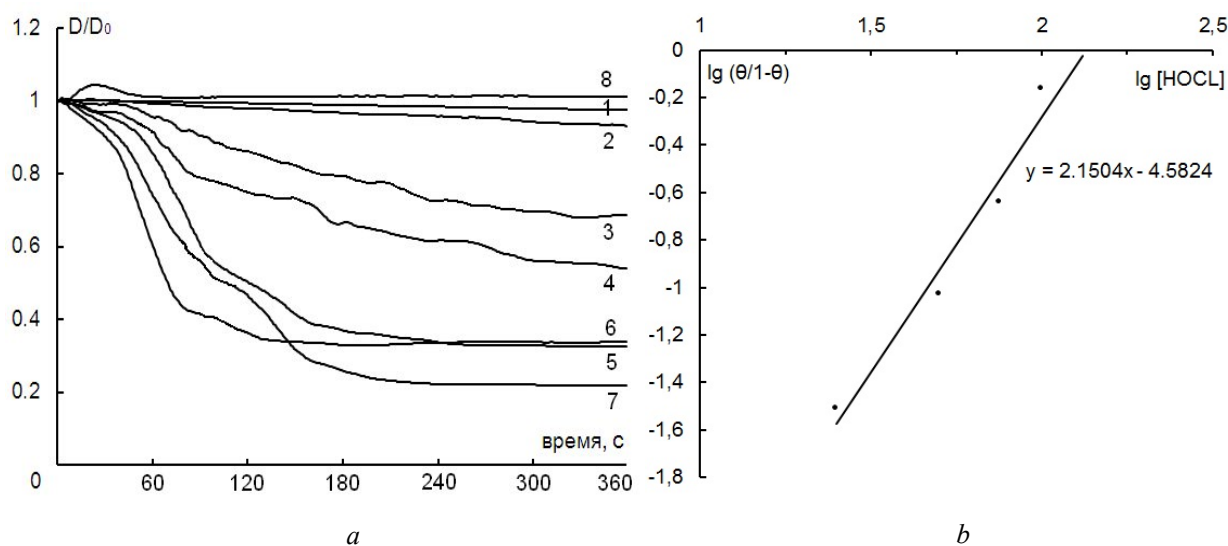


Рис. 4. Кинетические кривые изменения светорассеяния суспензии эритроцитов (0,05 %-ный гематокрит) при 20 °С, 145 мМ NaCl, 1,9 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 (PBS) при различных концентрациях HOCl (мкМ): 1 – контроль; 2 – 25; 3 – 50; 4 – 75; 5 – 100; 6 – 150; 7 – 200; 8 – 300 (a); график зависимости скорости гемолиза эритроцитов от концентрации гипохлорной кислоты (график Хилла) (b)

Fig. 4. Kinetic curves of changes in the light scattering of erythrocyte suspension (0.05 % hematocrit) at 20 °C, 145 mM NaCl, 1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4 (PBS) in the presence of various concentrations of HOCl (µM): 1 – control; 2 – 25; 3 – 50; 4 – 75; 5 – 100; 6 – 150; 7 – 200; 8 – 300 (a); plot of erythrocyte hemolysis rate versus hypochloric acid concentration (Hill's plot) (b)

значительного набухания митохондрий в присутствии HOCl [16], что согласуется с отсутствием значительных повреждений митохондрий, регистрируемых морфометрически (рис. 2).

*Морфологические изменения эритроцитов и клеток линии В14.* Морфометрические параметры – полезный инструмент для анализа структурных изменений, индуцируемых гипохлорной кислотой в клетках и клеточных органеллах. Воздействие HOCl в концентрации 25–300 мкМ на эритроциты крысы приводит к быстрому (60–180 с) лизису клеток, зависящему от дозы окислителя. На рис. 4, a представлены кинетические кривые изменения оптической плотности суспензии эритроцитов в присутствии различных концентраций окислителя. Как следует из кинетических кривых изменения светорассеяния суспензии эритроцитов, лизису предшествует изменение формы и размеров клеток. Гемолитический эффект зависит от соотношения [HOCl]/число эритроцитов, интересным представляется факт отсутствия гемолиза при концентрации 300 мкМ. Вероятно, при этом происходит такая модификация мембран, которая препятствует их разрушению.

Основываясь на представлении о зависимости скорости HOCl-индуцируемого гемолиза от концентрации окислителя, с помощью кинетических кривых лизиса (рис. 4, b) нами представлена скорость гемолиза при различных концентрациях HOCl в соответствии с уравнением Хилла

$$\lg[Y/(1-Y)] = n\lg[\text{HOCl}] - \lg K_d,$$

где  $Y$  – доля эритроцитарных центров, взаимодействующих с HOCl, заполненных молекулами окислителя при соответствующей концентрации HOCl,  $n$  – коэффициент Хилла.

Нами рассчитаны параметры взаимодействия HOCl с эритроцитами: константа диссоциации взаимодействия HOCl с клеткой (сродство центров связывания к HOCl) –  $K_d = 140 \pm 25$  мкМ; коэффициент Хилла – 2,1, характеризующий кооперативность процесса взаимодействия (число центров связывания).

Морфологические трансформации клеток линии В14 при воздействии окислителя регистрировали методом оптической микроскопии. Клетки линии В14 обладают характерной биполярной

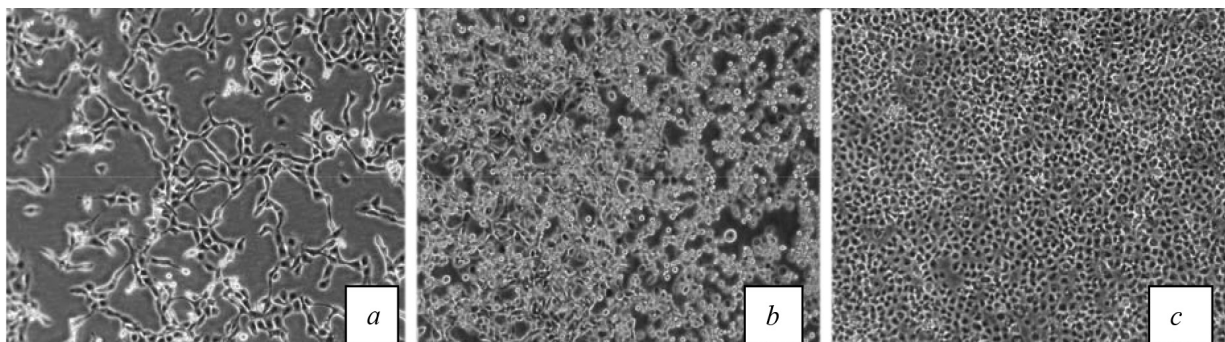


Рис. 5. Морфологические трансформации клеток линии В14 китайского хомячка при экспонировании различным концентрациям гипохлорной кислоты. Клетки обрабатывали окислительным агентом в течение 10 мин при 37 °С, HBSS – глюкоза, рН 7,4: *a* – контроль, *b* – 100 мкМ HOCl, *c* – 500 мкМ HOCl

Fig. 5. Morphological transformations of B14 Chinese hamster cell lines upon exposure to various concentrations of hypochlorous acid. Cells were treated with oxidizing agent for 10 min at 37 °C, HBSS – glucose, pH 7.4: *a* – control, *b* – 100 μM HOCl, *c* – 500 μM HOCl

формой, прикреплены к субстрату и образуют клеточные ассоциаты (рис. 5, *a*). Экспонирование клеток линии В14 гипохлорной кислоте приводит к выраженному нарушению их структуры (рис. 5, *b*, *c*): при концентрации окислителя 100 мкМ клетки теряют способность сорбироваться на субстрате и образовывать клеточные ассоциаты, приобретают сферическую форму и сжимаются. Степень повреждения усиливается при более высоких концентрациях окислителя (500 мкМ).

Таким образом, гипохлорная кислота (300 мкМ) индуцировала морфологические трансформации митохондрий: возростала гетерогенность популяции и увеличивалось число измененных органелл, отличающихся набухшим электронно-светлым матриксом и редуцированными кристами, при этом несколько снижались средняя суммарная длина крист и среднее количество крист в одной митохондрии по сравнению с контролем без изменения длины одной кристы, незначительно уменьшалась средняя площадь сечения одной митохондрии и удлинялись профили митохондрий (см. таблицу). Одновременно наблюдалась деполяризация митохондриальной мембраны, скорость и степень которой определяется концентрацией HOCl. Влияние окислителя на мембранный потенциал, связано, вероятно, с возрастанием протонной проницаемости внутренней митохондриальной мембраны в результате окислительного повреждения мембранных белков и отражает выраженное нарушение функциональной активности митохондрий.

Ранее нами показано, что HOCl в высоких концентрациях (200–300 мкМ) окисляет NADH в изолированных митохондриях клеток печени, но предотвращает индуцируемое ионами Ca<sup>2+</sup> формирование митохондриальных пор высокой проницаемости [17]. В наших предыдущих экспериментах ультраструктурный и морфометрический анализ показал, что моделирование окислительного стресса с использованием другого окислительного агента, *терт*-бутилгидропероксида, вызывает существенные изменения и значительную гетерогенность митохондрий по размерам, при этом увеличивается число измененных митохондрий, обладающих электронно-светлым набухшим матриксом и редуцированными кристами, которые характеризуются пониженным биоэнергетическим и биосинтетическим потенциалом, уменьшаются среднее количество крист и суммарная длина крист в одной органелле [18]. В качестве одного из механизмов HOCl-зависимой цитотоксичности предполагают митохондриальные повреждения: HOCl-индуцируемые быстрые изменения белка Вах, формирование пор высокой проницаемости, нарушения кальциевого гомеостаза, истечение митохондриальных проапоптотических белков AIF и EndoG [7, 19]. Митохондриальные процессы могут быть связаны с эффектами продуктов гипохлорной кислоты, хлораминов. Так, хлорамин таурина, а не гипохлорная кислота, концентрируясь в митохондриях, является индуктором апоптоза, связанного повреждением

митохондрий, формированием пор высокой проницаемости, уменьшением мембранного потенциала, активацией каспазы-9 [20].

Развивающийся во времени НОСІ-индуцируемый лизис эритроцитов отражает взаимодействие окислителя с эритроцитарной мембраной, при этом с одним центром мембраны взаимодействуют две молекулы окислителя. Ранее в наших экспериментах активные формы хлора (гипохлорная кислота и хлорамины) в концентрации 50–200 мкМ ингибировали транспортные белки мембран эритроцитов человека:  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы, белки мультилекарственной резистентности за счет окисления сульфгидрильных групп мембранных белков [21]. Формирование пор в эритроцитарной мембране и нарушение пассивной ионной проницаемости являются причиной НОСІ-индуцируемого гемолиза [10].

Окислительные процессы, вызываемые гипохлорной кислотой, приводили к потере клетками линии В14 способности сорбироваться на субстрате, формировать ассоциаты и к последующему их сжатию, что можно рассматривать как подтверждение апоптотического механизма НОСІ-индуцируемой гибели клеток. Выраженные структурные и функциональные повреждения митохондриальных и плазматических мембран в клетках различных типов, обнаруженные нами, позволяют предположить, что мембранные структуры представляют, вероятно, важнейшие мишени действия гипохлорной кислоты.

**Заключение.** В настоящей работе с помощью морфометрических методов исследованы повреждения структуры митохондрий печени крыс, эритроцитов крыс и клеток линии В14, индуцируемые гипохлорной кислотой. Выяснение молекулярных механизмов и последствий действия гипохлорной кислоты на клетки млекопитающих, поиск мишеней представляют значительный интерес, учитывая роль последней в развитии воспаления. Гипохлорная кислота в концентрации, соответствующей ее локальной концентрации в тканях при патологии (30–300 мкМ), вызывает морфологические и функциональные повреждения митохондрий и клеток млекопитающих. Морфологические перестройки митохондрий печени крыс (возрастание гетерогенности популяции, просветленный матрикс, укорочение и редуцирование крист) соответствуют деполяризации митохондриальной мембраны, что отражает нарушение респираторной и синтетической функции органелл. На уровне целых клеток воздействие НОСІ вызывает лизис эритроцитов, которому предшествуют изменение формы и размеров клеток и глубокие повреждения клеток линии В14: клетки теряют способность сорбироваться на субстрате, образовывать клеточные ассоциаты, приобретают сферическую форму и сжимаются. Эффект НОСІ на клеточные процессы в различных типах клеток зависит от концентрации окислителя и длительности воздействия, митохондриальные и плазматические мембраны представляют, вероятно, важнейшие мишени действия гипохлорной кислоты. Таким образом, гипохлорная кислота индуцирует глубокие структурные и функциональные повреждения субклеточных органелл и клеток млекопитающих, что является одной из причин гибели клеток в очагах воспаления, развивающейся по некротическому или апоптотическому механизму.

#### Список использованных источников

1. Apoptotic pathways involved in U937 cells exposed to LDL oxidized by hypochlorous acid / S. Vicca [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, N 6. – P. 603–615. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00361-7)
2. Chlorinative stress in age-related diseases: a literature review / M. Casciaro [et al.] // *Immun. Ageing.* – 2017. – Vol. 14, N 1. – P. 14–21. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0104-5>
3. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition / M. Whiteman [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, N 12. – P. 1571–1584. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.030>
4. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice / J. S. Gujral [et al.] // *Hepatology.* – 2003. – Vol. 38, N 2. – P. 355–363. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50341>
5. Hypochlorous acid inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum / T. G. Favero [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 1998. – Vol. 84, N 2. – P. 425–430. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.425>

6. Fernandes, R. M. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis / R. M. Fernandes, N. P. da Silva, E. I. Sato // *Rheumatol. Int.* – 2011. – Vol. 32, N 6. – P. 1605–1609. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1810-5>
7. Yang, Y.-T. T. HOCl causes necrotic cell death in human monocyte derived macrophages through calcium dependent calpain activation / Y.-T. T. Yang, M. Whiteman, S. P. Gieseg // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* – 2012. – Vol. 1823, N 2. – P. 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.019>
8. Повреждение митохондрий печени крыс при интоксикации тетрахлорметаном. Эффекты мелатонина / Ю. З. Максимчик [и др.] // *Биол. мембраны.* – 2010. – Т. 27, № 3. – С. 262–271.
9. Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity / I. B. Zavadnik [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 30, N 4. – P. 363–369. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00479-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00479-2)
10. Hypochlorous acid-induced membrane pore formation in red blood cells / L. B. Zavadnik [et al.] // *Bioelectrochemistry.* – 2002. – Vol. 58, N 2. – P. 157–161. [https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(02\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(02)00151-2)
11. Johnson, D. Isolation of liver or kidney mitochondria / D. Johnson, H. A. Lardy // *Meth. Enzymol.* – 1967. – Vol. 10. – P. 94–96. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10018-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10018-9)
12. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
13. Millonig, G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation / G. A. Millonig // *J. Appl. Physics.* – 1961. – Vol. 32. – P. 1637–1643.
14. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – Vol. 17, N 1. – P. 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
15. Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium / M. L. Watson // *J. Cell Biol.* – 1958. – Vol. 4, N 6. – P. 727–730. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.6.727>
16. Åkerman, K. E. O. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential / K. E. O. Åkerman, M. K. F. Wikström // *FEBS Lett.* – 1976. – Vol. 68, N 2. – P. 191–197. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80434-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80434-6)
17. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca<sup>2+</sup> ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents / N. G. Golovach [et al.] // *J. Membr. Biol.* – 2017. – Vol. 250, N 2. – P. 225–236. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9953-2>
18. Ультраструктура митохондрий и содержание в них свободных аминокислот при моделировании *in vitro* окислительного стресса воздействием трет-бутилгидропероксида: протекторное действие флавоноидов клюквы / И. Б. Заводник [и др.] // *Лаб. диагностика. Вост. Европа.* – 2018. – № 1. – С. 112–124.
19. The pro-inflammatory oxidant hypochlorous acid induces Bax-dependent mitochondrial permeabilisation and cell death through AIF-/EndoG-dependent pathways / M. Whiteman [et al.] // *Cell. Signal.* – 2007. – Vol. 19, N 4. – P. 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.019>
20. Klamt, F. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage / F. Klamt, E. Shacter // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, N 22. – P. 21346–21352. <https://doi.org/10.1074/jbc.m501170200>
21. Hypochlorous acid inhibits glutathione S-conjugate export from human erythrocytes / M. Soszyński [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes.* – 2002. – Vol. 1564, N 2. – P. 479–486. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00500-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00500-x)

## References

1. Vicca S., Massy Z. A., Hennequin C., Rihane D., Drüeke T. B., Lacour B. Apoptotic pathways involved in U937 cells exposed to LDL oxidized by hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, vol. 35, no. 6, pp. 603–615. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00361-7)
2. Casciaro M., Di Salvo E., Pace E., Ventura-Spagnolo E., Navarra M., Gangemi S. Chlorinative stress in age-related diseases: a literature review. *Immunity and Ageing*, 2017, vol. 14, no. 1, pp. 14–21. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0104-5>
3. Whiteman M., Rose P., Siau J. L., Cheung N. S., Tan G. S., Halliwell B., Armstrong J. S. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, no. 38, no. 12, pp. 1571–1584. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.030>
4. Gujral J. S., Farhood A., Bajt M. L., Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology*, 2003, vol. 38, no. 2, pp. 355–363. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50341>
5. Favero T. G., Colter D., Hooper P. F., Abramson J. J. Hypochlorous acid inhibits Ca<sup>2+</sup>-ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Applied Physiology*, 1998, vol. 84, no. 2, pp. 425–430. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.425>
6. Fernandes R. M., da Silva N. P., Sato E. I. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 2011, vol. 32, no. 6, pp. 1605–1609. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1810-5>
7. Yang Y.-T. T., Whiteman M., Gieseg S. P. HOCl causes necrotic cell death in human monocyte derived macrophages through calcium dependent calpain activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 2012, vol. 1823, no. 2, pp. 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.019>

8. Maksimchik Yu. Z., Dremza I. K., Lapshina E. A., Cheshchevik V. T., Sudnikovich E. Yu., Zabrodskaia S. V., Zavodnik I. B. Damage to rat liver mitochondria during carbon tetrachloride intoxication. Effects of melatonin. *Biologicheskii membrany = Biological membrane*, 2010, no. 27, pp. 262–271 (in Russian).
9. Zavodnik I. B., Lapshina E. A., Zavodnik L. B., Bartosz G., Soszynski M., Bryszewska M. Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, vol. 30, no. 4, pp. 363–369. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00479-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00479-2)
10. Zavodnik L. B., Zavodnik I. B., Lapshyna E. A., Buko V. U., Bryszewska M. J. Hypochlorous acid-induced membrane pore formation in red blood cells. *Bioelectrochemistry*, 2002, vol. 58, no. 2, pp. 157–161. [https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(02\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(02)00151-2)
11. Johnson D., Lardy H. A. Isolation of liver or kidney mitochondria. *Methods in Enzymology*, 1967, no. 10, pp. 94–96. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10018-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10018-9)
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
13. Millonig G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *Journal of Applied Physics*, 1961, no. 32, pp. 1637–1643.
14. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 1963, vol. 17, no. 1, pp. 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
15. Watson M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *Journal of Cell Biology*, 1958, vol. 4, no. 6, pp. 727–730. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.6.727>
16. Åkerman K. E. O., Wikström M. K. F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Letters*, 1976, vol. 68, no. 2, pp. 191–197. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80434-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80434-6)
17. Golovach N. G., Cheshchevik V. T., Lapshina E. A., Ilyich T. V., Zavodnik I. B. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca<sup>2+</sup> ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents. *Journal of Membrane Biology*, 2017, vol. 250, no. 2, pp. 225–236. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9953-2>
18. Zavodnik I. B., Kravchun R. I., Il'ich T. V., Glazev A. A., Lapshina E. A., Ostrovskaya O. B., Nefedov L. I., Klisa S. D., Kurbat M. N., Klimovich I. I. Mitochondrial ultrastructure and content of free amino acids in them during modeling of oxidative stress in vitro by the action of tert-butylhydroperoxide: protector action of flavonoids of cranberries. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa = Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, 2018, no. 1, pp. 112–124 (in Russian).
19. Whiteman M., Chu S. H., Siau J. L., Rose P., Sabapathy K., Schantz J. T., Cheung N. S., Spencer J. P., Armstrong J. S. The pro-inflammatory oxidant hypochlorous acid induces Bax-dependent mitochondrial permeabilisation and cell death through AIF-/EndoG-dependent pathways. *Cellular Signalling*, 2007, vol. 19, no. 4, pp. 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.019>
20. Klamt F., Shacter E. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 22, pp. 21346–21352. <https://doi.org/10.1074/jbc.m501170200>
21. Soszyński M., Zavodnik I. B., Zavodnik L. B., Zylinska L., Bartosz G., Bryszewska M. Hypochlorous acid inhibits glutathione S-conjugate export from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2002, vol. 1564, no. 2, pp. 479–486. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00500-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00500-x)

### Информация об авторах

*Заводник Илья Борисович* – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [zavodnik\\_il@mail.ru](mailto:zavodnik_il@mail.ru)

*Кравчук Римма Ивановна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: [cnil@grsmu.by](mailto:cnil@grsmu.by)

*Ильич Татьяна Викторовна* – аспирант. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [Tatyana-luchic@yandex.ru](mailto:Tatyana-luchic@yandex.ru)

*Лапшина Елена Алексеевна* – канд. биол. наук, доцент. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [Lapshina\\_EA@grsu.by](mailto:Lapshina_EA@grsu.by)

*Вейко Артем Геннадьевич* – аспирант. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [Wei93@yandex.ru](mailto:Wei93@yandex.ru)

### Information about the authors

*Ilya B. Zavodnik* – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [zavodnik\\_il@mail.ru](mailto:zavodnik_il@mail.ru)

*Rimma I. Kravchuk* – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [cnil@grsmu.by](mailto:cnil@grsmu.by)

*Tatsiana V. Ilyich* – Postgraduate student. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [Tatyana-luchic@yandex.ru](mailto:Tatyana-luchic@yandex.ru)

*Elena A. Lapshina* – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [Lapshina\\_EA@grsu.by](mailto:Lapshina_EA@grsu.by)

*Artem G. Veiko* – Postgraduate student. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [Wei93@yandex.ru](mailto:Wei93@yandex.ru)

*Заводник Лев Борисович* – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [Zavodnik\\_LB@grsu.by](mailto:Zavodnik_LB@grsu.by)

*Островская Оксана Борисовна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: [Astrowskaja@gmail.com](mailto:Astrowskaja@gmail.com)

*Курбат Михаил Николаевич* – канд. мед. наук, доцент, заведующий лабораторией. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: [vwmisha@mail.ru](mailto:vwmisha@mail.ru)

*Lev B. Zavodnik* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Yanka Kupala State University of Grodno (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [Zavodnik\\_LB@grsu.by](mailto:Zavodnik_LB@grsu.by)

*Oxana B. Astrowskaja* – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [Astrowskaja@gmail.com](mailto:Astrowskaja@gmail.com)

*Mihail N. Kurbat* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [vwmisha@mail.ru](mailto:vwmisha@mail.ru)



ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 551.583; 581.5  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-169-179>

Поступила в редакцию 05.10.18  
Received 05.10.18

**Н. В. Кныш, М. В. Ермохин**

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

### **ВЛИЯНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРИРОСТ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.) В ЮЖНЫХ РЕГИОНАХ БЕЛАРУСИ**

**Аннотация.** Изучены основные климатические факторы, влияющие на годичный радиальный прирост дуба черешчатого, произрастающего в разных лесотипологических условиях на юге Беларуси. Выделено три региона (юго-западный, южный и юго-восточный), отличающиеся условиями его произрастания, и построено 6 стандартизированных мастер-хронологий годичного прироста за период от 140 до 230 лет.

Сравнительный анализ стандартизированных мастер-хронологий показал, что по реакции прироста пойменные и мелиоративно-производные дубовые леса существенно отличаются от суходольных (плакорных). Для разных лесорастительных условий разработаны регрессионные модели связи прироста деревьев дуба с климатическими параметрами. Анализ функций отклика прироста на климатические факторы показал, что радиальный прирост дуба черешчатого в пойменных условиях в наибольшей степени связан с температурами в начале вегетационного сезона. Для деревьев, растущих в мезотрофных условиях, основное влияние на прирост оказывает режим осадков.

**Ключевые слова:** дуб черешчатый, Беларусь, мастер-хронологии, тип леса, климат

**Для цитирования:** Кныш, Н. В. Влияние климатических факторов на прирост дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в южных регионах Беларуси / Н. В. Кныш, М. В. Ермохин // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 169–179. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-169-179>

**N. V. Knysh, M. V. Yermokhin**

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

### **THE EFFECTS OF CLIMATIC FACTORS IN FORMING INCREMENT OF ENGLISH OAK (*QUERCUS ROBUR* L.) IN SOUTH REGIONS OF BELARUS**

**Abstract.** Our research let identified the main climatic factors which impact on radial increment of oak trees on different forest conditions in South Belarus. We defined three regions (southwest, south and southeast) with different growth conditions and built six standardized master chronologies from 140 to 230 years long.

The results of correlation analysis of standardized chronologies showed that response of oak trees to climate on floodplain and drained conditions differ significantly from oak trees growing in dry conditions. A regression model between oak tree-ring width and climatic parameters was developed for different growing conditions. Response function showed that increment of oak trees in floodplain conditions is closely related with temperature at the beginning of the growing season. For trees that are growing in mesotrophic conditions the main importance is the regime of precipitation.

**Keywords:** English oak, Belarus, master chronologies, forest types, climate

**For citation:** Knysh N. V., Yermokhin M. V. The effects of climatic factors in forming increment of English oak (*Quercus robur* L.) in south regions of Belarus. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 169–179 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-169-179>

**Введение.** На фоне потепления климата, наблюдаемого в течение нескольких последних десятилетий, все чаще отмечаются неблагоприятные погодные явления (засухи, аномальные зимние температуры, шквалы, наводнения и др.), которые приводят и к изменению условий произрастания деревьев. В результате участвующих засух в летний период и более теплых зим создаются неблагоприятные условия для представителей бореальных древесных видов (в первую очередь для ели европейской). Это проявляется во вспышках массового размножения стволовых и хвоегрызущих вредителей и в развитии очагов болезней древесины, приводящих к ослаблению

и гибели деревьев. С другой стороны, более теплые зимы и увеличенная продолжительность вегетационного сезона благоприятны для представителей неморальной флоры [1].

Неморальные леса, в первую очередь дубовые, распространены по всей территории Беларуси. Однако почвенно-грунтовые условия и интенсивная хозяйственная деятельность, направленная на заготовку ценной древесины твердолиственных пород, привели к тому, что их встречаемость существенно различается по регионам. В настоящее время дубовые леса занимают 3,5 % от площади всех покрытых лесом земель [2], но сконцентрированы преимущественно в юго-восточной части республики, на севере Беларуси их меньше [3]. В то же время некоторые исследования показывают более широкое их распространение по территории Беларуси в разные периоды голоцена, в том числе в обозримом прошлом [4, 5].

В начале 2000-х годов отмечалось усыхание дубовых лесов на юге республики, что, по мнению ряда ученых, связано с ухудшением генетического состава и сокращением внутривидового разнообразия [6], комплексом антропогенных факторов (осушительной мелиорацией, подтоплениями и рубками) [7], а также со вспышками массового размножения листогрызущих насекомых [8]. Все эти факторы проявляются на фоне климатических изменений, что создает трудности при оценке степени их воздействия на состояние лесов и при прогнозировании динамики роста последних с учетом дальнейшего потепления климата.

Одним из инструментов, который позволяет дифференцировать влияние факторов внешней среды на деревья, являются дендрохронологические исследования. С учетом проводимой хозяйственной деятельности достоверные результаты можно получить, используя только региональные мастер-хронологии, которые включают информацию о деревьях, произрастающих в разных лесных массивах. Поскольку в типологическом отношении дубравы делятся на две субформации: суходольные (плакорные) дубравы (89 %), которые распространены повсеместно, и пойменные (11 %), преимущественно произрастающие в долинах крупных рек (Припяти, Березины, Днепра, Немана и др.) [7], представляется обоснованным оценить влияние климатических факторов на леса обеих субформаций.

Цель работы – установить климатические факторы, лимитирующие рост дуба черешчатого, произрастающего в различных лесотипологических условиях в южных регионах Беларуси, и определить перспективы роста деревьев дуба при климатических изменениях.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования являлись деревья дуба черешчатого (440 деревьев) на 17 пробных площадях, произрастающие в естественных насаждениях разных типов леса в южной части республики (рис. 1). Для отбора образцов древесины (кернов) использовали приростной бур Haglof. Подготовку образцов (кернов, спилов) для анализа выполняли по общепринятым методикам [9, 10].

С целью выявления ошибок измерений, а также ложных и выпавших колец использовали программу COFECNA 6.06P для перекрестного датирования серий годовичных колец. Степень чувствительности серий годовичных колец оценивали с помощью коэффициента чувствительности [11]. Серию колец считали чувствительной и пригодной для дендрохронологических реконструкций, если коэффициент превышал 0,3 [10].

Стандартизацию значений абсолютного радиального прироста выполняли для каждого дерева с дальнейшим усреднением индексов по объекту (пробной площади) и построением стандартизированной хронологии. Для сглаживания возрастных кривых прироста деревьев использовали сплайн-функцию (кусочно-сопряженную функцию) с заданным окном сплайна (67 % от длины ряда) и уровнем подавления дисперсии 50 %, экспоненциальную кривую и функцию Хагершофа. Сглаживание возрастных кривых и разработка стандартизированных древесно-кольцевых хронологий выполнены с использованием программы ARSTAN40c [12]. Путем усреднения индексов радиального прироста серий годовичных колец для каждой пробной площади строили стандартизированные древесно-кольцевые хронологии протяженностью от 140 до 230 лет, а затем – мастер-хронологии, которые объединяли серии годовичных колец из каждого региона исследований. Группировку древесно-кольцевых хронологий для мастер-хронологий и выделение дендрохронологически однородных регионов выполняли на основании корреляционного и кластерного ана-

лиза. Для оценки схожести прироста мастер-хронологий использовали  $t$ -критерий [11] и коэффициент синхронности, выраженный в процентах [9].

С помощью построенных мастер-хронологий разработаны функции отклика радиального прироста на климатические факторы. Под функцией отклика понимается метод множественной регрессии, использующий компоненты климатических данных для оценки индексированных величин радиального прироста. В нашей работе функцию отклика применяли в том виде, как она описана в работе [13].

В качестве исходных климатических параметров использовали среднемесячные температуры воздуха и месячные суммы осадков по метеорологическим станциям «Пружаны», «Житковичи», «Василевичи», «Жлобин» и «Бобруйск» по данным ГУ «Республиканский центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения и мониторингу окружающей среды».

**Результаты и их обсуждение.** По результатам корреляционного и кластерного анализа было выделено три региона, каждый из которых был разделен на два типа условий произрастания (рис. 1).

Для каждого региона и типа условий произрастания разработано 6 региональных мастер-хронологий, имеющих особо важные годы (так называемые реперные), отражающие основной характер поведения локальных хронологий для изучаемой территории.

Для юго-западной части республики построены две мастер-хронологии (НП «Беловежская пушча»). Одна из них (BYSW1o) построена по насаждениям, которые в прошлом формировались в условиях, близких к заболоченным и/или пойменным (наиболее вероятно папоротниковые и крапивные типы леса). Однако после проведенной на территории Национального парка в 1950–1970-х годах осушительной мелиорации эти насаждения трансформировались в мелиоративно-производные типы леса, которые по фитоценоотическому облику близки к кисличной серии типов леса. Вторая мастер-хронология построена для классических плакорных дубрав кисличных (BYSW2o), которые практически не испытывают влияния осушительной мелиорации.

Для южного региона Беларуси (НП «Припятский») разработаны две мастер-хронологии для пойменных дубрав с различным режимом затопления. Одна мастер-хронология (BYS1o) –

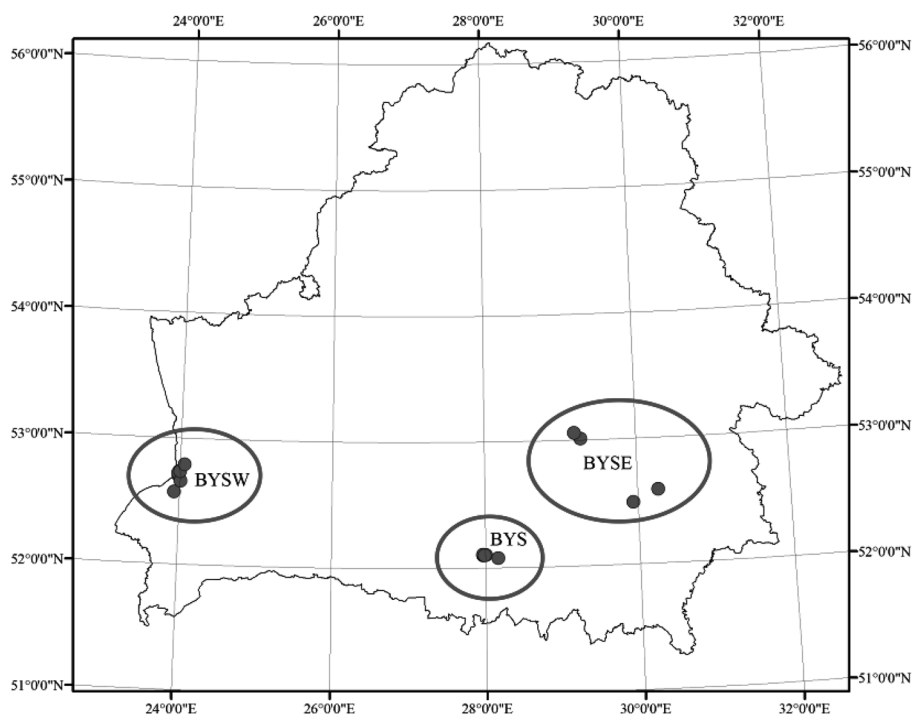


Рис. 1. Схема размещения объектов исследования в регионах: юго-западном (BYSW), южном (BYS), юго-восточном (BYSE)

Fig. 1. Scheme of location of research objects in regions: southwest (BYSW), south (BYS), southeast (BYSE)

для участков с ежегодным затоплением/подтоплением, вторая (BYS2o) – для участков, которые затапливаются только в годы наиболее сильного паводка. Последние по динамике радиального прироста больше близки к плакорным дубравам, чем к пойменным.

Для юго-восточного региона построены две мастер-хронологии: одна – для дубрав с ежегодным затоплением/подтоплением (BYSE1o), вторая (BYSE2o) – для плакорных кисличных дубрав.

Мастер-хронологии из юго-западной Беларуси имеют невысокую, но значимую связь друг с другом (*t*-критерий 5,7) (табл. 1). Реперные негативные годы у мастер-хронологии BYSW1o пришлись на 1904, 1937, 1940, 1961, 2000, 2003 гг., у BYSW2o – на 1940, 1964, 2015 гг. (табл. 2, рис. 2, а). Это свидетельствует о том, что на деревья из разных условий произрастания действуют различные лимитирующие факторы. Деревья из нарушенных условий (BYSW1o) намного чувствительнее к изменениям внешних факторов (коэффициент чувствительности 0,22), нежели деревья (BYSW2o), произрастающие в неизменных оптимальных почвенно-грунтовых условиях (коэффициент чувствительности (0,13).

Т а б л и ц а 1. Синхронность и *t*-критерий между мастер-хронологиями из дендрохронологически однородных регионов

Table 1. Synchronicity and *t*-value between master chronologies from dendrochronologically homogeneous regions

Мастер-хронология	BYSW1o	BYSW2o	BYS1o	BYS2o	BYSE1o	BYSE2o
BYSW1o		64	52	49	49	50
BYSW2o	<b>5,7</b>		52	67	55	65
BYS1o	2,2	2,1		66	65	61
BYS2o	2,7	<b>7,5</b>	<b>7,4</b>		61	68
BYSE1o	<b>3,8</b>	2,7	<b>6,1</b>	3,4		61
BYSE2o	<b>4,9</b>	<b>6,7</b>	<b>5,0</b>	<b>9,6</b>	<b>4,7</b>	

П р и м е ч а н и е. Значимая корреляция ( $p < 0,01$ ) выделена жирным шрифтом.

Т а б л и ц а 2. Индексы радиального прироста по различным мастер-хронологиям в негативные реперные годы

Table 2. Indexes of radial increment of various master chronologies in the negative pointer years

Реперный год	Мастер-хронология					
	BYSW1o	BYSW2o	BYS1o	BYS2o	BYSE1o	BYSE2o
1882					0,71	
1893						0,51
1889					0,69	
1899				0,65		
1904	0,47		0,48			
1914	0,39				0,62	
1918						
1928	0,62					
1934			0,63			
1937	0,58				0,66	
1940		0,66		0,51		0,51
1945					0,67	
1952		0,77		0,69	0,63	
1961	0,56					
1964		0,76		0,59		
1973			0,50		0,60	
1974				0,70		

Окончание табл. 2

Реперный год	Мастер-хронология					
	BYSW1o	BYSW2o	BYS1o	BYS2o	BYSE1o	BYSE2o
1986				0,77		
1987		0,82				
1992	0,79					
1993					0,59	
1996		0,80				
2000	0,55					
2002						0,70
2003	0,65		0,56	0,70	0,57	
2015		0,78				0,52

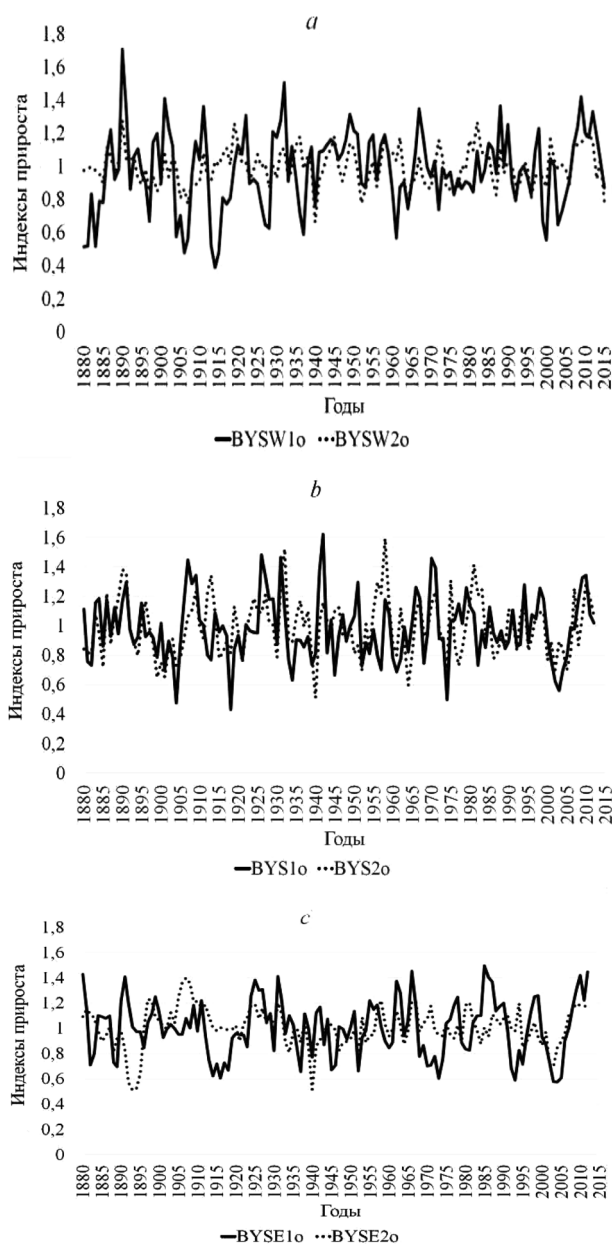


Рис. 2. Стандартизированные мастер-хронологии дуба черешчатого для юго-западной (а), южной (b), юго-восточной (c) частей Беларуси

Fig. 2. Standardized master chronology of oak tree for southwestern (a), southern (b), southeastern (c) parts of Belarus

Между стандартизированными мастер-хронологиями BYS1o и BYS2o (НП «Припятский») наблюдается высокая корреляция ( $t$ -критерий 7,4) (см. табл. 1). У обеих мастер-хронологий ряд реперных лет один и тот же (1876, 1827, 1974 и 2003). Это свидетельствует о том, что на них действуют схожие лимитирующие факторы (табл. 2, рис. 2, *b*). В то же время динамика прироста в хронологии BYS2o достаточно тесно связана с динамикой прироста плакорных дубрав из Беловежской пуши (хронология BYSW2o), т. е. она занимает промежуточное положение между классическими пойменными и плакорными дубравами. Сочетание влияния на рост деревьев неустойчивого пойменного режима и климатических факторов делает такого рода хронологии сложными для реконструкции и прогноза климатических изменений.

Стандартизированные мастер-хронологии из юго-восточного региона BYSE1o и BYSE2o отличаются невысокой корреляцией друг с другом ( $t$ -критерий 4,7) (см. табл. 1), поскольку первая построена для насаждений, произрастающих в пойменном типе леса, а вторая – для насаждений, расположенных на повышенных участках рельефа с кисличным типом леса. Реперными годами для мастер-хронологии BYSE1o являлись 1937, 1945, 1952, 1973, 1993, 2003, а для BYSE2o – 1893, 1940, 2002 и 2015 (табл. 2, рис. 2, *c*).

Результаты сравнительного анализа стандартизированных мастер-хронологий для разных лесорастительных условий показывают, что по динамике радиального прироста дубравы пойменного типа значительно отличаются от суходольных дубовых лесов. Влияние климатических факторов сглаживается влиянием периодического затопления этих участков в весенний, а иногда и в летний период. Это делает исключительно сложным выявление основных факторов, лимитирующих прирост дуба в пойменных условиях. В то же время в годы с крайней напряженностью климатических факторов (в частности, с сильными засухами) деревья во всех регионах реагируют одинаково. За последние 20 лет таким годом был 2003-й, когда у четырех мастер-хронологий отмечен отрицательный реперный год. В отдельных хронологиях индекс прироста в этот год упал более чем на 40 % от среднего значения.

*Функции отклика прироста на изменение климатических параметров дуба черешчатого в различных условиях произрастания на юге Беларуси.* Для анализа влияния климатических факторов на радиальный прирост деревьев были построены функции отклика и корреляционные функции и прироста дуба черешчатого на климатические изменения. В качестве независимых переменных использовали месячные суммы осадков и среднемесячные температуры воздуха по данным метеостанций «Пружаны», «Житковичи», «Василевичи», «Жлобин», «Бобруйск» за период с 1945 по 2016 г. В качестве зависимых переменных использовали индексы прироста стандартизированных мастер-хронологий.

Для юго-западного региона анализ коэффициентов корреляции стандартизированных мастер-хронологий BYSW1o и BYSW2o с метеорологическими параметрами показал значимое положительное влияние осадков июня в обеих мастер-хронологиях, а также положительные коэффициенты функции отклика с осадками декабря предыдущего года, марта и мая текущего года у мастер-хронологии BYSW1o (насаждения с нарушенным гидрологическим режимом). У мастер-хронологии BYSW1o значимые положительные коэффициенты корреляции наблюдались с температурами мая и сентября текущего года, положительный коэффициент функции отклика – с температурой октября предыдущего года (табл. 3, рис. 3). Совершенно другие зависимости с температурами отмечались у мастер-хронологии BYSW2o. Значимые положительные коэффициенты функции отклика с температурами наблюдались для ноября предыдущего, марта и июля текущего года. Однако у мастер-хронологии BYSW2o отмечалась обратная связь по сравнению с мастер-хронологией BYSW1o, у которой наблюдалось положительное влияние температуры июня (рис. 3).

Доля дисперсии, вычисленная с помощью модели «климат-прирост», у мастер-хронологии BYSW1o составила всего 21,5 %, а у BYSW2o – 40,5 %, т. е. в насаждениях, произрастающих в плакорных условиях с ненарушенным гидрологическим режимом прослеживается гораздо более четкая зависимость прироста от климатических факторов, чем в насаждениях с нарушенным гидрологическим режимом. В то же время в насаждениях с нарушенным в результате осушения

гидрологическим режимом прослеживается более тесная связь с осадками. Это делает их более чувствительными к летним засухам и приводит к снижению устойчивости.

У деревьев, произрастающих в южном регионе в условиях постоянного пойменного режима (BYS1o), и у периодически затопляемых деревьев (BYS2o) из значимых положительных факторов, влияющих на прирост, можно выделить осадки сентября предыдущего года и марта текущего года (табл. 3, рис. 4). Однако деревья из мастер-хронологии BYSE1o более чувствительны к осадкам августа, октября, декабря предыдущего года и июня, июля текущего года (рис. 4). У обеих мастер-хронологий значимый отрицательный коэффициент корреляции функции отклика с температурой наблюдался для августа предыдущего года. Это связано с тем, что в августе и сентябре предыдущего года формируются ресурсы для роста дерева в начале вегетационного сезона текущего года, а засухи в конце лета ограничивают эту возможность.

Т а б л и ц а 3. Коэффициенты функции отклика

Table 3. Coefficients of response function

Показатель		BYSW1o	BYSW2o	BYS1o	BYS2o	BYSE1o	BYSE2o
Месячная сумма осадков	VIIIp	-0,034	0,029	0,089	0,243*	0,110*	0,202*
	IXp	-0,012	-0,013	0,267*	0,127*	0,041	0,043
	Xp	-0,058	-0,090	0,019	0,138*	-0,153*	0,052
	XIp	0,011	-0,006	0,012	0,029	0,017	0,150*
	XIIp	0,143*	-0,012	0,051	0,214*	0,104	0,177*
	I	0,028	0,035	0,113	0,069	0,053	0,083
	II	0,038	-0,044	0,002	0,064	0,013	-0,0002
	III	0,071*	-0,022	0,325*	0,109*	-0,065	0,058
	IV	0,042	0,072	0,162	0,058	-0,015	-0,110
	V	0,085	-0,006	0,164	0,028	-0,006	0,090
	VI	0,211*	0,289*	0,073	0,230*	0,116*	0,247*
	VII	0,103	0,259*	0,045	0,165*	0,042	0,067
	VIII	0,046	0,071	-0,178	-0,049	0,083*	0,078
IX	-0,047	-0,098	0,066	-0,019	-0,030	-0,089	
Среднемесячная температура	VIIIp	-0,062	-0,060	-0,263*	-0,130*	-0,127*	0,001
	IXp	0,045	-0,047	-0,030	0,055	-0,012	-0,060
	Xp	0,042	0,112	-0,211	0,077	0,050	0,119
	XIp	0,076	0,167*	0,071	-0,077	-0,158*	-0,061
	XIIp	0,062	0,089	0,015	-0,057	-0,020	0,170
	I	-0,011	-0,066	-0,193	-0,028	-0,043	-0,071
	II	0,020	0,071	-0,172	-0,054	-0,090*	0,011
	III	0,037	0,133*	-0,052	0,019	0,034	-0,107
	IV	0,029	0,071	0,114	-0,100	0,168*	0,004
	V	0,100*	0,0456	0,065	0,205*	0,143*	0,124
	VI	-0,032	-0,159*	0,241*	0,055	0,130*	-0,023
	VII	0,084	0,151*	-0,040	0,022	0,0074	-0,0002
	VIII	0,060	0,050	0,066	-0,0008	-0,0471	-0,081*
IX	0,091*	0,045	-0,009	-0,006	-0,0089	0,006	

П р и м е ч а н и е. \* – коэффициенты корреляции значимы при  $p < 0,05$ . Буквой «р» обозначены месяцы предыдущего года.

Регрессионная модель объясняет 37,9 % вариации прироста деревьев дуба от климатических факторов мастер-хронологии BYS1 и 48,0 % – BYS2o. Это подтверждает более сложные связи прироста с внешними факторами у ежегодно затопляемых пойменных дубрав и сложностью вычленения факторов, лимитирующих прирост.

Значимые коэффициенты корреляции и функции отклика мастер-хронологий BYSE1o и BYSE2o в юго-восточном регионе выявлены для осадков августа предыдущего, июня и августа текущего года (табл. 3, рис. 5). Однако у мастер-хронологии BYSE1o значимый отрицательный коэффициент корреляции и функции отклика наблюдался с осадками октября предыдущего года.

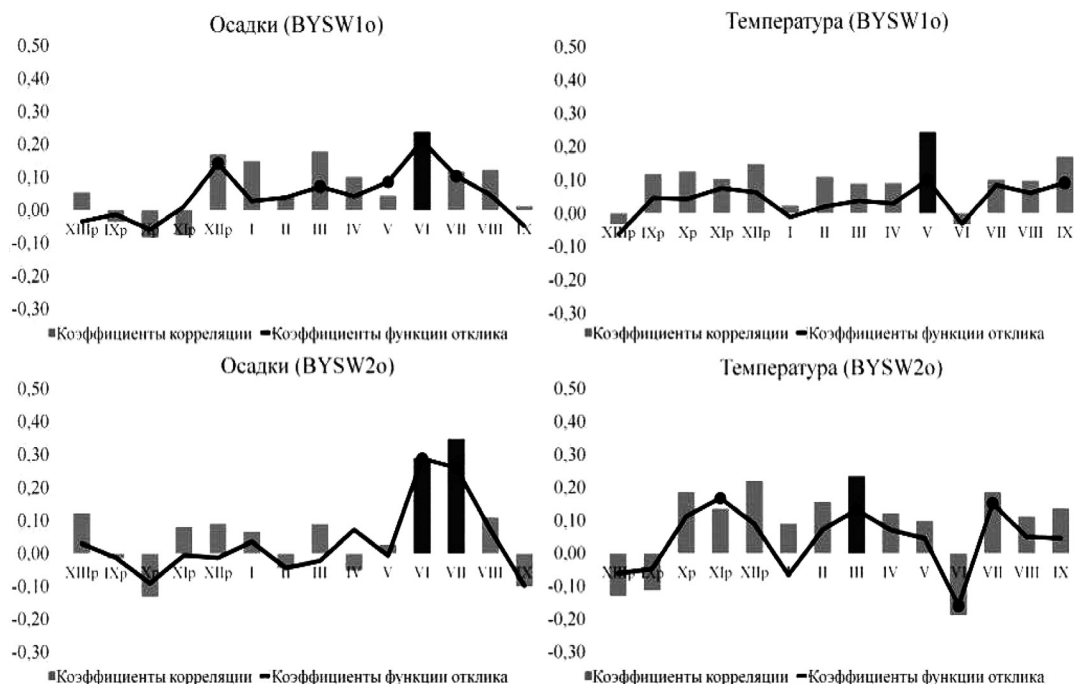


Рис. 3. Коэффициенты корреляции и функции отклика радиального прироста по стандартизированным мастер-хронологиям BYSW1o и BYSW2o (юго-западный регион) с месячными суммами осадков и среднемесячными температурами воздуха. Значимые при  $p < 0,05$  месяцы выделены темным цветом и маркерами

Fig. 3. Correlation coefficient and response function of standardized master chronologies BYSW1o and BYSW2o with monthly precipitation and average monthly air temperatures. Significant  $p < 0.05$  are highlighted in dark color and markers

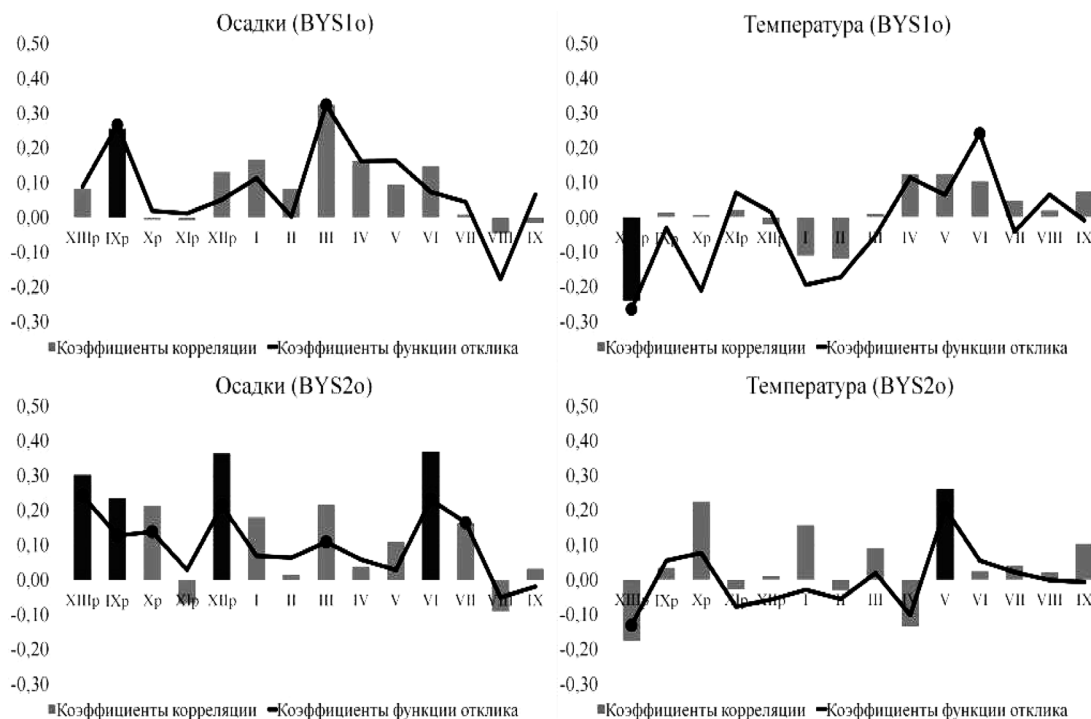


Рис. 4. Коэффициенты корреляции и функции отклика радиального прироста по стандартизированным мастер-хронологиям BYS1o и BYS2o (южный регион) с месячными суммами осадков и среднемесячными температурами воздуха. Значимые при  $p < 0,05$  месяцы выделены темным цветом и маркерами

Fig. 4. Correlation coefficient and response function of standardized master chronologies BYS1o and BYS2o with monthly precipitation and average monthly temperatures. Significant  $p < 0.05$  are highlighted in dark color and markers



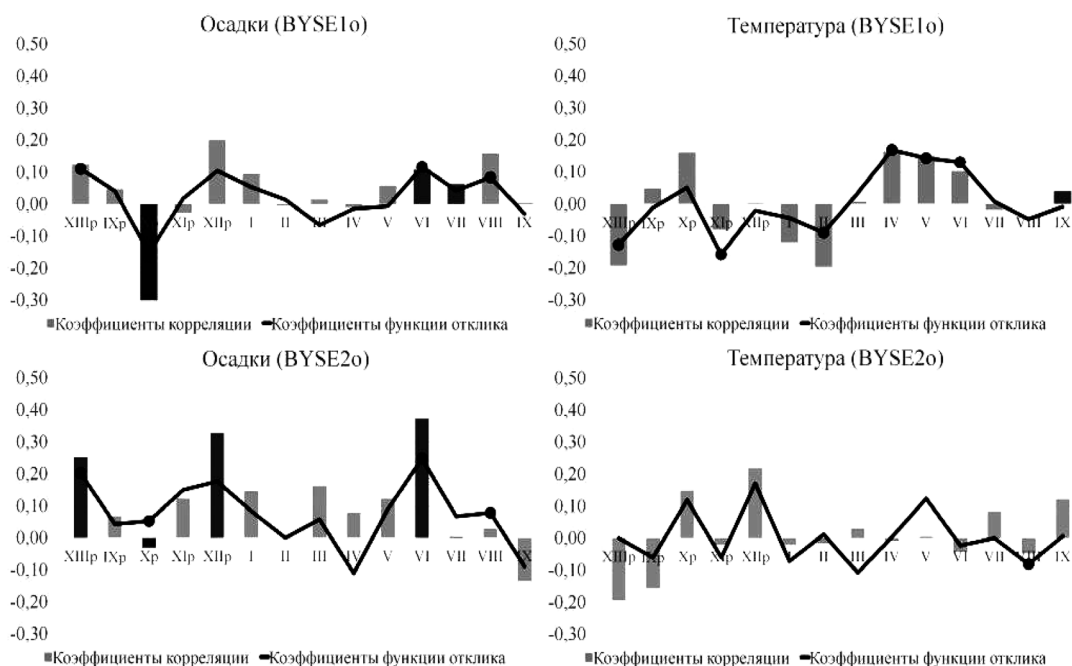


Рис. 5. Коэффициенты корреляции и функции отклика радиального прироста по стандартизованным мастер-хронологиям BYSE1o и BYSE2o (юго-восточный регион) с месячными суммами осадков и среднемесячными температурами воздуха. Значимые при  $p < 0,05$  месяцы выделены темным цветом и маркерами

Fig. 5. Correlation coefficient and response function of standardized master chronologies BYSE1o and BYSE2o with monthly precipitation and average monthly temperatures. Significant  $p < 0.05$  are highlighted in dark color and markers

**Заклучение.** Использование региональных мастер-хронологий, впервые на территории Беларуси примененных для деревьев дуба, позволило оценить влияние климатических факторов на изменчивость годичного прироста в разных условиях произрастания. По особенностям динамики прироста в южной Беларуси выделено три региона (юго-западный, южный и юго-восточный), для которых определены реперные годы в годичном приросте и разработаны функции отклика, показывающие различное влияние климатических факторов на радиальный прирост в каждом из них.

Модели «климат-прирост» в целом объясняют более высокую долю погодичной изменчивости прироста (33,5–48,0 %) в мастер-хронологиях из кисличного типа леса, чем из пойменных или мелиоративно-производных типов леса, где обусловленная климатом изменчивость годичного прироста в 1,5 раза ниже (21,5–37,9 %).

Рост деревьев, произрастающих в пойменных условиях, больше лимитируется температурами в начале вегетационного сезона, а также в конце предыдущего года. Причем в первом случае коэффициенты функции отклика положительные, а во втором – отрицательные. Таким образом, более теплые весенние месяцы и более раннее начало вегетационного сезона приводят к увеличению годичного прироста, а более теплые осенние месяцы – наоборот, к снижению прироста в следующем году.

На плакоре (дубравы кисличные) лимитирующими факторами выступают количество осадков и температуры июня–июля текущего года и температура марта (юго-западный регион), осадки июня–июля текущего года и осенних-зимних месяцев предшествующего года (южный и юго-восточный регионы).

Учитывая, что прогнозируемое потепление будет обусловлено как зимними, так и весенне-осенними температурами, а количество осадков останется без изменений или с небольшим увеличением, то на деревьях дуба, произрастающих на плакоре, такие изменения должны сказаться

положительно. На изменение прироста деревьев дуба, произрастающих в пойменных условиях, вероятнее всего, прогнозируемые изменения климата существенно повлиять не должны.

Проведенные исследования позволили по-новому взглянуть на особенности динамики дубовых лесов в южных регионах Беларуси и показали, что в условиях климатических изменений дуб является той породой, которая при адекватном режиме ведения лесного хозяйства может прийти на смену хвойным в подходящих условиях произрастания.

### Список использованных источников

1. Пугачевский, А. В. Растительность в новых природных условиях / А. В. Пугачевский, И. М. Степанович, М. В. Ермохин // Наука и инновации. – 2011. – № 4. – С. 21–24.
2. Государственный лесной кадастр Республики Беларусь по состоянию на 01.01.2016 / М-во лес. хоз-ва Респ. Беларусь, Лесоустр. респ. унитар. предприятие «Белгослес». – Минск, 2015. – 90 с.
3. Шустова, С. Ю. Зонально-типологические особенности формирования дубрав Беларуси в условиях антропогенного воздействия : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.05 / С. Ю. Шустова. – Минск, 2005. – 221 л.
4. Еловичева, Я. К. Эволюция природной среды антропогена Беларуси (по палинологическим данным) / Я. К. Еловичева. – Минск : Белсэнс, 2001. – 292 с.
5. Ермохин, М. В. Ретроспективный анализ распространения широколиственных лесов на территории Беларуси / М. В. Ермохин // Ботаника (исследования) : сб. науч. тр. / Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск, 2011. – Вып. 40. – С. 186–195.
6. Сазонов, А. А. К вопросу о причинах массового усыхания дубовых лесов Беларуси в начале XXI века / А. А. Сазонов, В. Б. Звягинцев // Проблемы лесоведения и лесоводства : сб науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2010. – Вып. 70. – С. 572–588.
7. Голод, Д. С. Состояние дубрав Беларуси и проблема их восстановления / Д. С. Голод, В. С. Адерихо // Дуб – порода третьего тысячелетия: сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 1998. – Вып. 48. – С. 6–72.
8. Углянец, А. В. О необходимости проведения комплекса мероприятий по сохранению пойменных дубрав в Национальном парке «Припятский» / А. В. Углянец // Проблемы лесоведения и лесоводства : сб науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2014. – Вып. 74. – С. 122–127.
9. Ваганов, Е. А. Дендроклиматические исследования в Урало-Сибирской субарктике / Е. А. Ваганов, С. Г. Шиятов, В. С. Мазепа. – Новосибирск : Наука, 1997. – 245 с.
10. Ваганов, Е. А. Дендрохронология : учеб. пособие / Е. А. Ваганов, В. Б. Круглов, В. Г. Васильев. – Красноярск : Сибир. фед. ун-т, 2008. – 120 с.
11. Fritts, H. C. Tree-rings and climate / H. C. Fritts. – London ; N. Y. ; San Francisco : Acad. Press, 1976. – 582 p.
12. Holmes, R. L. Dendrochronology program library. Users manual / R. L. Holmes. – Tucson : Univ. of Arizona, 1984. – 51 p.
13. Blasing, T. J. Response functions revisited / T. J. Blasing, A. M. Solomon, D. N. DuVick // Tree-Ring Bull. – 1984. – Vol. 44. – P. 1–15.

### References

1. Pugachevskii A. V., Stepanovich I. M., Ermokhin M. V. Vegetation in a new natural conditions. *Nauka i innovatsii = Science and Innovations*, 2011, no. 4, pp. 21–24 (in Russian).
2. *State forest cadaster of the Republic of Belarus as of 01.01.2016*. Minsk, Forest management republican unitary enterprise “Belgosles”, 2015. 90 p. (in Russian).
3. Shustova S. Yu. *Zonal and typological features of formation of oak forests in Belarus in the conditions of anthropogenic impact*. Ph. D. Thesis. Minsk, 2005. 221 p. (in Russian).
4. Elovicheva Ya. K. *The environment of Belarus in anthropogen (according to palynological data)*. Minsk, Belsens Publ., 2001. 292 p. (in Russian).
5. Yermokhin M. V. Retrospective analysis of broad-leaved forest distribution on the territory of Belarus. *Botanika (issledovaniya): sbornik nauchnykh trudov* [Botany (research): a collection of scientific papers]. Minsk, 2011, iss. 40, pp. 186–195 (in Russian).
6. Sazonov A. A. On the causes of mass drying of oak forests in Belarus at the beginning of XXI century. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forest science and forestry: a collection of scientific papers]. Gomel', 2010, iss. 70, pp. 572–588 (in Russian).
7. Golod D. S., Aderikho V. S. The condition of oak forests in Belarus and problem of their restoration. *Dub – poroda tret'ego tysyacheletiya: sbornik nauchnykh trudov* [Oak – a breed of the third millennium: a collection of scientific papers]. Gomel', 1998, iss. 48, pp. 66–72 (in Russian).
8. Uglyanets A. V. On the need to carry out a complex of measures to conserve floodplain oak forests in “Pripyatsky” National Park. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forest science and forestry: a collection of scientific papers]. Gomel', 2014, iss. 74, pp. 122–127 (in Russian).

9. Vaganov E. A., Shiyatov S. G., Mazepa V. S. *Dendroclimatic studies in Ural-Siberian Subarctic*. Novosibirsk, Nauka Publ., 1997. 245 p. (in Russian).
10. Vaganov E. A., Kruglov V. B., Vasil'ev V. G. *Dendrochronology: tutorial*. Krasnoyarsk, Siberian Federal University Publ., 2008. 120 p. (in Russian).
11. Fritts H. C. *Tree-rings and climate*. London, New York, San Francisco, Academic Press, 1976. 582 p.
12. Holmes R. L. *Dendrochronology program library. Users manual*. Tucson, University of Arizona, 1984. 51 p.
13. Blasing T. J., Solomon A. M., Duvick D. N. Response functions revisited. *Tree-Ring Bulletin*, 1984, vol. 44, pp. 1–15.

### **Информация об авторах**

*Кныш Наталья Валерьевна* – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: knyshnv@gmail.com

*Ермохин Максим Валерьевич* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yermamaxim@yahoo.com

### **Information about the authors**

*Natallia V. Knysh* – Postgraduate student, Junior 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: knyshnv@gmail.com

*Maxim V. Yermokhin* – Ph. D (Biol.), Leading researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yermamaxim@yahoo.com

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 577.342  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-180-189>

Поступила в редакцию 12.12.2018  
Received 12.12.2018

Н. В. Козел<sup>1</sup>, М. С. Радюк<sup>1</sup>, Т. В. Самович<sup>1</sup>, И. А. Дремук<sup>1</sup>, Л. С. Габриелян<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

## НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА НИТРАТРЕДУКТАЗЫ В КЛЕТКАХ *SPIRULINA PLATENSIS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

**Аннотация.** Исследовано влияние светодиодного освещения разного спектрального состава на продуктивность *Spirulina platensis*, накопление в ее клетках белка и экспрессию гена нитратредуктазы. Показано, что при светодиодном освещении с преобладанием красной составляющей в спектре излучения продуктивность водоросли на 9–29 % больше, чем при освещении люминесцентной лампой. Использование одного синего света существенно (на 83 %) уменьшает продуктивность *Spirulina platensis*, что, по-видимому, обусловлено отсутствием в спектральном составе осветителя желтой и красной составляющих, которые наиболее эффективно поглощаются фикоцианином. Выявлена положительная корреляция между возрастанием продуктивности водоросли и накоплением в ее клетках белка. Так, при использовании осветителя с красными светодиодами содержание белка увеличилось на 21 % в расчете на 1 г сухого веса и на 47 % в расчете на 1 л суспензии по отношению к контролю. Анализ экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *Spirulina platensis*, не выявил прямой зависимости между накоплением белка и уровнем экспрессии гена *Nar* в наиболее перспективном (в плане выхода биомассы и накопления белка) варианте с использованием красных светодиодов. Это указывает на определяющую роль фотосинтетической активности клеток *Spirulina platensis* в увеличении продуктивности и синтеза белка.

**Ключевые слова:** *Spirulina platensis*, сухой вес, белок, нитратредуктаза, фотосинтетически активный свет, спектральный состав, светодиоды

**Для цитирования:** Накопление белка и экспрессия гена нитратредуктазы в клетках *Spirulina platensis* в зависимости от спектрального состава светодиодного излучения / Н. В. Козел [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 180–189. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-180-189>

N. V. Kozel<sup>1</sup>, M. S. Radyuk<sup>1</sup>, T. V. Samovich<sup>1</sup>, I. A. Dremuk<sup>1</sup>, L. S. Gabrielyan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Yerevan State University, Yerevan, Armenia

## PROTEIN ACCUMULATION AND EXPRESSION OF THE NITRATE REDUCTASE GENE IN *SPIRULINA PLATENSIS* CELLS DEPENDING ON THE SPECTRAL COMPOSITION OF LED RADIATION

**Abstract.** The effect of LED lighting of different spectral composition on the productivity of *Spirulina platensis*, an accumulation of protein in alga cells and an expression of the nitrate reductase gene has been studied. It was shown that LED lighting with a predominance of the red component in the emission spectrum allows achieving 9–29 % higher alga productivity compared to using fluorescent lamp illumination. Illumination with single blue light resulted in significant (83 %) decrease in the productivity of *Spirulina platensis* which apparently was due to the absence of the yellow and red components in the illuminator spectral composition, which are most effectively absorbed by phycocyanin. A positive correlation between an increase in the productivity of alga and the accumulation of protein in its cells was found. So, by using an illuminator with red LEDs, the protein content increased by 21 % calculated per gram of dry weight and 47 % calculated per liter of suspension relative to the control. Analysis of the expression of the *Nar* gene encoding nitrate reductase in *Spirulina platensis* cells did not reveal a direct dependence between an increasing protein accumulation and an expression level of the *Nar* gene in the most promising in terms of biomass and protein yield sample of alga, growing under red LEDs. This indicates the crucial role of the photosynthetic activity of *Spirulina platensis* cells in increasing productivity and protein synthesis.

**Keywords:** *Spirulina platensis*, dry weight, protein, nitrate reductase, photosynthetically active light, the spectral composition of the LEDs

**For citation:** Kozel N. V., Radyuk M. S., Samovich T. V., Dremuk I. A., Gabrielyan L. S. Protein accumulation and expression of the nitrate reductase gene in *Spirulina platensis* cells depending on the spectral composition of led radiation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 180–189 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-180-189>

**Введение.** Синезеленая водоросль (цианобактерия) *Spirulina platensis* (*S. platensis*) наряду с *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* и различными видами *Chlorella* является основным объектом промышленного культивирования микроводорослей и широко используется для получения биомассы, обогащенной биологически активными веществами –  $\beta$ -каротином, фикоцианином, полиненасыщенными жирными кислотами [1]. Известно, что *S. platensis*, клетки которой накапливают большое количество (до 70 % от сухого веса) белка [1, 2], является лидером по содержанию белка среди живых организмов, в 2 раза превосходя по этому показателю сою, содержание белка в которой составляет около 35 % [1]. Белок *S. platensis* содержит все незаменимые аминокислоты, которые не могут быть синтезированы животными организмами, но, в отличие от заменимых аминокислот, должны поступать с пищей. Эти аминокислоты необходимы для нормального роста и развития, а также для поддержания оптимального физиологического состояния организма человека и животных. Однако в зависимости от условий культивирования водоросли содержание белка в клетках *S. platensis* может существенно различаться. Наряду с такими важными факторами, как обеспеченность элементами минерального питания и температурные условия культивирования, ключевую роль в плане выхода биомассы и накопления в клетках *S. platensis* белка играет световой фактор. Причем важным является не только уровень освещенности водоросли, но и спектральный состав фотосинтетически активного света [3].

Существенную роль в накоплении белка в клетках многих фотосинтезирующих организмов играет также ассимиляция неорганического азота, который входит в состав белков и нуклеиновых кислот. Свободный азот воздуха растения (кроме бобовых) усваивать не могут. Большинство растительных организмов получают его в основном в виде нитратов. Ключевым ферментом в цепи восстановления нитрата до нитрита, а затем до аммония является нитратредуктаза. В отличие от высших растений, ассимиляция нитратов в клетках *S. platensis* изучена недостаточно. Остается неясным, каким образом клетки водоросли регулируют свой метаболизм, чтобы синтезировать такое большое количество белка. Возможно, это связано с тем, что нитратредуктаза *S. platensis* имеет большую специфическую активность и стабильность, чем нитратредуктаза высших растений, в частности риса [4]. Кроме того, при недостатке в среде обитания нитратов клетки *S. platensis* в большей степени, чем другие организмы, способны к утилизации всех доступных источников азота (нитритов и аммония) [5]. В литературе имеются данные о транскрипционной и посттрансляционной регуляции в высших растениях нитратредуктазы внешними стимулами, в том числе и светом [6]. По нашему мнению, и в клетках фототрофных микроорганизмов, в частности *S. platensis*, при существенном изменении спектрального состава освещения могут проявляться подобные регуляторные механизмы, направленные на адаптацию системы ассимиляции неорганического азота к изменяющимся условиям окружающей среды. Так как с процессами превращения азота в клетках растительных организмов, в том числе и водорослей, непосредственно связана их продуктивность, выяснение влияния светодиодного освещения разного спектрального состава на систему ассимиляции неорганического азота представляется весьма актуальным.

Следует отметить, что промышленное культивирование *S. platensis* в климатических условиях Беларуси связано с большими затратами на освещение. В то же время использование в процессе выращивания этой водоросли энергоэффективных источников света на основе светодиодов позволит снизить затраты на производство *S. platensis*, а подбор оптимального спектрального состава осветителей даст возможность получать больше продукции, обладающей высокой питательной ценностью. Светодиодные источники освещения являются наиболее перспективными для выращивания фотосинтезирующих организмов, в том числе и водорослей [7, 8]. Это обусловлено низким энергопотреблением, высоким коэффициентом светоотдачи и длительным сроком службы таких источников, а кроме того, светодиоды позволяют сконструировать осветители с определенным спектральным составом излучения, что крайне важно при разработке высокоэффективного источника фотосинтетически активного света.

Цель данной работы – выявление особенностей накопления белка, а также экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу, в клетках *S. platensis* в условиях светодиодного освещения разного спектрального состава.

**Объекты и методы исследования.** В качестве объекта исследования использовали трихомную синезеленую водоросль (цианобактерию) *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler (штамм IBCE S-2 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси) [9]. Водоросль выращивали на стандартной среде Заррука [1] по методу, модифицированному согласно работе [10], в стеклянных емкостях в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре  $27 \pm 2$  °C в течение 96 ч. Для выращивания *S. platensis* использовали осветители, содержащие красный и синий светодиоды и их комбинации (красный:синий – 2:1 по энергии излучения), а также осветитель, в спектре излучения которого содержался дополнительно желтый и голубой свет (красный:желтый:голубой:синий – 3:3:1:1 по энергии излучения). В качестве контроля использовали энергосберегающую люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827. Интенсивности световых потоков лампы и светодиодных осветителей изначально были выравнены по плотности потока фотонов ( $100 \text{ мкмоль квантов}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ ).

Продуктивность *S. platensis* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензии в зеленой области спектра при 560 нм на спектрофотометре Solar PB2201 (Беларусь). Поглощение при 560 нм соответствует минимуму поглощения пигментов *S. platensis* (рис. 1), поэтому ослабление светового потока в этой области спектра практически полностью обусловлено лишь самой массой клеток. Для количественного расчета сухой биомассы *S. platensis* использовали формулу, предложенную Ken Sasaki с соавт. [11].

Для определения белка суспензию *S. platensis* осаждали путем центрифугирования на центрифуге Sigma 1-15K (Германия) при 18 000 g, к осадку приливали 0,4 мл 1 н NaOH, встряхивали на вортексе и нагревали на термошейкере Eppendorf (Германия) при температуре 80 °C и постоянном перемешивании. Далее объем доводили дистиллированной водой до 2 мл и центрифугировали при температуре 4 °C и 18 000 g (центрифуга Sigma 1-15K). Надосадочную жидкость переносили в мерные пробирки. Осадок ресуспендировали с 0,2 мл 1 н NaOH и нагревали на термошейкере при температуре 80 °C и постоянном перемешивании. Процедуру повторяли несколько раз до полного извлечения белка [12, 13]. Количество белка определяли

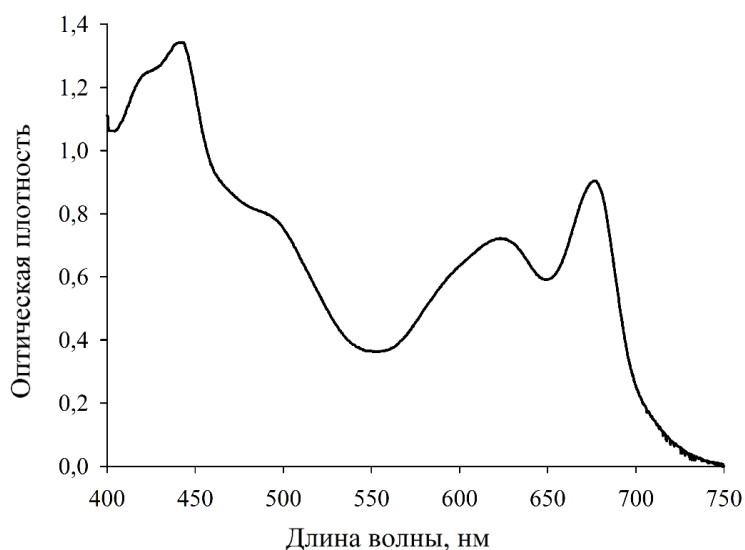


Рис. 1. Спектр поглощения нативной культуры *S. platensis*, полученный на спектрофотометре с интегрирующей сферой СФ-14 («ЛОМО», Россия)

Fig. 1. Absorption spectrum of native culture of *S. platensis*, obtained on a spectrophotometer with integrating sphere SF-14 (LOMO, Russia)

по методу Бредфорд [14]. Для этого к 0,01 мл щелочного раствора белка добавляли 1 мл реактива, содержащего ортофосфорную кислоту и краситель кумасси G-250 (Sigma-Aldrich, США), растворенный в этаноле, и определяли оптическую плотность при 595 и 720 нм. По калибровочной кривой, которую строили с использованием бычьего сывороточного альбумина производства Sigma-Aldrich известной концентрации, определяли количество белка. Уравнение калибровочной кривой:  $y = 0,0294x + 0,0049$ ,  $r^2 = 0,9937$ , где  $y$  – оптическая плотность;  $x$  – содержание белка, мкг;  $r^2$  – коэффициент детерминации.

Для анализа экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *S. platensis*, выращенной при светодиодном освещении с различным спектральным составом, выделяли РНК, на матрице которой синтезировали кДНК. Для выделения РНК использовали TRI Reagent® согласно протоколу фирмы Sigma-Aldrich (sigma-aldrich.com). Синтез кДНК проводили согласно протоколу фирмы ThermoFisher Scientific (thermofisher.com) с помощью RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit в амплификаторе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Полученную кДНК использовали для ПЦР-анализа уровня экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *S. platensis*, в зависимости от спектрального состава светодиодного освещения.

Подбор праймеров, специфичных к гену *Nar* и гену-нормализатору *16SrRNA*, осуществляли, используя последовательности мРНК выбранных генов, найденных в базе данных Nucleotide (NCBI). Далее при помощи программы Primer Blast NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) подбирали несколько пар специфичных к выбранным генам праймеров с наименьшим количеством шпилек, дуплексов, оптимальным соотношением GC пар и минимальной разницей между температурами плавления. Праймеры синтезировали в лаборатории ДНК-праймеров Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (табл. 1).

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность прямых (F) и обратных (R) праймеров, используемых для анализа экспрессии генов *Nar* и *Sp16S rRNA* в клетках *S. platensis*

Table 1. Nucleotide sequence of forward (F) and reverse (R) primers used to analyze the expression of *Nar* and *Sp16S rRNA* genes in *S. platensis* cells

Ген	Белок	Праймеры	Температура отжига, °C	Продукт, п. н.
<i>Nar</i>	Нитратредуктаза <i>S. platensis</i>	F-ACAAGCTAAACCCGACTGGG R-CGGTTTCGGTCTCAGGACAA5'→3'	62	206
<i>Sp16S rRNA</i>	16S субъединица рибосомы <i>S. platensis</i>	F-AAGTCATCATGCCCTTACG R-AGCGATTCCTCCTTCATGC5'→3'	60	158

ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini Thermal Cycler в следующих условиях: 1) предварительная денатурация – при 95 °C 3 мин; 2) плавление – при 94 °C 30 с; отжиг – при 56–62 °C 45 с; элонгация – при 72 °C 45 с (34 цикла); 3) конечная элонгация – при 72 °C 15 мин; 4) охлаждение – при 5 °C 20 мин. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, в ТАЕ-буфере (0,04 М Трис-ацетат, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) при напряжении 110 В и токе 144 мА в течение 45–50 мин. Визуализацию геля осуществляли под ультрафиолетовым светом при помощи системы гель-документирования GelDoc 2000 (Bio-Rad, США). Для проверки соответствия линейных размеров полученного ПЦР-продукта теоретически рассчитанным проводили сравнение соответствующих электрофоретических зон с маркером линейных размеров ДНК. Количество белков рассчитывали в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу TotalLab 2.01.

В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее, стандартное отклонение среднего, достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ( $p \leq 0,05$ ). Представлены данные 5 опытов в трехкратной биологической повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2016, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [15].

**Результаты и их обсуждение.** Структура фотосинтетического аппарата *S. platensis* по сравнению с таковой у высших растений и некоторых других видов водорослей имеет ряд отличительных особенностей, например: отсутствие в составе фотосинтетических пигментов хлорофилла *b*, высокое содержание  $\beta$ -каротина, наличие в клетках *S. platensis* большого количества фикоцианина, характерного для синезеленых водорослей, который активно участвует в процессах сбора энергии света, а также в защитных реакциях при окислительном воздействии [16]. Указанные отличительные особенности структуры фотосинтетического аппарата водоросли могут играть ключевую роль в адаптации *S. platensis* к изменению спектрального состава фотосинтетически активного света. В связи с этим для выращивания *S. platensis*, содержащей большое количество фикоцианина и  $\beta$ -каротина, кроме классических красного и синего светодиодов и их комбинации (красный:синий – 2:1 по энергии излучения) нами использован осветитель более сложной конструкции, в спектре излучения которого дополнительно имелись как желтый, так и голубой свет, активно поглощаемые фикоцианином и  $\beta$ -каротином соответственно. В качестве контроля использовали энергосберегающую люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827/2P с цветовой температурой 2700 К (теплого свечения с преобладанием красной полосы испускания). Для корректности проведения сравнительного анализа о влиянии спектрального состава освещения на клетки *S. platensis* показатели интенсивности световых потоков всех источников освещения были выравнены по плотности потока фотонов, которая составляла 100 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>·с).

Установлено, что при использовании всех вариантов светодиодного освещения, за исключением синего, продуктивность *S. platensis* увеличивалась по сравнению с освещением люминесцентной лампой (контроль) (табл. 2). В частности, при использовании осветителя с красными светодиодами продуктивность водоросли увеличилась на 29 %, а в варианте с совместным использованием красных и синих светодиодов – на 21 % по сравнению с освещением люминесцентной лампой. Наименьший положительный эффект был достигнут в варианте «красный + желтый + голубой + синий» (3:3:1:1 по энергии излучения) – увеличение продуктивности составило 9 % по сравнению с контролем. При использовании одного синего света наблюдалось существенное уменьшение (на 83 %) продуктивности водоросли, основной причиной которого может быть снижение фотосинтетической активности клеток *S. platensis* в связи с отсутствием в спектральном составе освещения желтого и красного света, наиболее эффективно поглощаемого фикоцианином (максимум поглощения фикоцианина – 620 нм). Кроме того, не исключена вероятность и более сложного, не связанного с трансформацией световой энергии в фотосинтетическом аппарате *S. platensis* участия фикоцианина в возбужденном состоянии в регуляции внутриклеточных процессов, что также может быть причиной ингибирования роста водоросли под синим светом.

Отметим, что нами уже отмечалось положительное влияние светодиодного освещения на продуктивность *S. platensis* [17]. Однако полученная нами ранее в экспериментах скорость роста водоросли была достаточно низкой (не более 111 мг сухого веса/л суспензии в сутки) из-за относительно невысокой интенсивности света первых сконструированных нами светодиодных осветителей (75 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>·с)). Для улучшения светообеспеченности культуры *S. platensis* интенсивность светового потока источников света была увеличена нами на 30 %, а кроме того, путем изменения формы культуральных сосудов была увеличена площадь поверхности суспензии, на которую падает свет, и уменьшена глубина жидкости. Такой подход позволил практически в 3 раза увеличить скорость роста *S. platensis* – до 320 мг сухого веса/л суспензии в сутки (или 2,24 г сухого веса/л суспензии в неделю) (табл. 2), что соответствует литературным данным, полученным для культур с высокой интенсивностью роста [1, 18].

На рис. 2 представлена динамика роста *S. platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips. Уже после 24 ч культивирования наблюдались тенденция к увеличению продуктивности водоросли при использовании красного света и существенное замедление роста на синем свету. Спустя 48 ч культивирования эти различия



стали более существенными и уже достоверно регистрировалась интенсификация роста *S. platensis* при использовании светодиодного освещения с преобладанием красной составляющей в спектре излучения. При дальнейшем культивировании водоросли данный эффект сохранялся.

Таблица 2. Продуктивность и скорость роста *S. platensis* при выращивании водоросли под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль) в течение 96 ч

Table 2. Productivity and growth rate of *S. platensis* during algal growth under LED illuminators and a fluorescent Philips lamp (control) for 96 h

Показатель	Свет				
	Белый (контроль)	Красный	Синий	Красный + синий	Красный + желтый + голубой + синий
Продуктивность, мг сухого веса/л суспензии	992,7 ± 36,8	1281,9 ± 29,7*	168,9 ± 19,0*	1202,2 ± 40,0*	1086,3 ± 30,1*
Скорость роста, мг сухого веса/л суспензии в сутки	248,2 ± 9,2	320,5 ± 7,4*	42,5 ± 4,8*	300,6 ± 10,0*	271,6 ± 7,6*

Примечание. \* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $p \leq 0,05$ . То же в табл. 3.

При существенном увеличении продуктивности водоросли в условиях светодиодного освещения несомненный интерес представляет исследование изменения питательной ценности биомассы, в частности изменение количества белка в клетках *S. platensis* при интенсивном ее росте. Анализ содержания белка в клетках *S. platensis* позволил выявить увеличение его синтеза во всех опытных вариантах по отношению к контролю, за исключением варианта с использованием синего света (табл. 3). Так, при использовании осветителя с красными светодиодами содержание белка увеличилось на 21 %, в варианте с совместным использованием красных и синих светодиодов – на 13 %, а в варианте «красный + желтый + голубой + синий» – на 11 % по сравнению с освещением люминесцентной лампой. При использовании красного света

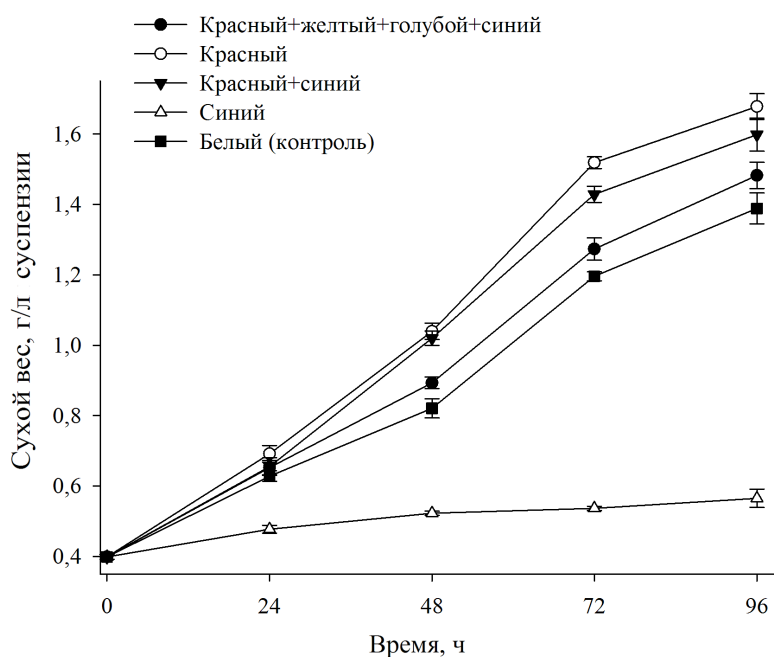


Рис. 2. Динамика накопления биомассы *S. platensis* при выращивании водоросли под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль),  $p \leq 0,05$

Fig. 2. Dynamics of *S. platensis* biomass accumulation during algal growth under LED illuminators and Philips fluorescent lamp (control),  $p \leq 0.05$

достигнутый нами уровень содержания белка составил 548,8 мг/г сухого веса (т. е. практически 55 % белка от сухого веса), что близко к значениям, получаемым при промышленном культивировании *S. platensis* в условиях естественного освещения [1]. В расчете на 1 л суспензии увеличение количества белка в вариантах со светодиодным освещением с преобладанием красной составляющей в спектре излучения было, соответственно, еще более высоким и достигло 47 % (вариант с красными светодиодами) относительно контроля. Расчет содержания ценных веществ на 1 л суспензии представляет интерес с точки зрения промышленного культивирования водорослей и показывает перспективность направленной модификации спектрального состава фотосинтетически активного света с целью получения суспензии *S. platensis* с высоким содержанием белка.

Таблица 3. Содержание белка и экспрессия гена *Nar* в клетках *S. platensis* при выращивании водоросли под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль) в течение 96 ч

Table 3. Protein content and *Nar* gene expression in *S. platensis* cells during algal growth under LED illuminators and a fluorescent Philips lamp (control) for 96 h

Показатель	Свет				
	Белый (контроль)	Красный	Синий	Красный + синий	Красный + желтый + голубой + синий
Белок, мг/г сухого веса	452,0 ± 22,2	548,8 ± 24,7*	423,2 ± 7,4*	512,5 ± 35,1*	500,1 ± 15,6*
Белок, мг/л суспензии	627,7 ± 30,8	920,8 ± 41,4*	239,1 ± 4,2*	819,1 ± 56,1*	741,3 ± 23,1*
Экспрессия гена <i>Nar</i> , отн. ед.	1,0	1,03 ± 0,06	1,14 ± 0,06*	1,10 ± 0,05*	1,01 ± 0,04

Для выяснения роли нитратредуктазы в увеличении содержания белка в клетках *S. platensis* и возможной регуляции синтеза фермента светом с модифицированным спектральным составом нами проанализирована экспрессия гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках водоросли. Так, осуществлен подбор праймеров, специфичных к гену *Nar* и гену-нормализатору *16SrRNA*, оптимизирован протокол ПЦР-анализа для указанных праймеров и проведен ПЦР-анализ уровня экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis*, выращенной при разных комбинациях светодиодов. Полученные средние уровни экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis*, выращенной в условиях светодиодного освещения с разным спектральным составом, представлены в табл. 2. За 1,0 принят уровень экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis*, выращенной под белым светом (контроль).

Выявлена тенденция к увеличению экспрессии гена *Nar* во всех опытных вариантах по отношению к контролю. Наиболее высокий уровень экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis* зафиксирован в варианте с использованием только синего света в качестве фотосинтетически активного (на 14 % больше по сравнению с контролем), а также в варианте с использованием совместно красного и синего светодиодов (на 10 % больше контроля). Возможно, такая стимуляция экспрессии гена *Nar* синим светом связана с наличием в составе нитратредуктазы флавина, который активно поглощает свет в этой области спектра [19]. Отсутствие прямой корреляции между экспрессией гена *Nar* и накоплением белка при использовании только синего света, видимо, связано с существенным снижением фотосинтетической активности клеток *S. platensis* из-за отсутствия в спектральном составе освещения желтого и красного света, наиболее эффективно поглощаемого фикоцианином, что является лимитирующим фактором, ограничивающим накопление белка в клетках водоросли. Кроме того, следует отметить, что при использовании осветителя с красными светодиодами достоверного увеличения экспрессии гена *Nar* нами не зафиксировано, несмотря на то что этот вариант освещения позволил добиться максимального увеличения продуктивности и накопления белка в клетках *S. platensis*. Этот экспериментальный факт также указывает на определяющую роль фотосинтетической активности клеток *S. platensis* в увеличении продуктивности и синтеза белка.

**Заклученне.** Таким образом, показано, что светодиодное освещение с преобладанием красной составляющей в спектре излучения позволяет достичь на 9–29 % большей продуктивности водоросли по сравнению с освещением люминесцентной лампой. Использование одного синего света приводило к существенному уменьшению (на 83 %) продуктивности *S. platensis*, что, по-видимому, обусловлено отсутствием в спектральном составе осветителя желтой и красной составляющих, которые наиболее эффективно поглощаются фикоцианином. Выявлена положительная корреляция между возрастанием продуктивности водоросли и накоплением в ее клетках белка. Так, при использовании осветителя с красными светодиодами содержание белка увеличилось на 21 % в расчете на 1 г сухого веса и на 47 % в расчете на 1 л суспензии по отношению к контролю. Анализ экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *S. platensis*, не выявил прямой зависимости между накоплением белка и уровнем экспрессии гена *Nar* в наиболее перспективном (в плане выхода биомассы и белка) варианте с использованием красных светодиодов. Это указывает на определяющую роль фотосинтетической активности клеток *S. platensis* в увеличении продуктивности и синтеза белка. В целом полученные результаты показали перспективность направленной модификации спектрального состава фотосинтетически активного света с целью увеличения продукции белка клетками водорослей.

### Список использованных источников

1. Soni, R. A. *Spirulina* – from growth to nutritional product: a review / R. A. Soni, K. Sudhakar, R. S. Rana // Trends Food Sci. Technol. – 2017. – Vol. 69. – P. 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
2. Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis* / T. Zhou [et al.] // Bioresource Technol. – 2018. – Vol. 269. – P. 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.131>
3. Продуктивность спирулины при использовании источников света разного типа / С. С. Мельников [и др.] // Вест. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 3. – С. 41–45.
4. *Spirulina* nitrate-assimilating enzymes (NR, NiR, GS) have higher specific activities and are more stable than those of rice / A. Ali [et al.] // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2008. – Vol. 14, N 3. – P. 179–182. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0017-z>
5. Jha, P. Nitrate induction of nitrate reductase and its inhibition by nitrite and ammonium ions in *Spirulina plantensis* / P. Jha, A. Ali, N. Raghuram // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 163–167.
6. Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site / K. Fischer [et al.] // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17, N 4. – P. 1167–1179. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029694>
7. Применение светодиодных светильников для освещения теплиц: реальность и перспективы / И. Бахарев [и др.] // Современные технологии автоматизации. – 2010. – № 2. – С. 76–82.
8. Фотосинтез и продуктивность растений картофеля в условиях различного спектрального облучения / Ю. Ц. Мартиросян [и др.] // С.-х. биология. – 2013. – № 1. – С. 107–112.
9. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / Нац. акад. наук Беларусі, Ин-т биологии и клеточной инженерии; сост.: С. С. Мельников [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 101 с.
10. Пиневиц, В. В. Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта для высокоинтенсивного культивирования / В. В. Пиневиц, Н. Н. Верзилин, А. А. Михайлов // Физиол. раст. – 1970. – № 5. – С. 1037–1046.
11. 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. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)91261-3](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)91261-3)
12. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis* / B. Wang [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 9. – P. e106679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106679>
13. Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content / N. Parimi [et al.] // Front. Energy Res. – 2015. – Vol. 3. – Art. 30. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00030>
14. 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, N 1–2. – P. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
15. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск: Вышэйш. шк., 1973. – 320 с.
16. Fernández-Rojas, B. Nutraceutical properties of phycocyanin / B. Fernández-Rojas, J. Hernández-Juárez, J. Pedraza-Chaverri // J. Functional Foods. – 2014. – Vol. 11. – P. 375–392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
17. Влияние спектрального состава светодиодного излучения на структуру фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis* / Н. В. Козел [и др.] // Вест. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 2. – С. 44–48.
18. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine / Y. Chang [et al.] // Appl. Energy. – 2013. – Vol. 102. – P. 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.024>
19. Кузнецов, В. В. Физиология растений / В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. – 2-е изд. – М.: Высш. шк., 2006. – 742 с.

## References

1. Soni R. A., Sudhakar K., Rana R. S. *Spirulina* – from growth to nutritional product: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 2017, vol. 69, pp. 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
2. Zhou T., Wang J., Zheng H., Wu X., Wang Y., Liu M., Xiang S., Cao L., Ruan R., Liu Y. Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 2018, vol. 269, pp. 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.131>
3. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Samovich T. V., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Spirulina's* productivity when using different types of light sources. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2011, no. 3, pp. 41–45 (in Russian).
4. Ali A., Jha P., Sandhu K. S., Raghuram N. *Spirulina* nitrate-assimilating enzymes (NR, NiR, GS) have higher specific activities and are more stable than those of rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2008, vol. 14, no. 3, pp. 179–182. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0017-z>
5. Jha P., Ali A., Raghuram N. Nitrate induction of nitrate reductase and its inhibition by nitrite and ammonium ions in *Spirulina plantensis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2007, vol. 13, no. 2, pp. 163–167.
6. Fischer K., Barbier G. G., Hecht H.-J., Mendel R. R., Campbell W. H., Schwarz G. Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site. *Plant Cell*, 2005, vol. 17, no. 4, pp. 1167–1179. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029694>
7. Bakharev I., Prokof'ev A., Turkin A., Yakovlev A. The use of LED lamps for lighting greenhouses: reality and prospects. *Sovremennyye tekhnologii avtomatizatsii* [Modern automation technology], 2010, no. 2, pp. 76–82 (in Russian).
8. Martirosyan Yu. Ts., Polyakova M. N., Dilovarova T. A., Kosobryukhov A. A. Photosynthesis and productivity of potato plants under different spectral irradiation. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2013, no. 1, pp. 107–112 (in Russian).
9. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. (compl.). *Catalog of the genetic fund of economically useful algae species*, Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
10. Pinevich V. V., Verzilin N. N., Mikhailov A. A. The study of *Spirulina platensis* – a new facility for high-intensity cultivation. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 1970, no. 5, pp. 1037–1046 (in Russian).
11. 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. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)91261-3](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)91261-3)
12. Wang B., Zhang Z., Hu Q., Sommerfeld M., Lu Y., Han D. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 9, p. e106679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106679>
13. Parimi N., Singh M., Kastner J. R., Das K. C., Forsberg L. S., Azadi P. Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content. *Frontiers in Energy Research*, 2015, vol. 3, art. 30. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00030>
14. 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, no. 1–2, pp. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
15. Rokitskii P. F. *Biological statistics. 3rd ed.* Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 320 p. (in Russian).
16. Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J., Pedraza-Chaverri J. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 2014, vol. 11, pp. 375–392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
17. Kozel N. V., Domanskii V. P., Manankina E. E., Adamchik K. O., Dremuk I. A., Savina S. M. The influence of the spectral composition of LED radiation on the structure of the photosynthetic apparatus *Spirulina platensis*. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2015, no. 2, pp. 44–48 (in Russian).
18. Chang Y., Wu Z., Bian L., Feng D., Leung D. Y. C. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine. *Applied Energy*, 2013, vol. 102, pp. 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.024>
19. Kuznetsov V. V., Dmitrieva G. A. *Plant physiology. 2nd ed.* Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2006. 742 p. (in Russian).

## Информация об авторах

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Радюк Мечислав Степанович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: radmes@mail.ru

## Information about the authors

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Leading 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: kozel.mikalai@gmail.com

Mechislav S. Radyuk – 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: radmes@mail.ru

*Самович Татьяна Викторовна* – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: samovich77@gmail.com

*Дремук Ирина Александровна* – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinadremuk@yandex.by

*Габриелян Лилит Сергеевна* – канд. биол. наук, доцент. Ереванский государственный университет (ул. Алека Манукяна, 1, 0025, г. Ереван, Армения). E-mail: lgabrielyan@ysu.am

*Tatsiana V. Samovich* – 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: samovich77@gmail.com

*Irina A. Dremuk* – 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: irinadremuk@yandex.by

*Lilit S. Gabrielyan* – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Yerevan State University (1 Alex Manukyan St, Yerevan 0025, Armenia). E-mail: lgabrielyan@ysu.am

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 612.014.461.3:612.014.461.3]:616.155.194

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-190-197>

Поступила в редакцию 23.07.2018

Received 23.07.2018

**Е. В. Босякова, Э. П. Титовец**

*Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь*

### **КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АКВАПОРИН4-ЗАВИСИМОГО ПЕРЕНОСА ВОДЫ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР**

**Аннотация.** Выполнено компьютерное моделирование AQP4-зависимого переноса воды через гематоэнцефалический барьер. Изучено влияние на объемный перенос воды изменений удельной плотности AQP4 и его поляризации на обменной поверхности капилляра. Установлено, что в зависимости от характера распределения аквапорина в глиальных мембранах, охватывающих капилляр, наблюдается изменение величины и направления объемного потока переносимой воды. Полученные результаты могут быть использованы для объяснения патогенеза развития отека головного мозга, а также при разработке способов фармакологической коррекции различных видов нарушения церебрального водного обмена.

**Ключевые слова:** церебральный водный обмен, компьютерное моделирование, гематоэнцефалический барьер, аквапорин AQP4, фармакологическая коррекция

**Для цитирования:** Босякова, Е. В. Компьютерное моделирование аквапорин4-зависимого переноса воды через гематоэнцефалический барьер / Е. В. Босякова, Э. П. Титовец // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 190–197. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-190-197>

**K. V. Basiakova, E. P. Titovets**

*Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus*

### **COMPUTER SIMULATION OF AQUAPORIN4-DEPENDENT WATER TRANSFER ACROSS THE HEMATOENCEPHALIC BARRIER**

**Abstract.** A computational simulation of water transfer across the blood-brain barrier (BBB) has been carried out. In the developed model, AQP4 plays a kinetically limiting role in water transfer across the BBB. The effects of the AQP4 specific density changes and its polarized distribution have been studied in respect to the volumetric water transfer. It has been demonstrated that AQP4 density and polarization within the glial membranes enveloping the capillary can affect the volumetric flow and the sign of the water flux. The results might be used for elucidation of the pathogenic mechanism of cerebral edema and in development of the ways of pharmacological correction of the cerebral water metabolism disorders.

**Keywords:** cerebral water metabolism, computer simulation, hematoencephalic barrier; aquaporin AQP4, pharmacological correction

**For citation:** Basiakova K. V., Titovets E. P. Computer simulation of aquaporin4-dependent water transfer across the hematoencephalic barrier. *Vestsi Natsyonal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 190–197 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-190-197>

**Введение.** Среди многочисленных функций гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) регуляция водного обмена между системной кровью и жидкостями головного мозга является одной из важнейших. Интерстициальная и цереброспинальная жидкости головного мозга принимают участие в тканевом газообмене, доставке субстратов, выносе конечных продуктов метаболизма, обеспечении внесинаптической межклеточной коммуникации (объемной трансмиссии), поддержании ионного гомеостаза, переносе сигнальных молекул, тканевой терморегуляции. С движением интерстициальной и цереброспинальной жидкостей связана доставка лекарственных препаратов в различные отделы головного мозга, миграция клеток злокачественных опухолей, стволовых клеток, образование и выведение отложений  $\beta$ -амилоида [1, 2]. Возникновение и разрешение различных типов отека головного мозга зависит от величины и направления потоков воды, переносимых через ГЭБ. Согласно современным представлениям, в переносе воды через ГЭБ

и регуляции водного обмена головного мозга участвуют все капилляры паренхимы головного мозга [3].

Результаты многочисленных экспериментальных исследований показали, что конкретное молекулярное звено переноса воды в ГЭБ представлено водным каналом аквапорином-4 (AQP4). Последний является ортодоксальным аквапорином, который обеспечивает высокоспецифичный двусторонний трансмембранный перенос воды. Движение воды осуществляется под действием гидростатического или осмотического градиентов давления [4].

В наибольшем количестве AQP4 экспрессируется в головном и спинном мозге на специализированных мембранных доменах глиальных клеток, прежде всего на мембранах ножек астроцитов, контактирующих с кровеносными сосудами и относящихся к гистоструктурам ГЭБ. Капилляры мозга отличаются от капилляров других органов тем, что их эндотелиальные клетки образуют непрерывную стенку. Их наружные слои сливаются в местах контакта, образуя так называемые плотные контакты. Астроциты оказывают существенное влияние на формирование плотных контактов и определяют их свойства [5, 6]. Максимальная экспрессия AQP4 обнаружена в местах контакта астроцитов с эпителиоцитами. AQP4 занимает до 50 % площади поверхности мембраны ножек астроцитов, охватывающих капилляр [1, 7, 8].

В нервной системе AQP4 существует в виде двух основных изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга, – длинной изоформы M1-AQP4 и короткой изоформы M23-AQP4 [9]. Обе имеют сходную водопроницаемость, но обладают различными свойствами агрегации, которые определяют их локализацию и выполняемые функции.

Изоформа M1-AQP4 представлена в виде одиночных каналов, расположенных на мембране ножек астроцитов в свободном порядке, в то время как изоформа M23-AQP4 образует упорядоченные регулярные образования, получившие название «ортогональные структуры». Впервые они были обнаружены в 1970-х годах в мембранах клеток печени, париентальных клеток желудка и мембранах астроцитов головного мозга. Они образуются при совместной экспрессии M1-AQP4 и M23-AQP4 в одной и той же клетке и играют важную роль в регуляции водного обмена головного мозга [10, 11]. Диффузионная подвижность ортогональных массивов, содержащих как M1-AQP4, так и M23-AQP4, напрямую зависит от количества M1 и M23 и их соотношения. Наибольшая концентрация M1-AQP4 обнаруживается в передней кромке ламеллоподий астроцитов при их миграции и росте, в то время как изоформа M23-AQP4 распределяется более равномерно [12, 13]. Некоторые авторы предполагают, что разделение M1-AQP4 и M23-AQP4 может происходить в клетках, экспрессирующих обе изоформы в силу «диффузионной фильтрации», при которой относительно небольшие подвижные молекулы M1-AQP4 диффундируют с большей скоростью, нежели более крупные агрегаты изоформы M23-AQP4. Низкая диффузионная подвижность M23-AQP4 приводит к исключению его из передней кромки мембраны ножки астроцита, тогда как высокоподвижный M1-AQP4 может свободно проникать в расширяющиеся ламеллоподии. Действительно, M1-AQP4 свободно диффундирует со скоростью 15 мкм за 5 мин, в то время как короткая изоформа M23-AQP4 перемещается с гораздо меньшей скоростью – 0,6 мкм за 5 мин. Показано, что различные свойства M1-AQP4 и M23-AQP4 приводят к различиям в их клеточной локализации и выполняемых функциях. M1-AQP4 требуется при ламеллоподиальном растяжении, в то время как M23-AQP4 в основном участвует во взаимодействии с субстратом [12, 14].

Мембранная топография ортогональных структур определяется функциональным состоянием тканей. В исследовании ангиогенеза при опухолях мозга установлено, что AQP4 принимает активное участие в миграции астроцитов. Последняя также играет важную роль в образовании глиального рубца, формирование которого может быть как благоприятным фактором (например, ограничение острого воспалительного повреждения при черепно-мозговой травме), так и неблагоприятным (торможение регенерации нейронов и аксонального прорастания). Предполагается, что AQP4-облегченная миграция клеток заключается в усиленном движении воды в плазматической мембране в выступах ламеллоподий [15].

На поляризацию ортогональных структур влияет множество факторов. От плотности распределения этих структур на мембранах астроцитов зависят объемные скорости переноса воды. При этом ингибирование активности AQP4 снижает водный обмен на 70–80 % [16].

Объем воды, которую переносит AQP4, может быть изменен двумя путями – либо непосредственным влиянием на экспрессию аквапорина в определенных областях, либо ингибированием уже существующих каналов.

Экспрессия аквапоринов зависит от наличия сопутствующих структурных белков, гормональной, генетической, фармакологической регуляции и др. Генетическая регуляция экспрессии может быть не прямой, т. е. способной влиять на белки, коэкспрессирующиеся с AQP4 (например, на белок калиевого канала KIR4.1) [17].

В литературе описан целый ряд веществ, которые могут влиять на транспортную функцию AQP4. Например, он может угнетаться ртутными соединениями (в частности,  $\text{HgCl}_2$ ), а ионы  $\text{Zn}^{2+}$  могут быстро и обратимо ингибировать водную проницаемость AQP4 [18, 19].

Аквапорины по праву считаются молекулярными мишенями направленного воздействия фармакологических средств с терапевтической целью. AQP4 определяет инвазивность и способность опухолей мозга к миграции, поэтому он рассматривается как место терапевтических воздействий. Предполагается, что вещества, повышающие экспрессию AQP4, могут быть потенциальными лекарственными средствами в редукции патологических состояний головного мозга [20–22].

В литературе отсутствуют экспериментальные данные о влиянии неравномерного распределения AQP4 по поверхности капилляра на трансапиллярный водный обмен. Моделирование переноса воды через ГЭБ приобретает важное как фундаментальное, так и прикладное значение, поскольку позволяет подробно охарактеризовать физиологически значимые процессы и получить информацию, которую пока еще невозможно получить экспериментальными методами.

Цель данной работы – изучение методом компьютерного моделирования механизма транспорта воды через гематоэнцефалический барьер и роли AQP4 в водном обмене головного мозга.

**Материалы и методы исследования.** Математическое описание переноса воды через ГЭБ осуществляли с помощью основанного на принципах линейной неравновесной термодинамики Kedem–Katchalsky модифицированного уравнения, позволяющего вычислить величину потока воды  $J_v$  через ГЭБ [23, 24]:

$$J_v = L_p^{\text{AQP4}} S \left( p_a - \frac{p_a - p_v}{L} x - f(t) - \pi_c - \pi_{\text{ISF}} \right),$$

где  $L_p^{\text{AQP4}}$  – коэффициент гидравлической проводимости, ассоциированный с AQP4;  $S$  – площадь поверхности переноса,  $\text{cm}^2$ ;  $L$  – длина капилляра,  $\text{cm}$ ;  $p_a$  и  $p_v$  – гидростатическое давление на артериальном и венозном концах капилляра соответственно,  $\text{mm rt. st.}$ ;  $\pi_c$  и  $\pi_{\text{ISF}}$  – онкотическое давление плазмы крови и интерстициальной жидкости соответственно,  $\text{mm rt. st.}$ ;  $x$  – расстояние по длине капилляра, начиная от его артериального конца,  $\text{cm}$ . Площадь поверхности переноса  $S$  по умолчанию равна  $1 \text{ cm}^2$ . Функция  $f(t)$  описывает изменение во времени величины внутрикраниального гидростатического давления, т. е. форму пульсовой волны внутричерепного гидростатического давления [24].

Выбор значения  $L_p^{\text{AQP4}}$  имеет важное значение для моделирования и определения величины объемного потока воды через ГЭБ. В литературе проницаемость мембран к воде часто характеризуют в терминах осмотической проницаемости мембраны, обозначаемой  $P_f$ . Значение  $P_f$  зависит от значения проницаемости отдельного водного канала и варьируется от источника к источнику, как и значения проницаемости отдельных водных каналов. В литературе приводятся данные о том, что проницаемость отдельного канала может составлять  $5,43 \cdot 10^{-14}$  для AQP4,  $6 \cdot 10^{-14}$  для AQP1,  $(3,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-13}$  для AQP4-M1 [25, 26]. Между  $P_f$  и  $L_p^{\text{AQP4}}$  существует функциональная зависимость, что учитывалось нами при расчете коэффициента гидравлической проницаемости, связанного с активностью AQP4 [24].

Объем воды  $V_{\text{H}_2\text{O}}$ , перенесенный через ГЭБ за определенный период времени, находят с помощью уравнения

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = L_p^{\text{AQP4}} \int_{x_1}^{x_2} dx \int_{t_1}^{f(x)} F(x, t) dt.$$



Для программного описания модели и ее решения использовали программный комплекс Wolfram Mathematica 10, для построения двумерных графиков – программу MS Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Современное представление о месте аквапорина AQP4 в структуре ГЭБ дает рис. 1.

AQP4 располагается непосредственно на границе раздела системная кровь – интерстициальное пространство головного мозга, выполняя функцию специфического переноса воды через ГЭБ.

Картина распределения ортогональных полимерных структур AQP4, как и свободных аквапоринов, в мембране ножек астроцитов, охватывающих капилляр, характеризуется непостоянством. Топография распределения зависит от состояния нейрональной активности участков головного мозга, изменяется при патологии [15, 16]. Принимая во внимание, что основная функция AQP4 – это перенос воды через ГЭБ, встает вопрос, насколько существенно влияние полярного распределения этого аквапорина на водный обмен головного мозга. На сегодня этот вопрос решается лишь частично путем генетического нокаута животных по AQP4, а также с применением ингибиторов и активаторов активности этого аквапорина [7, 18, 19]. Однако, поскольку указанные экспериментальные подходы не позволяют ответить на вопрос о влиянии неравномерного распределения AQP4 на перенос воды через ГЭБ, он переходит в область компьютерного моделирования.

Моделирование транспорта воды через ГЭБ было выполнено в рамках осцилляторной нанофлюидной модели водного обмена головного мозга [24]. Задавались разные значения коэффициентов гидравлической проводимости  $L_p^{AQP4}$  как для всей поверхности капилляра (гомогенное распределение этого аквапорина), так и для артериального и венозного его участков (поляризация распределения AQP4). По своей физической сущности величина коэффициентов гидравлической проводимости линейно связана с удельной плотностью этого аквапорина в мембране ножек астроцитов. Поэтому уменьшение или увеличение коэффициентов гидравлической проводимости эквивалентно уменьшению или увеличению удельной плотности AQP4 в астроцитарной мембране.

Компьютерное моделирование переноса воды через ГЭБ позволяет представить процесс в виде трехмерных построений, показанных на рис. 2.

На рис. 2, где приведены результаты моделирования переноса воды через ГЭБ, отчетливо видны эффекты изменения поляризации содержания AQP4 в глиальной мембране. На рис. 2, *a* показан перенос воды при гомогенном распределении AQP4. Этот исходный график позволяет визуально оценить изменения водного обмена при разных условиях поляризации AQP4, показанных на рис. 2, *b, c*. При снижении удельной плотности AQP4 на артериальном отрезке капилляра (рис. 2, *b*), т. е. при снижении коэффициента гидравлической проводимости, и при постоянном значении AQP4 на венозном отрезке поток фильтрации снижается. Аналогичные данные представлены на рис. 2, различия заключаются лишь в том, что при уменьшении удельной плотности AQP4 объемная скорость реабсорбции воды на венозном отрезке капилляра падает.

Результаты моделирования показывают, что при гомогенном распределении AQP4 объемный поток воды, переносимый через ГЭБ за время одного сердечного цикла, линейно зависит от удельной плотности аквапорина. Он всегда направлен в паренхиму головного мозга, возрастает при увеличении значения  $L_p^{AQP4}$  и падает при уменьшении этого коэффициента, что полностью соответствует данным экспериментальных наблюдений.

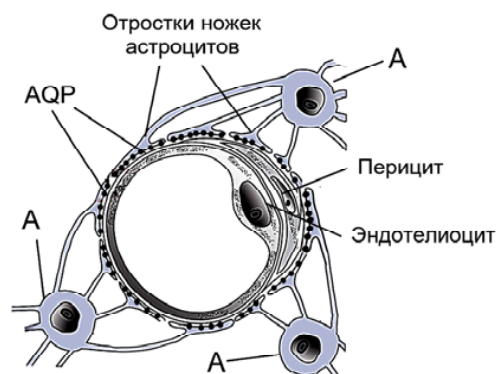


Рис. 1. Схематическое изображение сечения капилляра головного мозга с отростками ножек астроцитов и расположенными в них AQP4. А – астроцит, AQP – аквапорин-4 (черные точки)

Fig. 1. A schematic representation of a section of the capillary of the brain with processes of astrocyte legs and AQP4 located in them. A – astrocyte, AQP – aquaporin-4 (black dots)

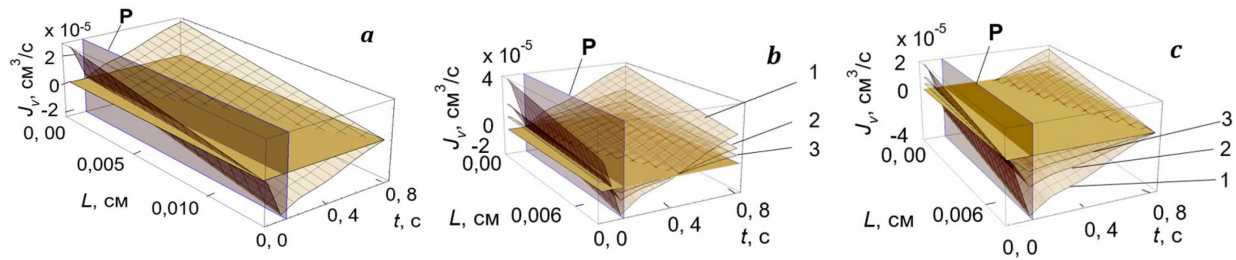


Рис. 2. 3D-графики моделирования обменного движения воды через ГЭБ (*a* – график водного обмена при равномерном распределении AQP4 по всей длине капилляра,  $L_p = 8,05 \cdot 10^{-6}$  см/с/мм рт. ст.; *b* – обмен воды на артериальном участке капилляра ( $0,0 \leq x \leq 0,0073$  см); *c* – обмен воды на венозном участке капилляра ( $0,0073 \leq x \leq 0,0146$  см); цифрами 1, 2, 3 обозначены 3D-графики водного обмена между капилляром и интерстициальным пространством головного мозга при значениях  $L_p^{AQP4}$ , равных  $8,05 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4,02 \cdot 10^{-6}$  (2) и  $2,01 \cdot 10^{-6}$  см/с/мм рт. ст. (3) соответственно; *P* – плоскость, разделяющая систолическую и диастолическую части сердечного цикла). Общие параметры модели:  $L = 0,0146$  см;  $P_a = 28,9$  мм рт. ст.;  $P_v = 22,8$  мм рт. ст.;  $\pi_c = 22$  мм рт. ст.;  $\pi_{ISF} = 1,0$  мм рт. ст. Продолжительность полного сердечного цикла – 0,83 с, продолжительность систолы – 0,12 с. Аппроксимированное выражение для волны пульсового внутречерепного давления ( $f(t)$ ) с пиком 8 мм рт. ст., как и расчетные значения  $L_p^{AQP4}$ , взяты из нашей работы [24]

Fig. 2. 3D-graphics modeling of the exchange movement of water through the BBB (*a* – is a graph of water exchange with a uniform distribution of AQP4 along the entire length of the capillary,  $L_p = 8.05 \cdot 10^{-6}$  cm/s/mm Hg. v.; *b* – water exchange in the arterial part of the capillary ( $0.0 \leq x \leq 0.0073$  cm); *c* – water exchange in the venous area of the capillary ( $0.0073 \leq x \leq 0.0146$  cm); figures 1, 2, 3 denote 3D-graphs of water exchange between the capillary and interstitial space of the brain with values of  $L_p^{AQP4}$   $8.05 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4.02 \cdot 10^{-6}$  (2) and  $2.01 \cdot 10^{-6}$  cm/s/mm Hg Art (3) respectively; *P* – the plane separating the systolic and diastolic parts of the cardiac cycle). General parameters of the model:  $L = 0.0146$  cm;  $P_a = 28.9$  mm Hg. v.;  $P_v = 22.8$  mm Hg v.;  $\pi_c = 22$  mm Hg v.;  $\pi_{ISF} = 1.0$  mm Hg Art. The duration of the complete cardiac cycle is 0.83 s, the duration of systole is 0.12 s. Approximate expression for the pulse intracranial pressure wave ( $f(t)$ ) with a peak of 8 mm Hg. Art., as well as calculated values of  $L_p^{AQP4}$ , are taken from our work [24]

Величины объемов воды, полученные в результате численного интегрирования потоков жидкости на заданных участках капилляра за период времени, равный одному полному сердечному циклу, а также для систолы и диастолы, показаны на рис. 3, 4.

Гистограмма, представленная на рис. 3, демонстрирует линейную зависимость между величиной коэффициента и величиной объемного потока воды при гомогенном распределении AQP4.

Выполнено моделирование нескольких вариантов неравномерного распределения AQP4 вдоль поверхности капилляра (рис. 4). В первом случае определяли величину потоков при постоянном  $L_p^{AQP4}$  на артериальном участке капилляра (рис. 4, *a*). На венозном участке значение  $L_p^{AQP4}$  было снижено в 2 и 4 раза соответственно (рис. 4, *a* (2–3)). Во втором и третьем случаях (рис. 4, *b, c*) показаны величины потоков в сочетаниях, при которых значения  $L_p^{AQP4}$  на венозном участке превышали таковые в артериальной области (рис. 4, *b* (2), *c* (2, 3)).

Как показывают результаты моделирования, общие закономерности при неравномерном распределении AQP4 в астроцитарной мембране сводятся к тому, что увеличение удельной плотности AQP4 на артериальном конце капилляра сопровождается повышением интенсивности фильтрации воды, т. е. объемного потока, направленного в головной мозг. Повышение удельной плотности этого аквапорина в венозной области капилляра приводит к обращению потока воды, ее

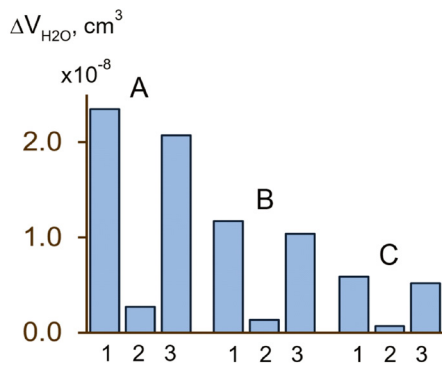
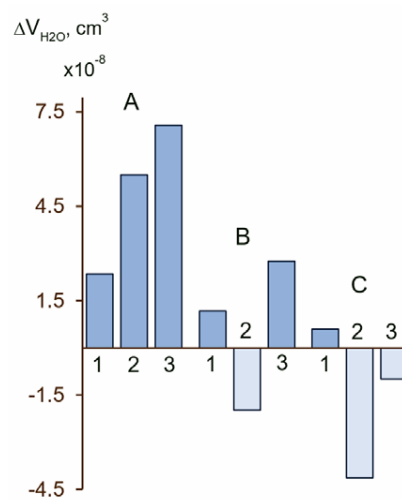


Рис. 3. Зависимость объемного потока жидкости от величины коэффициентов гидравлической проводимости  $L_p^{AQP4}$  при гомогенном распределении AQP4 по всей длине капилляра (*a, b, c* – величина потока  $L_p^{AQP4}$  при значениях, равных  $8,05 \cdot 10^{-6}$ ,  $4,02 \cdot 10^{-6}$  и  $2,01 \cdot 10^{-6}$  см/с/мм рт. ст. соответственно; 1 – общий поток на протяжении полного сердечного цикла; 2 – величина потока, систола; 3 – величина потока, диастола)

Fig. 3. Dependence of the volume flow of a liquid on the magnitude of the coefficients of hydraulic conductivity  $L_p^{AQP4}$  with homogeneous distribution of AQP4 along the entire length of the capillary (*a, b, c* – flow rate  $L_p^{AQP4}$  at values of  $8.05 \cdot 10^{-6}$ ,  $4.02 \cdot 10^{-6}$ , and  $2.01 \cdot 10^{-6}$  cm/s/mm Hg. Art respectively; 1 – total flow throughout the full cardiac cycle; 2 – magnitude of flow, systole; 3 – the amount of flow, diastole)

Рис. 4. Зависимость объемного потока жидкости от величины коэффициентов гидравлической проводимости  $L_p^{AQP4}$  при неравномерном распределении AQP4 на артериальном и венозном участках капилляра:  $a, b, c$  – величина потока на артериальном участке при значениях  $L_p^{AQP4}$ , равных  $8,05 \cdot 10^{-6}$ ,  $4,02 \cdot 10^{-6}$  и  $2,01 \cdot 10^{-6}$  см/с/мм рт. ст. соответственно; 1, 2, 3 – потоки при различных вариантах неравномерного распределения AQP4 на артериальном и венозном участках

Fig. 4. Dependence of the volume flow of fluid on the magnitude of the hydraulic conductivity coefficients  $L_p^{AQP4}$  in case of uneven distribution of AQP4 in the arterial and venous parts of the capillary:  $a, b, c$  is the amount of flow in the arterial area with values  $L_p^{AQP4}$  equal to  $8.05 \cdot 10^{-6}$ ,  $4.02 \cdot 10^{-6}$ , and  $2.01 \cdot 10^{-6}$  cm/s/mm Hg Art respectively; 1, 2, 3 – flows in different variants of uneven distribution of AQP4 in the arterial and venous areas



резорбции. Таким образом, поляризация распределения AQP4 существенно влияет на перенос воды через ГЭБ. При этом поток может изменяться как по величине, так и по направлению.

Фармакологическое воздействие на активность AQP4 рассматривается в настоящее время как способ коррекции нарушений водного обмена головного мозга, борьбы с церебральными отеками и рядом других патологий центральной нервной системы [2, 27, 28].

**Заключение.** Результаты, полученные в настоящей работе, указывают на то, что для успешной реализации данного терапевтического направления необходимо располагать более подробной информацией о топографии распределения AQP4 на протяжении капилляра головного мозга. Это же относится и к топографии AQP4 в капиллярах разных отделов центральной нервной системы. В настоящее время пришло осознание необходимости сопоставления данных по поляризации распределения AQP4 с физиологической функцией тканей головного мозга. Равным образом это относится и к патологиям центральной нервной системы. Следует отметить, что выводы, сделанные при моделировании влияния поляризации распределения AQP4 на обмен воды через ГЭБ, опережают данные экспериментальных исследований. Это позволяет предсказать эффекты поляризации аквапорина на глиальной мембране и тем самым способствовать выяснению механизма обмена воды в тканях головного мозга.

### Список использованных источников

1. The brain interstitial system: Anatomy, modeling, in vivo measurement, and applications // Y. Lei [et al.] // *Prog. Neurobiol.* – 2017. – Vol. 157. – P. 230–246. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.007>
2. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease / M. J. Simon, J. J. Iliff // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Basis of Disease.* – 2016. – Vol. 1862, N 3. – P. 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014>
3. Orešković, D. A new look at cerebrospinal fluid movement / D. Orešković, M. Klarica // *Fluids and Barriers of the CNS.* – 2014. – Vol. 11, N 1. – Art. 16. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-16>
4. Титовец, Э. П. Аквапорины человека и животных : фундаментальные и клинические аспекты / Э. П. Титовец. – Минск : Белорус. наука, 2007. – 238 с.
5. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a ‘glymphatic’ system? / N. J. Abbott [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2018. – Vol. 135, N 3. – P. 387–407. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4>
6. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N. J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 7, N 1. – P. 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
7. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet / N. N. Haj-Yasein [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 108, N 43. – P. 17815–17820. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110655108>
8. Verkman, A. S. Aquaporins in clinical medicine / A. S. Verkman // *Ann. Rev. Med.* – 2012. – Vol. 63, N 1. – P. 303–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043010-193843>
9. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance / J. S. Jung [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91, N 26. – P. 13052–13056. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.13052>
10. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels / J. D. Neely [et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, N 34. – P. 11156–11163. <https://doi.org/10.1021/bi990941s>

11. Dermietzel, R. Visualization by freeze-fracturing of regular structures in glial cell membranes / R. Dermietzel // *Naturwissenschaften*. – 1973. – Vol. 60, N 4. – P. 208. <https://doi.org/10.1007/bf00599446>
12. Aggregation state determines the localization and function of M1- and M23-aquaporin-4 in astrocytes / A. J. Smith [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 204, N 4. – P. 559–573. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308118>
13. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation / S. Saadoun [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118, N 24. – P. 5691–5698. <https://doi.org/10.1242/jcs.02680>
14. Aquaporin-4 dynamics in orthogonal arrays in live cells visualized by quantum dot single particle tracking / J. M. Crane [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – Vol. 19, N 8. – P. 3369–3378. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0322>
15. Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica / A. S. Verkman [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2011. – Vol. 32, N 6. – P. 702–710. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.27>
16. Nagelhus, E. A. Physiological roles of aquaporin-4 in brain / E. A. Nagelhus, O. P. Ottersen // *Physiol. Rev.* – 2013. – Vol. 93, N 4. – P. 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
17. Nagelhus, E. A. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1 / E. A. Nagelhus, T. M. Mathiisen, O. P. Ottersen // *Neuroscience*. – 2004. – Vol. 129, N 4. – P. 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.053>
18. Rapid and reversible inhibition of aquaporin-4 by zinc / Y. Yukutake [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48, N 4. – P. 12059–12061. <https://doi.org/10.1021/bi901762y>
19. Savage, D. F. Structural basis of aquaporin inhibition by mercury / D. F. Savage, R. M. Stroud // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 368, N 3. – P. 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.070>
20. Role of aquaporin-4 in the regulation of migration and invasion of human glioma cells / T. Ding [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2011. – Vol. 38, N 6. – P. 1521–1531. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.983>
21. Wang, D. Expression of AQP1 and AQP4 in paediatric brain tumours / D. Wang, B. K. Oowler // *J. Clin. Neurosci.* – 2011. – Vol. 18, N 1. – P. 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.07.115>
22. Aquaporin-4 upregulated expression in glioma tissue is a reaction to glioma-associated edema induced by vascular endothelial growth factor / L. Yang [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2012. – Vol. 28, N 5. – P. 1633–1638. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1973>
23. Friedman, M. Principles and Models of Biological Transport / M. Friedman. – Berlin ; Heiderberg : Springer, 1986. – 260 p.
24. Titovets, E. Novel computational model of the brain water metabolism: introducing an interdisciplinary approach / E. Titovets // *J. Comp. Syst. Biol.* – 2018. – Vol. 2, N 1. – Art. 103.
25. Zhu, F. Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1 / F. Zhu, E. Tajkhorshid, K. Schulten // *Biophys. J.* – 2005. – Vol. 86, N 1. – P. 50–57. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74082-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74082-5)
26. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method / E. Solenov [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 286, N 2. – P. C426–C432. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2003>
27. Aquaporin-targeted therapeutics: state-of-the-field / L. Tradtrantip [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – Vol. 969. – P. 239–250. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_16)
28. The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders / A. S. Verkman [et al.] // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2017. – Vol. 21, N 12. – P. 1161–1170. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1398236>

## References

1. Lei Y., Han H., Yuan F., Javeed A., Zhao Y. The brain interstitial system: Anatomy, modeling, *in vivo* measurement, and applications. *Progress in Neurobiology*, 2017, vol. 157, pp. 230–246. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.007>
2. Simon M. J., Iliff J. J. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuro-inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 2016, vol. 1862, no. 3, pp. 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014>
3. Orešković D., Klarica M. A new look at cerebrospinal fluid movement. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2014, vol. 11, no. 1, art. 16. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-16>
4. Titovets E. P. *Aquaporins of man and animals: fundamental and clinical aspects*. Minsk, Belorusskaya Nauka Publ., 2007. 223 p. (in Russian).
5. Abbott N. J., Pizzo M. E., Preston J. E., Janigro D., Thorne R. G. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a ‘glymphatic’ system? *Acta Neuropathologica*, 2018, vol. 135, no. 3, pp. 387–407. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4>
6. Abbott N. J., Rönnbäck L., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, vol. 7, no. 1, pp. 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
7. Haj-Yasein N. N., Vindedal G. F., Eilert-Olsen M., Gundersen G. A., Skare O., Laake P. [et al.]. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, vol. 108, no. 43, pp. 17815–17820. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110655108>
8. Verkman A. S. Aquaporins in clinical medicine. *Annual Review of Medicine*, 2012, vol. 63, no. 1, pp. 303–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043010-193843>
9. Jung J. S., Bhat R. V., Preston G. M., Guggino W. B., Baraban J. M., Agre P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, vol. 91, no. 26, pp. 13052–13056. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.13052>

10. Neely J. D., Christensen B. M., Nielsen S., Agre P. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, no. 34, pp. 11156–11163. <https://doi.org/10.1021/bi990941s>
11. Dermietzel R. Visualization by freeze-fracturing of regular structures in glial cell membranes. *Naturwissenschaften*, 1973, vol. 60, no. 4, p. 208. <https://doi.org/10.1007/bf00599446>
12. Smith A. J., Jin B.-J., Ratelade J., Verkman A. S. Aggregation state determines the localization and function of M1- and M23-aquaporin-4 in astrocytes. *Journal of Cell Biology*, 2014, vol. 204, no. 4, pp. 559–573. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308118>
13. Saadoun S., Papadopoulos M. C., Watanabe H., Yan D., Manley G. T., Verkman A. S. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *Journal of Cell Science*, 2005, vol. 118, iss. 24, pp. 5691–5698. <https://doi.org/10.1242/jcs.02680>
14. Crane J. M., van Hoek A. N., Skach W. R., Verkman A. S. Aquaporin-4 dynamics in orthogonal arrays in live cells visualized by quantum dot single particle tracking. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, vol. 19, no. 8, pp. 3369–3378. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0322>
15. Verkman A. S., Ratelade J., Rossi A., Zhang H., Tradtrantip L. Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2011, vol. 32, no. 6, pp. 702–710. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.27>
16. Nagelhus E. A., Ottersen O. P. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiological Reviews*, 2013, vol. 93, no. 4, pp. 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
17. Nagelhus E. A., Mathiesen T. M., Ottersen O. P. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, 2004, vol. 129, no. 4, pp. 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.053>
18. Yukutake Y., Hirano Y., Suematsu M., Yasui M. Rapid and reversible inhibition of aquaporin-4 by zinc. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 51, pp. 12059–12061. <https://doi.org/10.1021/bi901762y>
19. Savage D. F., Stroud R. M. Structural basis of aquaporin inhibition by mercury. *Journal of Molecular Biology*, 2007, vol. 368, no. 3, pp. 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.070>
20. Ding T., Ma Y., Li W., Liu X., Ying G., Fu L., Gu F. Role of aquaporin-4 in the regulation of migration and invasion of human glioma cells. *International Journal of Oncology*, 2011, vol. 38, no. 6, pp. 1521–1531. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.983>
21. Wang D., Owlser B. K. Expression of AQP1 and AQP4 in paediatric brain tumours. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.07.115>
22. Yang L., Wang X., Zhen S., Zhang S., Kang D., Lin Z. Aquaporin-4 upregulated expression in glioma tissue is a reaction to glioma-associated edema induced by vascular endothelial growth factor. *Oncology Reports*, 2012, vol. 28, no. 5, pp. 1633–1638. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1973>
23. Friedman M. *Principles and models of biological transport*. Berlin, Heiderberg, Springer, 1986. 260 p.
24. Titovets E. Novel computational model of the brain water metabolism: introducing an interdisciplinary approach. *Journal of Computational Systems Biology*, 2018, vol. 2, no. 1, art. 103.
25. Zhu F., Tajkhorshid E., Schulten K. Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1. *Biophysical Journal*, 2005, vol. 86, no. 1, pp. 50–57. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74082-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74082-5)
26. Solenov E., Solenov H., Manley G. T., Verkman A. S. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2004, vol. 286, no. 2, pp. C426–C432. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2003>
27. Tradtrantip L., Jin B. J., Yao X., Anderson M. O., Verkman A. S. Aquaporin-targeted therapeutics: state-of-the-field. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, vol. 969, pp. 239–250. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_16)
28. Verkman A. S., Smith A. J., Phuan P. W., Tradtrantip L., Anderson M. O. The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2017, vol. 21, no. 12, pp. 1161–1170. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1398236>

### Информация об авторах

Босякова Екатерина Владимировна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [basiakova.k.v@gmail.com](mailto:basiakova.k.v@gmail.com)

Титовец Эрнст Петрович – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [eptitovets@gmail.com](mailto:eptitovets@gmail.com)

### Information about the authors

Katerina V. Basiakova – Researcher. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [basiakova.k.v@gmail.com](mailto:basiakova.k.v@gmail.com)

Ernst P. Titovets – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief researcher. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [eptitovets@gmail.com](mailto:eptitovets@gmail.com)

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 595.771:591.9(476)  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-198-201>

Поступила в редакцию 13.09.2018  
Received 13.09.2018

Д. С. Сусло<sup>1</sup>, А. В. Халин<sup>2</sup>, Т. В. Волкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь  
<sup>2</sup>Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация

### ***Aedes mercurator* Dyar, 1920 – НОВЫЙ ВИД КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ (DIPTERA: CULICIDAE) В ФАУНЕ БЕЛАРУСИ**

**Аннотация.** Обнаружен новый для фауны Беларуси вид – *Aedes mercurator* Dyar, 1920 (Diptera: Culicidae). Личинки IV стадии собраны нами в 2018 г. на территории Березинского биосферного заповедника. Приводится морфологическая и экологическая характеристика данного вида.

**Ключевые слова:** *Aedes mercurator*, кровососущие комары, фауна, личинка, Березинский биосферный заповедник, Беларусь, Culicidae

**Для цитирования:** Сусло, Д. С. *Aedes mercurator* Dyar, 1920 – новый вид кровососущих комаров (Diptera: Culicidae) в фауне Беларуси / Д. С. Сусло, А. В. Халин, Т. В. Волкова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 198–201. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-198-201>

D. S. Suslo<sup>1</sup>, A. V. Khalin<sup>2</sup>, T. V. Volkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus  
<sup>2</sup>Zoological Institute of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

### ***Aedes mercurator* Dyar, 1920 AS A NEW SPECIES OF THE MOSQUITO (DIPTERA: CULICIDAE) IN FAUNA OF BELARUS**

**Abstract.** A new species of mosquitoes was recorded for the fauna of Belarus – *Aedes mercurator* Dyar, 1920 (Diptera: Culicidae). Fourth-stage larvae have been collected in 2018 on the territory of the Berezinsky Biosphere Reserve. Morphological and ecological characteristics of this species are given.

**Keywords:** *Aedes mercurator*, mosquito fauna, larvae, Berezinsky biosphere reserve, Belarus, Culicidae

**For citation:** Suslo D. S., Khalin A. V., Volkova T. V. *Aedes mercurator* Dyar, 1920 as a new species of the mosquito (Diptera: Culicidae) in fauna of Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 198–201 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-198-201>

**Введение.** Кровососущие комары (Diptera Linnaeus, 1758; Culicidae Meigen, 1818) – эпидемиологически значимый компонент гнуса. Самки большинства видов комаров являются активными кровососами, нападающими на человека и домашних животных, а некоторые виды известны как переносчики таких опасных заболеваний, как малярия, комариные лихорадки и энцефалиты.

Мировая фауна комаров семейства Culicidae насчитывает 3559 видов, распространенных во всех зоогеографических областях мира [1]. Фауна кровососущих комаров Беларуси включает 40 видов, принадлежащих к 5 родам (*Anopheles* Meigen, 1818 – 5 видов, *Culiseta* Felt, 1904 – 5, *Coquilletidia* Dyar, 1905 – 1, *Aedes* Meigen, 1818 – 25, *Culex* Linnaeus, 1758 – 4) [2].

Новый вид для фауны Беларуси – *Aedes mercurator* Dyar, 1920 – обнаружен нами в 2018 г. на территории Березинского биосферного заповедника (ББЗ). Данный заповедник относится к особо охраняемым природным территориям. Уникальность его природных ландшафтов создает неповторимую по своим природным характеристикам территорию, что и обуславливает интерес к проведению здесь эколого-фаунистических исследований.

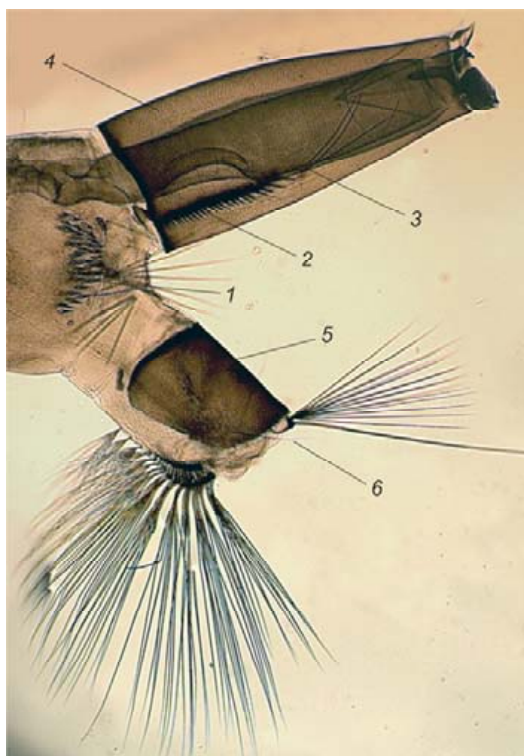
Цель работы – изучение фауны и экологии кровососущих комаров, обитающих на территории Березинского биосферного заповедника.

**Материалы и методы исследования.** Материал (3 личинки IV возраста) собран нами в ББЗ (Витебская область, Лепельский район, д. Домжерицы, 54°44'23" с. ш. и 28°20'14" в. д.) 10 и 22 мая 2018 г. Личинки отлавливали в естественном временном затененном водоеме, расположенном на территории ельника кисличного.

Отлов личинок производили стандартным водным сачком (форма сачка закругленно-коническая, диаметр – 20 см, глубина – 35 см, длина ручки – 1 м, материал – марля в два слоя). Полу погруженным сачком проводили вдоль поверхности воды на протяжении 2–3 м, затем сачок быстро поворачивали на 180°, погружая на глубину 10–15 см, и проводили обратно по линии первого отлова. Собранный материал определяли по стандартным ключам [3, 4], используя для подтверждения видовой идентификации фондовые коллекции Зоологического института РАН (Санкт-Петербург, Россия). Материал хранится в лаборатории паразитологии ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» (г. Минск).

**Результаты и их обсуждение.** Согласно литературным данным [3–5], ареал вида *Ae. mercurator* охватывает северо-восточную Евразию и северо-запад Северной Америки. В европейской части данный вид обнаружен в Республике Коми (Россия), в Крыму и на Кавказе, в азиатской части – в Сибири и на Дальнем Востоке России, а также в Монголии. В Северной Америке *Ae. mercurator* отмечен в северо-западной части Канады и США (в том числе на полуострове Аляска). Ближайшая к ББЗ находка *Ae. mercurator* – центральная часть Республики Коми [5] (расстояние более 1500 км на северо-восток от границы Беларуси).

**Замечания по диагностике.** По морфологическим признакам личинка *Ae. mercurator* схожа с личинками *Ae. cantans*, *Ae. annulipes* и *Ae. flavescens*. Данные виды различаются соотношением длины сифонального пучка и сифона, а также бокового волоска и седла (см. рисунок). У *Ae. mercurator* длина сифонального пучка у места его прикрепления равна ширине сифона



Брюшко личинки *Aedes mercurator* (8-й и 10-й сегменты, вид сбоку):

1 – чешуйки щетки; 2 – гребень сифона; 3 – пучок волосков на сифоне; 4 – сифон;  
5 – седло; 6 – волосок седла

Larval abdomen of *Aedes mercurator* (8th and 10th segments, lateral view):

1 – comb scales; 2 – pecten teeth; 3 – siphonal tuft; 4 – siphon; 5 – saddle; 6 – saddle seta

или чуть больше, боковой волосок короче седла. В то же время у *Ae. cantans* длина сифонального пучка меньше ширины сифона у места его прикрепления, а боковой волосок длиннее седла. У *Ae. annulipes* и *Ae. flavescens* боковой волосок равен длине седла, а пучок больше ширины сифона у первого вида и короче у второго. В качестве дополнительных диагностических признаков можно использовать число чешуек щетки и их расположение на VIII членике брюшка: щетка *Ae. mercurator* состоит из 30 чешуек, расположенных треугольником; щетка *Ae. cantans* и *Ae. annulipes* – из 33–36 чешуек, расположенных в 2–4 неправильных ряда; щетка *Ae. flavescens* – из 20–27 чешуек, расположенных в 3 ряда. Имеются различия в количестве и расположении зубцов гребня на сифоне: гребень *Ae. mercurator* состоит из 24 тесно сидящих зубцов. У *Ae. cantans* зубцов больше – 26–27, из которых рудиментарны 2–6 базальных. Гребень *Ae. annulipes* состоит из 21–23 тесно сидящих зубцов и 1–4 рудиментарных зубчиков у основания, у *Ae. flavescens* – из 19–22 зубцов, из которых 1–3 (наиболее дистальных) широко расставлены. По количеству пучков в плавнике (на общем основании и впереди него) различия менее четкие: плавник *Ae. mercurator* состоит из 15–20 пучков, объединенных общим основанием, и 2–6 спереди; плавник *Ae. cantans* – из 18–19 пучков на общем основании и 4 спереди, плавник *Ae. annulipes* – 16 пучков на общем основании и 4–5 спереди, плавник *Ae. flavescens* – из 18–19 пучков на общем основании и 6–7 спереди.

**Особенности образа жизни.** Личинки *Ae. mercurator* обнаружены в середине мая во временном затененном водоеме на территории ельника кисличного. Согласно литературным данным, личинки развиваются не только весной, но и летом, а вид может иметь до двух генераций в год (например, на севере Амурской области) [6]. Имаго встречается в сборах комаров, нападающих на человека, но нигде не достигает высокой численности [3]. Как активный кровосос, нападающий на человека и домашних животных, или как переносчик заболеваний *Ae. mercurator* не отмечен.

**Заключение.** *Ae. mercurator* впервые указан для фауны Беларуси. Морфологические признаки, детально исследованные в ходе работы, позволили достоверно определить собранный материал. Установлено, что в Европе вид распространен не только в Республике Коми и горных регионах Крыма и Кавказа, но и в Беларуси. Тем не менее, в настоящее время западную границу распространения *Ae. mercurator* вряд ли можно считать точно установленной, поскольку на участке между Республикой Коми и Беларусью, протяженность которого составляет более 1500 км, находок нет. Вместе с тем на данной территории отсутствуют какие-либо природные факторы, мешающие развитию личинок и имаго *Ae. mercurator*. Надо полагать, дальнейшие фаунистические исследования позволят уточнить распространение *Ae. mercurator*.

#### Список использованных источников

1. Mosquito Taxonomic Inventory [Electronic resource]. – Mode of access : <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>. – Date of access : 30.08.2018.
2. Волкова, Т. В. Кровососущие комары (Diptera, Culicidae) урбанизированных ландшафтов Беларуси / Т. В. Волкова // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2006. – № 2. – С. 12–17.
3. Гутевич, А. В. Новые виды комаров фауны Советского Союза / А. В. Гутевич, А. М. Дубицкий // Паразитолог. сб. / под ред. Ю. С. Балашова. – Ленинград, 1981. – Т. 30. – С. 97–165.
4. Mosquitoes and their control / N. Becker [et al.]. – 2nd ed. – Berlin ; Heidelberg : Springer-Verlag, 2010. – 577 p.
5. Панюкова, Е. В. Фауна европейского северо-востока России / под ред. А. А. Естафьева. – Т. 11, ч. 2 : Кровососущие комары (Diptera: Culicidae) / Е. В. Панюкова, Т. С. Остроушко. – М. : Т-во науч. изд. КМК, 2017. – 209 с.
6. Данилов, В. Н. О восстановлении названия *Aedes (O.) mercurator* Dyar для комара, известного в СССР как *Aedes riparius ater* Gutsevich (Diptera, Culicidae) / В. Н. Данилов // Паразитология. – 1974. – Т. 8, № 4. – С. 322–328.

#### References

1. Mosquito Taxonomic Inventory. Available at: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045> (accessed 30 August 2018).
2. Volkova T. V. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of the urbanized landscapes of Belarus. *Epizootologiya, immunobiologiya, farmakologiya, sanitariya = Epizootology, Immunobiology, Pharmacology, Sanitation*, 2006, no. 2, pp. 12–17 (in Russian).
3. Gutsevich A. V., Dubitskii A. M. New species of mosquitoes of the fauna of the Soviet Union. *Parazitologicheskii sbornik* [Parasitological collection]. Leningrad, 1981, vol. 30, pp. 97–165 (in Russian).



4. Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Madon M. B., Dahl C., Kaiser A. *Mosquitoes and their control*. 2nd ed. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag Publ., 2010. 577 p.

5. Panyukova E. V., Ostroushko T. S. *The fauna of the European northeast of Russia. Vol. 11, pt. 2. Bloodsucking Mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. Moscow, Tovarišchestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2017. 209 p. (in Russian).

6. Danilov V. N. On the restoration of the name *Aedes (O.) mercurator* Dyar for a mosquito known in the USSR as *Aedes riparius ater* Gutsevich (Diptera, Culicidae). *Parazitologiya* [Parasitology], 1974, vol. 8, no. 4, pp. 322–328 (in Russian).

### Информация об авторах

*Сусло Диана Сергеевна* – мл. науч. сотрудник, аспирант. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: s\_diana\_s@mail.ru

*Халин Алексей Владимирович* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Зоологический институт Российской академии наук (Университетская наб., 1, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация). E-mail: alexei.khalin@zin.ru

*Волкова Татьяна Валерьевна* – канд. биол. наук, заместитель генерального директора по научной работе. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tvolkova@tut.by

### Information about the authors

*Diana S. Suslo* – Junior researcher, Postgraduate student. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: s\_diana\_s@mail.ru

*Aleksei V. Khalin* – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Zoological Institute of Russian Academy of Sciences (1, Universitetskaya emb., St. Petersburg, Russian Federation). E-mail: alexei.khalin@zin.ru

*Tatiana V. Volkova* – Ph. D. (Biol.), Deputy Director General for Research. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tvolkova@tut.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 635.21:575.222.73:577.21:631.527.3:632.938.1

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-202-209>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

**А. В. Левый, А. С. Агеева**

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

## **ПОЛУЧЕНИЕ МУЖСКИ ФЕРТИЛЬНЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ КУЛЬТУРНОГО КАРТОФЕЛЯ С ЦЕННЫМ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ АЛЛОТЕТРАПЛОИДНЫМ ВИДОМ *SOLANUM STOLONIFERUM***

**Аннотация.** Дикий аллотетраплоидный вид картофеля *Solanum stoloniferum* редко используется в селекции из-за пре- и постзиготных репродуктивных барьеров. Одним из факторов, затрудняющих скрещивания между *S. stoloniferum* и *S. tuberosum*, является односторонняя несовместимость (англ. unilateral incompatibility, UI).

В статье представлены результаты использования оригинальных SvSv-линий для преодоления UI в скрещиваниях с *S. stoloniferum* и получения мужски фертильных гибридов с участием дикого вида. SvSv-линии представляют собой гибриды F2 между дигаплоидами *S. tuberosum* и *S. verrucosum*. Они мужски фертильны, а их цитоплазма относится к типу D/γ. Так как эти гибриды гомозиготны по Sv-гену от *S. verrucosum*, они не образуют пестичных S-RNКаз и благодаря этому их использование в скрещиваниях позволяет устранить презиготную несовместимость. В результате опыления семи SvSv-линий пылью 26 образцов *S. stoloniferum* получено большое количество семян, из которых, несмотря на низкий процент прорастания (1,9 %), сформировалось 40 сеянцев межвидовых гибридов. Эксперимент по гибридизации между SvSv-линиями и *S. stoloniferum* воспроизведен с использованием образца дикого вида PI205522, у которого ранее выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к PVY, фитофторозу, а также маркеры цитоплазмы «стерильного» типа W/γ: получено 950 гибридных семян и 12 жизнеспособных сеянцев. Геном сеянцев был удвоен при помощи колхицина, в результате чего образовались мужски фертильные гексаплоиды (F1), которые завязывали семена при самоопылении. Удвоенные гибриды удалось скрестить в качестве материнских растений с сортом Katahdin. Полученные из семян пентаплоидные гибриды (BC1) образовывали выполненные семена при опылении их пылью сорта Quarta. Отобранные по маркерам гибриды BC2 были вовлечены в гибридизацию с сортами картофеля как в качестве материнских форм, так и в качестве опылителей. Значительная доля гибридов F1, BC1 и BC2 была мужски фертильна (формировали функционально активную пыльцу).

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

**Для цитирования:** Левый, А. В. Получение мужски фертильных межвидовых гибридов культурного картофеля с ценным для селекции аллотетраплоидным видом *Solanum stoloniferum* / А. В. Левый, А. С. Агеева // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 202–209. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-202-209>

**A. V. Levy, A. S. Ageeva**

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

## **PRODUCTION OF MALE FERTILE INTERSPECIFIC HYBRIDES BETWEEN CULTIVATED POTATOES AND VALUABLE FOR BREEDING ALLOTTETRAPLOID SPECIES *SOLANUM STOLONIFERUM***

**Abstract.** The germplasm of valuable for breeding wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* is rarely used because of pre- and postzygotic reproductive barriers with cultivated potatoes. One of the factors that complicate crosses between *S. stoloniferum* and *S. tuberosum* is unilateral incompatibility (UI).

Here, we present the results of application of original SvSv-lines for overcoming UI in crosses with *S. stoloniferum* and of generating male fertile hybrids derived from this species. SvSv-lines are F2 *S. tuberosum* dihaploid × *S. verrucosum* and are male fertile and have D/γ-type cytoplasm. Since they are hybrids on homozygous for Sv gene from *S. verrucosum*, they do not form SvSv-lines and have the same ability for elimination of prezygotic incompatibility as this species. As a result of pollination seven SvSv-lines were pollinated by 26 accessions of *S. stoloniferum* and a lot of hybrid seeds have been produced. In spite of low percentage of germination (1.9 %), formed 40 seedlings of interspecific hybrids. The experiment on hybridization between SvSv-lines and *S. stoloniferum* has been reproduced with the accession PI205522 of the wild species, which had DNA markers of PVY and LB resistance genes and “sterile” type cytoplasm W/γ: 950 hybrid seeds and 12 viable seedlings were produced. The genome of the seedlings was doubled by colchicine treatment, which generated hexaploids (F1) that formed highly fertile pollen and set seeds from self-pollination. We were able to cross them as females with the variety Katahdin. Produced pentaploid hybrids (BC1) were readily backcrossed by potato variety Quarta. Seedlings of BC2 were then

backcrossed by potato varieties as female and, some of them, as male parents. The substantial part of F1, BC1 and BC2 plants of interspecific hybrids were male fertile (produced a lot functionally fertile pollen).

**Keywords:** potato, *SvSv*-lines, *Solanum stoloniferum*, hybridization, fertility, DNA markers, resistance genes, PVY (potato virus Y), late blight

**For citation:** Levy A. V., Ageeva A. S. Production of male fertile interspecific hybrids between cultivated potatoes and valuable for breeding allotetraploid species *Solanum stoloniferum*. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 202–209 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-202-209>

**Введение.** Дикий аллотетраплоидный вид картофеля *S. stoloniferum* является источником ряда ценных генов устойчивости к широкому кругу заболеваний и вредителей, а также к неблагоприятным абиотическим факторам среды [1–3]. Однако *S. stoloniferum* сравнительно редко используется в селекции, так как практически не скрещивается с культурным картофелем *S. tuberosum*. Одним из факторов, которые затрудняют гибридизацию с *S. stoloniferum*, является односторонняя несовместимость, при которой гибридные семена удается получить при использовании дикого вида в качестве материнской формы, а обратные скрещивания оказываются неудачными [4–6]. В результате в случае успешной интрогрессии ценных генов аллотетраплоидного вида в селекционный материал получают сорта картофеля, для которых характерна мужская стерильность, связанная с цитоплазмой дикого вида [2, 7, 8]. Это существенно ограничивает их использование в селекции. Следовательно, разработка методов преодоления односторонней несовместимости в скрещиваниях с *S. stoloniferum* имеет практическое значение, так как их использование позволит получать гибриды на цитоплазме культурного картофеля, обладающие мужской фертильностью.

В настоящей работе представлены результаты успешного использования созданных в лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси *SvSv*-линий для преодоления односторонней несовместимости в скрещиваниях с диким аллотетраплоидным видом картофеля *S. stoloniferum* и получения мужски фертильных межвидовых гибридов на основе *S. stoloniferum*. *SvSv*-линии представляют собой гибриды F2 между дигаплоидами *S. tuberosum* и самосовместимым диплоидным диким видом картофеля из Мексики *S. verrucosum*, у которых *St*-аллели культурного картофеля замещены на *Sv* от *S. verrucosum* [9]. Известно, что при опылении *S. verrucosum* собственной пыльцой, а также пыльцой других видов картофеля не наблюдается ингибирования роста пыльцевых трубок и большинство из них может достигать семязачек [10]. Это свойство *S. verrucosum*, обусловленное отсутствием пестичных *S*-РНКаз, является основой его использования в качестве вида-посредника для вовлечения в селекцию ценного генофонда диких видов картофеля, которые не скрещиваются с *S. tuberosum* [10–12]. Благодаря наличию *S*-генов в гомозиготном состоянии, привнесенных от *S. verrucosum*, *SvSv*-линии имеют те же возможности для устранения презиготной несовместимости при межвидовой гибридизации, что и дикий вид, однако их использование позволяет устранить нежелательные эффекты, связанные с его применением (цитоплазматическая мужская стерильность и односторонняя несовместимость, характерные для гибридов; пониженное клубнеобразование).

Цель работы – изучить использование оригинальных *SvSv*-линий для преодоления UI в скрещиваниях с *S. stoloniferum* и получить мужски фертильные гибриды с участием дикого вида.

Для достижения цели настоящего исследования решались следующие задачи: применить *SvSv*-линии в качестве материнских форм при гибридизации с диким аллотетраплоидным видом картофеля *S. stoloniferum*; оценить фертильность полученных межвидовых гибридов.

**Материалы и методы исследования.** В качестве исходного материала использовали 26 образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum*: PI 160224, PI 160225, PI 160226, PI 160372, PI 161152, PI 186544, PI 195164, PI 195167, PI 201849, PI 201855, PI 205510, PI 205522, PI 230477, PI 230490, PI 230557, PI 239411, PI 243458, PI 275252, PI 310964, PI 310980, PI 473534, PI 498287, PI 558462, PI 586948, PI 595472, PI 653763, семена которых получены из United States Potato Genebank NRSP 6. Растения этих образцов были опылителями в скрещиваниях 2013 г. с семью *SvSv*-линиями (*Sv*-1–*Sv*-7). Опыт по получению межвидовых гибридов между *SvSv*-линиями и *S. stoloniferum* был воспроизведен в 2015 г. с участием только одного образца дикого вида –

PI 205522, у которого нами выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к PVY ( $Ry_{sto}$ ,  $Ry-f_{sto}$ ,  $Ry_{adg}$ ), а также гена *Rpi-sto1* долговременной устойчивости к фитофторозу [13]. Пыльцой образца PI 205522 опыляли диплоидные линии *Sv-2*, *Sv-3*, *Sv-4*, *Sv-6*, *Sv-8*.

Для проведения гибридизации растения родительских форм выращивали при естественном освещении на участке, расположенном между двумя теплицами и оборудованном устройством для мелкокапельного полива. Семена проращивали в плошках с торфогрунтом в конце апреля – начале мая, предварительно замочив на 12 ч в водном растворе гиббереллина (GA 3) (100 мг/л). Рассаду с 5–6 настоящими листьями высаживали на участке 15–20 мая. Сеянцы выращивали в гребнях, расстояние между гребнями – 70 см, между растениями – 50 см. Условия окружающей среды были типичными для летнего периода в Беларуси. Для предотвращения самоопыления перед гибридизацией проводили кастрацию цветков материнских образцов (нераскрывшиеся бутоны), все неопыленные бутоны и раскрывшиеся неопыленные цветки в соцветии удаляли. Перед проведением гибридизации оценивали функциональную фертильность пыльцы (ФФП) путем определения частоты прорастания пыльцевых зерен за 2 ч при 25 °С на питательной среде [14]. Учитывали по 300 пыльцевых зерен с образца в нескольких полях зрения микроскопа ( $\times 600$ ).

У полученных семян межвидовых гибридов оценивали всхожесть, а у выращенных из семян сеянцев – жизнеспособность и ФФП. Для оценки их плоидности производили подсчет хромосом в материнских клетках пыльцы на стадиях метафаза I – ранняя, анафаза I и метафаза II – ранняя, анафаза II. Для подтверждения происхождения полученных гибридов *SvSv*-линии  $\times$  *S. stoloniferum* детектировали SCAR-маркер FLint2B469, который применяется в филогенетических исследованиях для детекции генома В аллотетраплоидных диких видов картофеля [15], а у гибридов *SvSv*-линии  $\times$  *S. stoloniferum* PI 205522 – маркер 517/1519 гена *Rpi-sto1* долговременной устойчивости к фитофторозу [16], характерный только для PI 205522. Олигонуклеотидные последовательности для идентификации маркеров синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск). ДНК выделяли из листьев сеянцев с использованием наборов DNA purification Kit производства фирмы Thermo Scientific в соответствии с рекомендациями производителя и некоторыми модификациями, позволяющими увеличить выход и качество тотальной ДНК картофеля [17]. Амплификацию ДНК осуществляли на автоматическом программируемом термоциклере фирмы PE Applied Biosystems.

У ряда триплоидных гибридов *SvSv*-линии  $\times$  *S. stoloniferum* PI 205522, несущих ДНК-маркеры дикого вида, осуществляли митотическое удвоение хромосом. Для этого замачивали выращиваемые *in vitro* растения в 0,025 %-ном водном растворе колхицина в течение 72 ч. По завершении обработки растения промывали дистиллированной стерилизованной водой и производили их черенкование. После 1–2 циклов размножения *in vitro* растения высаживали в грунт. Предполагаемые гексаплоиды отбирали путем подсчета количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Удвоенными считали растения со средним числом хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц, равным 22–28 (исходные 3х гибриды, а также их родительские формы 2х *SvSv*-линии и 4х *S. stoloniferum* PI 205522 имели 12–15 хлоропластов). Гексаплоиды включали в гибридизацию с высокофертильным сортом картофеля Katahdin, диплоидной линией – донором фертильности IGC 10/1.21, а также опыляли их смесью пыльцы сорта Katahdin и диплоидных линий *S. phureja* IvP 35 и IvP 48.

Пентаплоиды (первое поколение беккрасса BC1), полученные в результате опыления гексаплоидов *Sv-2*  $\times$  PI 205522 смесью пыльцы Katahdin и диплоидных линий *S. phureja* IvP35 и IvP 48, опыляли пыльцой сорта Quarta и диплоидной линией *S. phureja* IvP 48. У полученных растений BC2 определяли наличие ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY и фитофторозу, отобранные генотипы включали в гибридизацию в качестве материнских форм с фертильными сортами Свитанок Киевский и Уладар, а мужски фертильные гибриды – в качестве опылителей с сортом Янка. Оценивали ФФП гибридов F1 (гексаплоиды), BC1 (пентаплоиды) и BC2 (уровень плоидности близок к 4х).

Тип цитоплазмы у *SvSv*-линий и *S. stoloniferum* PI 205522 определяли по методике Hosaka, Sanetomo [18]. Установлено, что у использованных в работе *SvSv*-линий, которые происходят от дигаметоидного мексиканского сорта картофеля Nortena, цитоплазма имеет тип D/ $\gamma$ , а у образца *S. stoloniferum* PI 205522 – W/ $\gamma$ .

**Результаты и их обсуждение.** Гибридизация между SvSv-линиями и *S. stoloniferum*. Скрещивания 2013 г. с участием SvSv-линий Sv-3, Sv-5 и Sv-7 были неудачными. Несмотря на то что было получено 36 ягод от опыления 107 цветков, семена в ягодах не сформировались. С участием линии Sv-6 получено 111 семян от опыления PI 653763, из которых возшло 4. Применение трех остальных SvSv-линий оказалось более результативным: в общей сложности получено 1893 семян от опыления 120 цветков (15,8 семени/опыление) (табл. 1).

Таблица 1. Результаты скрещиваний SvSv-линий и образцов *S. stoloniferum*

Table 1. Results of crosses between SvSv-lines and *S. stoloniferum* accessions

Образец <i>S. stoloniferum</i>	SvSv-линия 1 (Sv-1)				SvSv-линия 2 (Sv-2)				SvSv-линия 4 (Sv-4)			
	К-во опылений	К-во семян	К-во семян/опыление	К-во сеянцев	К-во опылений	К-во семян	К-во семян/опыление	К-во сеянцев	К-во опылений	К-во семян	К-во семян/опыление	К-во сеянцев
PI 160372	4	122	30	12	3	120	40	0	–	–	–	–
PI 161152	3	34	11	1	5	0	–	–	–	–	–	–
PI 186544	3	0	–	–	3	0	–	–	5	0	–	–
PI 195167	2	0	–	–	–	–	–	–	2	0	–	–
PI 201849	4	215	53,8	1	5	56	11	0	4	18	4,2	0
PI 201855	5	138	27,6	0	–	–	–	–	3	0	–	–
PI 205522	–	–	–	–	5	0	–	–	–	–	–	–
PI 230490	4	197	49,3	4	5	0	–	–	–	–	–	–
PI 243458	3	74	24,6	0	4	0	–	–	4	33	8	12
PI 310964	–	–	–	–	3	0	–	–	3	0	–	–
PI 473534	–	–	–	–	5	0	–	–	–	–	–	–
PI 498287	2	50	25	2	5	257	51	0	–	–	–	–
PI 558462	5	125	25	1	–	–	–	–	–	–	–	–
PI 595472	2	15	7,5	0	5	139	27,8	0	4	22	5,4	2
PI 653763	4	0	–	–	6	278	46,3	1	–	–	–	–
Всего	41	970	23,7	21	54	850	15,7	1	25	73	2,9	14

Семена в основной массе были довольно крупные (по размеру такие же, как при гибридизации между разными SvSv-линиями), однако невыполненные. Всхожесть семян была низкой (в среднем по опыту 1,9 %), особенно у семян гибридов с участием Sv-2 (0,1 %). В общей сложности удалось получить 40 растений межвидовых гибридов.

*Оценка плоидности гибридов SvSv-линий с S. stoloniferum.* У 15 гибридов при изучении мейоза в материнских клетках пыльцы насчитывалось около 36 хромосом. На стадии тетрад у таких растений наблюдали образование микроклеток. На стадии тетрад микроклетки обнаружены еще у 10 гибридов, однако число хромосом в них подсчитать не удалось. Оценка жизнеспособности (окраска 4 %-ным раствором ацетокармина) и ФФП у 32 гибридов показала, что все они стерильны. Опыление полученных гибридов пыльцой высокофертильных диплоидных линий *S. tuberosum*, а также диплоидных линий *S. phureja* IvP35 и IvP48 (всего 191 опыление) оказалось неудачным: не завязалось ни одной ягоды. При анализе ДНК у 38 гибридов детектировали маркер FLint2B469 генома В. Все это указывает на триплоидную природу полученных межвидовых гибридов и происхождение их от *S. stoloniferum*.

*Гибридизация между SvSv-линиями и S. stoloniferum PI 205522.* Благодаря относительно большому объему скрещиваний (120 опылений) в 2015 г., в отличие от 2013 г., получено достаточно много семян гибридов с участием SvSv-линий и *S. stoloniferum* PI 205522 (950 шт.; скрещивания с этим образцом в 2013 г. были неудачными). Большинство семян имели характерные для подобных скрещиваний (см. выше) крупные размеры, невыполненность и низкую всхожесть: удалось получить лишь 12 растений (табл. 2). Из них в культуру *in vitro* введено 11 растений, 1 погибло. В результате анализа ДНК у всех этих растений отмечено наличие маркера 517/1519<sub>750</sub> гена *Rpi-stol* устойчивости к фитофторозу, что является подтверждением их гибридного происхождения.

Т а б л и ц а 2. Результаты гибридизации SvSv-линий и образца *S. stoloniferum* PI 205522T a b l e 2. Results of crosses between SvSv-lines and *S. stoloniferum* accession PI 205522

SvSv-линия	К-во опылений	К-во ягод	К-во семян	К-во семян на одну ягоду	К-во семян на одно опыление	Всхожесть семян*
Sv-2	50	7 (14,0 %)	358	51	7,2	2,5 % (9/358)
Sv-3	11	9 (81,8 %)	365	41	33,2	0 % (0/100)
Sv-4	33	2 (6,1 %)	30	15	0,9	3,3 % (1/30)
Sv-6	13	5 (38,5 %)	17	3	1,3	0 % (0/17)
Sv-8	13	13 (100 %)	180	14	13,8	4,7 % (2/43)
Всего	120	36 (30 %)	950	26,3	7,9	2,2 % (12/548)

\*В скобках указано число проросших семян и их общее количество.

Удвоение числа хромосом у триплоидных гибридов SvSv-линий с *S. stoloniferum* PI 205522, бек-кроссирование полиплоидов культурным картофелем. В результате митотического удвоения хромосом в 2016 г. получено три предположительно гексаплоидных растения гибридов Sv-2 × PI 205522 и 6 растений Sv-4 × PI 205522 (все они имели более 20 хлоропластов в замыкающих клетках устьиц). Гибриды на основе Sv-4 плохо цвели, причем цветки усыхали вскоре после раскрытия бутонов. Гибриды Sv-2 × PI 205522 отличались обильным продолжительным цветением, образовывали ФФП (16, 17 и 20 % соответственно), посредством самоопыления легко завязывали ягоды, содержащие многочисленные выполненные семена (всхожесть семян 93 %). Выделенные фертильные растения были вовлечены в гибридизацию с диплоидными и тетраплоидными опылителями (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Результаты гибридизации гексаплоидных гибридов Sv-2 × *S. stoloniferum* PI 205522 (материнские растения) и сорта KatahdinT a b l e 3. Results of crosses between hexaploid hybrids Sv-2 × *S. stoloniferum* PI 205522 (as a female parent) and Katahdin variety

Гексаплоидный гибрид Sv-2 × PI 205522	Katahdin			Katahdin (смесь пыльцы Katahdin, IvP35 и IvP48)		
	К-во опылений	К-во ягод	К-во семян**	К-во опылений	К-во ягод	К-во семян без эмбрионального пятна**
CDH.2	2	0	—	8	0	—
CDH.4	2	0	—	5	2	48
CDH.6	3	1	21	2	2	30
Всего	7	1	21 (19)	15	4	78 (62)

\*\* В скобках указано количество проросших семян.

Несмотря на небольшой объем скрещиваний, удалось получить около 100 семян в результате опыления гибридов высокофертильным сортом картофеля Katahdin. Наиболее эффективным оказался вариант скрещиваний с использованием смеси пыльцы Katahdin и диплоидных линий *S. phureja* IvP35 и IvP 48 (в ягодах обнаружили только семена без маркерного признака, т. е. полученные от опыления сортом Katahdin). Кроме того, отмечалось образование ягод и небольшого количества семян от опыления удвоенных гибридов диплоидной линией – донором фертильности. Колхицинированные растения Sv-2 × PI 205522, у которых среднее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц находилось в диапазоне 12–13 штук, были мужски стерильны (ФФП = 0) и не завязывали семян ни с диплоидными, ни с тетраплоидными тестерами.

В результате посева 99 семян, полученных ранее путем опыления гексаплоидных гибридов Sv-2 × PI 205522 смесью пыльцы сорта Katahdin и диплоидных линий *S. phureja* IvP35 и IvP 48, сформировался 81 сеянец (первое поколение беккрасса культурным картофелем BC1). Значения ФФП пентаплоидных гибридов находились в диапазоне 1–21 %.

При опылении растений BC1 пыльцой сорта Quarta завязывались ягоды, содержащие выполненные семена. Всего получено 3714 семян, в среднем эффективность гибридизации составила

24 семени на одно опыление. Из семян, образовавшихся на пентаплоидах IGC16/38.16 и IGC16/38.17 (выборки по 150 шт.), получено соответственно 89 (всхожесть 59,3 %) и 77 (всхожесть 51,3 %) сеянцев (гибридные популяции IGC17/170.n и IGC17/171.n второго поколения беккрасса BC2). Значения показателя функциональной фертильности пыльцы растений BC2, отобранных по наличию ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY и фитофторозу, варьировались в широком диапазоне (табл. 4). При этом наряду со стерильными (ФФП < 1 %) и низкофертильными (ФФП = 1–10 %) генотипами в обеих гибридных популяциях с достаточно высокой частотой были представлены фертильные и высокофертильные гибриды (5 из 14 у IGC17/170.n и 9 из 21 у IGC17/171.n). По опыту лаборатории генетики картофеля для достижения положительных результатов при гибридизации картофеля ФФП опылителя должна составлять более 10 %.

Таблица 4. Распределение растений межвидовых гибридов второго поколения беккрасса IGC17/170.n и IGC17/171.n по уровню функциональной фертильности пыльцы

Table 4. Distribution of BC2 plants of interspecific hybrids IGC17/170.n and IGC17/171.n on the level of pollen functional fertility

Гибрид BC2	Проанализировано сеянцев, шт.	ФФП, %				
		<1	1–10	11–20	21–30	>31
IGC17/170.n	14	1	8	2	2	1
IGC17/171.n	21	5	7	4	4	1

Отдельные генотипы BC2 были успешно использованы в качестве материнских растений при гибридизации с сортами картофеля Свитанок Киевский и Уладар, а в качестве опылителей – при гибридизации с сортом Янка.

**Заключение.** Таким образом, использование *SvSv*-линий в скрещиваниях с *S. stoloniferum* дает возможность получать межвидовые гибриды, используя дикий вид в качестве опылителя. Они эффективны по отношению к широкому кругу образцов *S. stoloniferum* и не требуют применения специальных приемов, повышающих эффективность межвидовой гибридизации. Тип цитоплазмы у полученных гибридов F1, BC1 и BC2 – D/γ. Благодаря этому они обладают мужской фертильностью, что расширяет перспективы их использования в селекции.

**Благодарности.** Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, гранты B16P-103 и B18M-091.

**Acknowledgements.** This study was supported by of the Belarusian Republican Foundation for Basic Research, grants B16R-103 and B18M-091.

#### Список использованных источников

- Ortiz, R. Potato breeding via ploidy manipulation / R. Ortiz // Plant Breeding Reviews / ed. : G. R. Askew, F. A. Bliss, M. Gilbert. – New York, 1998. – Vol. 16. – P. 15–86.
- Ross, H. Potato breeding – problems and perspectives / H. Ross / H. Ross. – Berlin ; Hamburg : V. P. Parey, 1986. – 132 p. – (Advances in Plant Breeding, Series N 13).
- Conservation, evaluation and use in breeding of potato genetic diversity at the N. I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR) / S. D. Kiru [et al.] // Potato production and innovative technologies : Proceedings Potato Russia International Conference, Moscow, August 21–22, 2007 / eds. : A. S. Haverkort, B. V. Anisimov. – Wageningen, 2007. – P. 353–363.
- Jackson, S. A. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums* / S. A. Jackson, R. E. Hanneman (Jr.) // Euphytica. – Vol. 109, N 1. – P. 51–67. <https://doi.org/10.1023/A:1003710817938>
- Hanneman, R. E. Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding / R. E. Hanneman (Jr.) // Potato Res. – 1999. – Vol. 42, N 2. – P. 283–312. <https://doi.org/10.1007/BF02357859>
- Hayes, R. J. Unilateral and bilateral hybridization barriers in inter-series crosses of 4x 2EBN *Solanum stoloniferum*, *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum* and 2x 2EBN *S. tuberosum* haploids and haploid-species hybrids / R. J. Hayes, I. I. Dinu, C. A. Thill // Sex. Plant Reprod. – Vol. 17, N 6. – P. 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00497-005-0244-1>
- Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production / A. Lössl [et al.] // Euphytica. – Vol. 116, N 3. – P. 221–230. <https://doi.org/10.1023/A:1004039320227>
- Song, Y-S. Development of STS markers for selection of extreme resistance ( $R_{y_{stb}}$ ) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars / Y.-S. Song, A. Schwarzfischer // Amer. J. Potato Res. – 2008. – Vol. 85, N 5. – P. 392–393. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9044-0>

9. Создание линий-посредников для преодоления межвидовой несовместимости у картофеля / Ю. В. Полюхович [и др.] // Вест. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2010. – № 2. – С. 51–58.
10. Hermsen, J. G. Th. Barriers to hybridization of *Solanum bulbocastanum* Dun. and *Solanum verrucosum* Schlecht. and structural hybridity in their F1 plants / J. G. Th. Hermsen, M. S. Ramanna // *Euphytica*. – Vol. 25, N 1. – P. 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00041523>
11. Jansky, S. H. The introgression of 2x 1 EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge / S. H. Jansky, A. J. Hamernik // *Genet. Resour. Crop Evol.* – Vol. 56, N 8. – P. 1107–1115. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9433-3>
12. SvSv-линии – эффективный инструмент для вовлечения в селекцию ценного генофонда 1 EBN диплоидных диких видов картофеля / А. П. Ермишин [и др.] // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2017. – Т. 21, № 1. – С. 42–50.
13. ДНК-маркеры генов устойчивости к фитофторозу и к Y-вирусу у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum* / А. В. Левый [и др.] // Вест. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 2. – С. 46–54.
14. Pallais, N. Research on the physiology of potato sexual seed production / N. Pallais, N. Fong, D. Berrios // *Proceedings of the Innovative Methods for Propagating Potatoes Report of the 28th CIP Planning Conference, December 10–14, Lima, 1984.* – Lima, 1984. – P. 149–168.
15. Соколова, Е. А. Молекулярные маркеры генов устойчивости и геномов-доноров устойчивости картофеля к фитофторозу : метод. указания / Е. А. Соколова, О. А. Факина, Э. Е. Хавкин ; ВНИИ СХБ Россельхозакадемии. – М., 2013. – 25 с.
16. Wang, M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species : Ph. D. thesis / M. Wang. – Wageningen, 2007. – 108 p.
17. Воронкова, Е. В. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schlttdl. и дигамплоидами *Solanum tuberosum* L. / Е. В. Воронкова, В. М. Лисовская, А. П. Ермишин // *Генетика*. – 2007. – Т. 43, № 8. – С. 1065–1073.
18. Hosaka, K. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections / K. Hosaka, R. Sanetomo // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – Vol. 125, N 6. – P. 1237–1251. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4>

## References

1. Ortiz R. Potato breeding via ploidy manipulation. *Plant Breeding Reviews*. Vol. 16. New York, 1998, pp. 15–86.
2. Ross H. *Potato breeding – problems and perspectives*. Berlin, Hamburg, V. P. Parey, 1986. 132 p.
3. Kiru S. D., Gavrilenko T. A., Kostina L. I., Rogozina E. V., Antonova O. Y., Truskinov E. V., Shvachko N. A., Krylova E. A., Smirnova A. B. Conservation, evaluation and use in breeding of potato genetic diversity at the N. I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). *Potato production and innovative technologies: Proceedings Potato Russia International Conference, Moscow, August 21–22, 2007*. Wageningen, 2007, pp. 353–363.
4. Jackson S. A., Hanneman R. E. (Jr.) Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing Solanums. *Euphytica*, 1999, vol. 109, no. 1, pp. 51–67. <https://doi.org/10.1023/A:1003710817938>
5. Hanneman R. E. Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. *Potato Research*, 1999, vol. 42, no. 2, pp. 283–312. <https://doi.org/10.1007/BF02357859>
6. Hayes R. J., Dinu I. I., Thill C. A. Unilateral and bilateral hybridization barriers in inter-series crosses of 4x 2EBN *Solanum stoloniferum*, *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum* and 2x 2EBN *S. tuberosum* haploids and haploid-species hybrids. *Sexual Plant Reproduction*, 2005, vol. 17, no. 6, pp. 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00497-005-0244-1>
7. Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica*, vol. 116, no. 3, pp. 221–230. <https://doi.org/10.1023/A:1004039320227>
8. Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance ( $R_{y_{sto}}$ ) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*, 2008, vol. 85, no. 5, pp. 392–393. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9044-0>
9. Polyukhovich Yu. V., Makhan'ko O. V., Savchuk A. V., Voronkova E. V., Ermishin A. P. Development of bridge lines for overcoming interspecific incompatibility in potatoes. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyala-gichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2010, no. 2, pp. 51–58 (in Russian).
10. Hermsen J. G. Th., Ramanna M. S. Barriers to hybridization of *Solanum bulbocastanum* Dun. and *Solanum verrucosum* Schlecht. and structural hybridity in their F1 plants. *Euphytica*, 1976, vol. 25, no. 1, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00041523>
11. Jansky S. H., Hamernik A. J. The introgression of 2x 1 EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2009, vol. 56, no. 8, pp. 1107–1115. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9433-3>
12. Ermishin A. P., Polyukhovich Yu. V., Voronkova E. V., Gukasyan O. N. SvSv-lines is an effective tool for involvement of valuable genepool of 1EBN diploid potato species into breeding. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2017, vol. 21, no. 1, pp. 42–50 (in Russian).
13. Levyi A. V., Voronkova E. V., Polyukhovich Yu. V., Ermishin A. P. DNA-markers of late blight and PVY-resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum*. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk*



Belarusi. *Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 2, pp. 46–54 (in Russian).

14. Pallais N., Fong N., Berrios D. Research on the physiology of potato sexual seed production. *Proceedings of the Innovative Methods for Propagating Potatoes Report of the 28th CIP Planning Conference, December 10–14, Lima, 1984*. Lima, 1984, pp. 149–168.

15. Sokolova E. A., Fadina O. V., Khavkin E. E. *Molecular markers of resistance genes and donor resistance genomes of potato to late blight: guidelines*. Moscow, 2013. 25 p. (in Russian).

16. Wang M. *Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing Solanum species*. Ph. D. thesis. Wageningen, 2007. 108 p.

17. Voronkova E. V., Lisovskaya V. M., Ermishin A. P. Diploid hybrids between allotetraploid wild potato species *Solanum acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schldtl. and dihaploids of *S. tuberosum* L]. *Genetika* [Genetics], 2007, vol. 43, no. 8, pp. 1065–1073 (in Russian).

18. Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, vol. 125, no. 6, pp. 1237–1251. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4>

### Информация об авторах

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

*Агеева Анастасия Сергеевна* – мл. науч. сотрудник.  
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).  
E-mail: nastya\_ageeva95@mail.ru

### Information about the authors

*Alexander V. Levy* – Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a30413@mail.ru

*Anastasiya S. Ageeva* – Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastya\_ageeva95@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 581.165:582.477.6:635.92

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-210-215>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

**А. Ф. Келько**

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

## **ОСОБЕННОСТИ РОСТА ПРИВИТЫХ РАСТЕНИЙ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА КИТАЙСКОГО ‘BLAAUW’ (*JUNIPERUS CHINENSIS* ‘BLAAUW’)**

**Аннотация.** Можжевельник китайский ‘Blaauw’ (*Juniperus chinensis* ‘Blaauw’) относится к растениям, которые трудно размножаются путем укоренения стеблевых черенков. Это послужило причиной проведения исследований с целью получения потомства данного культивара при помощи прививки. По результатам проведенных в 2012 г. опытов по прививке разными способами декоративной формы на двухлетние саженцы можжевельника виргинского ‘Grey Owl’ (*Juniperus virginiana* ‘Grey Owl’) черенкового происхождения приживаемость составила около 80 %, однако окончательные выводы об успешности трансплантации можно делать только на основании дальнейших многолетних наблюдений за привитыми растениями. Установлено, что растения можжевельника китайского ‘Blaauw’, привитые способом вприклад сердцевинной на камбий и сердцевинной на сердцевину, более жизнеспособны, чем растения, привитые способом в боковой зарез. За период наблюдений 2012–2018 гг. в последнем случае погибло 75 % привитых саженцев, а из прививок, выполненных вприклад, выпало лишь 38,5 %. Привитые саженцы характеризуются более мощным ростом по сравнению с саженцами черенкового происхождения. Годичный прирост первых в 2–2,5 раза больше, что объясняется влиянием подвоя. Место прививки со временем становится трудноразличимым, что свидетельствует о хорошей совместимости компонентов прививки и подходящем способе ее проведения. Таким образом, прививка вприклад является перспективным способом размножения трудноукореняемого можжевельника китайского ‘Blaauw’.

**Ключевые слова:** прививка, черенкование, хвойные растения, декоративные формы, культивары, *Juniperus chinensis*, *Juniperus virginiana*

**Для цитирования:** Келько, А. Ф. Особенности роста привитых растений можжевельника китайского ‘Blaauw’ (*Juniperus chinensis* ‘Blaauw’) / А. Ф. Келько // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 210–215. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-210-215>

**H. F. Kelko**

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

## **GROWTH FEATURES OF GRAFTED PLANTS OF *JUNIPERUS CHINENSIS* ‘BLAAUW’**

**Abstract.** *Juniperus chinensis* ‘Blaauw’ is difficult to propagate by rooting stem cuttings why the aim of the research was assessing the possibility of obtaining the progeny of this cultivar by grafting. Experiments conducted in 2012 on grafting with various methods of the cultivar on 2-year-old *Juniperus virginiana* ‘Grey Owl’ seedlings of rooted cuttings origin have made it possible to achieve a survival rate of about 80 %, however, the final conclusions on the success of transplantation can be made only on the basis of further long-term observations of grafted plants. It is shown that the plants of the *Juniperus chinensis* ‘Blaauw’, grafted by veneer side grafting, are more viable than the plants grafted by side grafting. During the observation period 2012–2018 years in the latter case, 75 % of the grafted seedlings died, and only 38.5 % of the veneer side grafted plants fell out. Grafted seedlings are characterized by more powerful growth in comparison with seedlings of rooted cuttings origin. The annual increment of the first is 2–2.5 times higher, which is explained by the influence of the stock. The site of grafting becomes difficult to discern over time, which indicates a good compatibility of grafted components and a suitable way of carrying it out. Thus, veneer side grafting is a promising way to multiply the hard-to-root *Juniperus chinensis* ‘Blaauw’.

**Keywords:** grafting, cutting, conifers, ornamental forms, cultivars, *Juniperus chinensis*, *Juniperus virginiana*

**For citation:** Kelko H. F. Growth features of grafted plants of *Juniperus chinensis* ‘Blaauw’. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 210–215 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-210-215>

**Введение.** Известно, что у декоративных форм видов как лиственных, так и хвойных древесных растений сохранение у потомства ценных признаков материнских экземпляров возможно только при вегетативном размножении, в частности при укоренении отводков, черенков либо при прививке. Последний способ используется для репродукции форм с низкой способностью черенков к укоренению в случаях, когда даже применение дополнительных технологических приемов, таких как обработка биологически активными веществами, обеспечение положительного вертикального температурного градиента и др., способствующих стимулированию процессов корнеобразования у черенков большинства других видов и форм, не позволяет достичь желаемого результата, а также в случаях, когда необходимо получить штамбовое растение [1, 2].

Среди хвойных растений прививкой успешно размножаются представители рода Сосна (*Pinus* L.), Ель (*Picea* A. Dietr.), Лиственница (*Larix* Mill.), Пихта (*Abies* Mill.), Псевдотсуга (*Pseudotsuga* Carr.). В литературе подробно описаны технологии их прививки, включая сроки ее проведения, особенности подготовки подвоя и привоя, способы прививки [3–6]. В то же время недостаточно освещенным остается вопрос по прививке декоративных форм различных видов семейства Кипарисовые (*Cupressaceae*), в том числе и культиваров рода Можжевельник (*Juniperus* L.). Технология прививки можжевельников разработана зарубежными исследователями еще в середине прошлого века [7–9], однако до настоящего времени она не апробирована в условиях Беларуси.

В 2012 г. на территории ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» нами были заложены первые опыты по прививке можжевельников на примере можжевельника китайского ‘Blaauw’, перспективного для выращивания на территории республики, но трудно размножаемого черенкованием. Ранее нами установлено, что укореняемость черенков данного культивара при использовании различных стимулирующих корнеобразование приемов не превышает 35 %. В то же время приживаемость прививок, проведенных различными способами (в боковой зарез, сердцевинной на камбий, сердцевинной на сердцевину), составила около 80 %, а их средний прирост к окончанию вегетации – 0,9–1,2 см [10]. Это позволило предположить, что размножение можжевельника китайского ‘Blaauw’ прививкой более перспективно, чем укоренение черенков. Однако окончательный вывод об успешности прививки можно делать только на основании наблюдений за дальнейшим ростом и развитием привитых растений, что и обусловило цель наших дальнейших исследований, результаты которых представлены в настоящей работе.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования являлись одновозрастные растения можжевельника китайского ‘Blaauw’ (*Juniperus chinensis* ‘Blaauw’), полученные путем прививки и укоренения черенков и выращиваемые в контейнерах в субстрате из смеси верхового торфа (рН 3,5–4,5) и листовой земли в соотношении 1:1 по объему в сходных условиях увлажнения, питания и освещения.

Привитые растения были получены путем ранневесенней прививки в условиях отапливаемой теплицы свежезаготовленных черенков можжевельника китайского ‘Blaauw’, находящихся в состоянии вынужденного покоя, на двухлетние саженцы можжевельника виргинского ‘Grey Owl’ (*Juniperus virginiana* ‘Grey Owl’) черенкового происхождения в контейнерах. Подвой был внесен в теплицу в середине марта. Прививка проводилась через 10 дней (когда у подвоя отмечалось начало роста побегов) тремя способами – в боковой зарез, сердцевинной на камбий и сердцевинной на сердцевину. Через 3,5 мес. после проведения прививки подвой выше места прививки был полностью срезан, а растения вынесены из теплицы в открытый грунт. Растения можжевельника китайского ‘Blaauw’ черенкового происхождения были получены путем укоренения стеблевых черенков, представляющих собой боковые побеги с «пяткой», в смеси верхового торфа и крупнозернистого песка в соотношении 1:1 по объему в условиях прерывистого искусственного тумана. Укорененные черенки пересаживали с гряд в контейнеры весной через год после черенкования и размещали в открытом грунте. Уход за растениями заключался в поливе, удалении сорной растительности, пересадке в более крупные контейнеры.

Наблюдения за саженцами включали определение сохранности привитых растений после зимнего периода и ежегодного прироста саженцев различного происхождения.

**Результаты и их обсуждение.** В первую после прививки зиму погибло 50 % растений, привитых способом в боковой зарез, 37,5 % – способом вприклад сердцевинной на сердцевину и 33 % растений, полученных путем прививки вприклад сердцевинной на камбий. У выживших саженцев в течение вегетативного периода 2013 г. средний прирост составил 6,6–8,0 см.

Ко второй после проведения прививки весне погибла еще 50 % от выживших растений, привитых способом в боковой зарез, что в итоге, с учетом результатов за предыдущий год, составило 75 % от первоначального количества прижившихся прививок. Таким образом, прививка можжевельника китайского ‘Blaauw’ на двухлетние саженцы можжевельника виргинского ‘Grey Owl’ способом в боковой зарез оказалась неперспективной. Растения, привитые способом вприклад сердцевинной на сердцевину и сердцевинной на камбий, проявили высокую жизнеспособность. В последующие годы (2013–2018 гг.) выпало еще несколько прививок. В итоге количество погибших растений, полученных двумя данными способами прививки, за 6 лет составило 38,5 %.

Результаты сравнительных наблюдений за ростом саженцев можжевельника китайского ‘Blaauw’ черенкового происхождения и саженцев, полученных путем прививки, в течение нескольких лет представлены в таблице.

#### Прирост саженцев можжевельника китайского ‘Blaauw’ различного происхождения

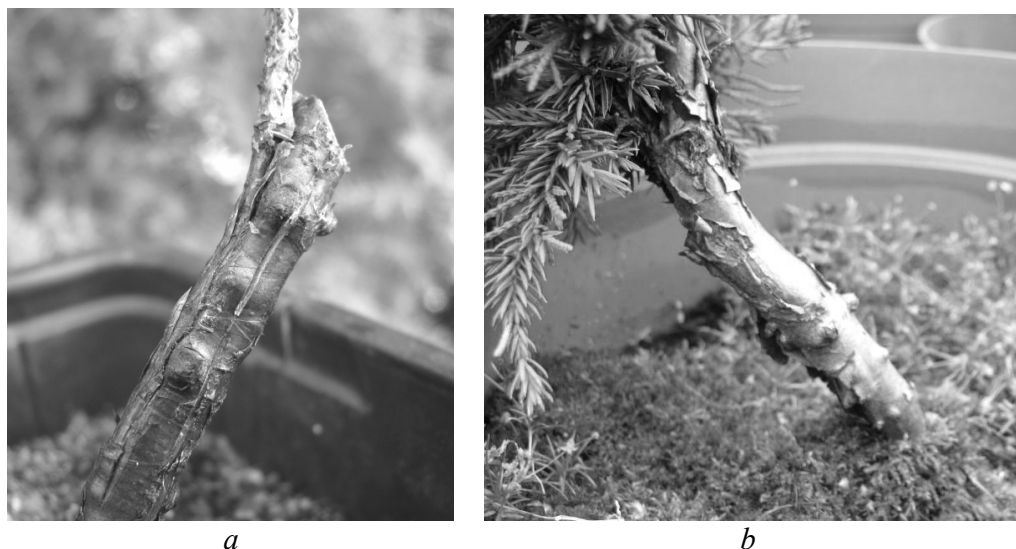
##### Annual increment of *Juniperus chinensis* ‘Blaauw’ seedlings of different origin

Год	Средний годичный прирост, см	
	привитых саженцев	саженцев черенкового происхождения
2016	17,7 ± 1,1	7,3 ± 0,8
2017	20,9 ± 1,0	10,7 ± 1,0
2018	3,2 ± 0,3	11,7 ± 0,9

Из данных таблицы следует, что саженцы черенкового происхождения обладают меньшей силой роста, чем привитые растения. Так, годичный прирост последних оказался примерно в 2–2,5 раза больше. При этом, однако, в 2018 г. скорость роста привитых растений значительно снизилась, а годичный прирост составил всего 3,2 см, что в 3,7 раза меньше, чем у саженцев, полученных из черенков. Объясняется это тем, что вследствие интенсивного роста в предыдущие годы объем контейнеров, в которых растения выращиваются, стал недостаточным для их нормального развития, в то время как саженцы черенкового происхождения, обладающие меньшей силой роста, еще не исчерпали ресурсы имеющегося субстрата. Поэтому для привитых растений уже требуется пересадка в более крупные контейнеры или на постоянное место произрастания.

Более мощный рост саженцев, полученных путем прививки, по сравнению с растениями черенкового происхождения можно объяснить влиянием подвоя. Известно, что некоторые свойства привоя могут изменяться под влиянием подвоя, что используется, например, для получения более устойчивых к климатическим факторам форм и сортов растений, для ускорения плодоношения, а также для других целей [11].

В нашем случае в качестве подвоя выступали саженцы можжевельника виргинского ‘Grey Owl’. Это широкораскидистый кустарник высотой 2–3 м и шириной более 5 м, с мощными, полупрямостоячими ветвями со слегка свисающими верхушками и зеленовато-серой хвоей. Культивар отличается быстрым ростом (годичный прирост около 25 см), а также высокой зимостойкостью, устойчивостью к болезням и вредителям. Укореняемость черенков при размножении в оптимальные сроки с использованием биологически активных веществ достигает 100 % [12], что позволяет получать подвой в необходимом количестве. Быстрорастущие укорененные черенки уже через 2 года после проведения черенкования готовы к прививке, так как диаметр стволика



Место прививки через 6 мес. после проведения трансплантации (а) и через 6 лет (б)

Site of grafting after 6 months after transplantation (a) and after 6 years (b)

саженцев в основании достигает 5–7 мм. Данный факт, а также положительное влияние на привой, которое проявляется в большей силе роста привитого растения по сравнению с растениями, полученными из черенков, обуславливает перспективность использования саженцев можжевельника виргинского ‘Grey Owl’ в качестве подвоя.

Отметим, что более мощный рост привитых растений можно объяснить также следующим образом. Прививка проводится на саженец с хорошо развитой корневой системой, что изначально обеспечивает привой необходимым питанием и обуславливает большую силу роста, в то время как черенок сам формирует корни и затрачивает на это большую часть энергии. Как следует из приведенных в таблице данных, прирост саженцев черенкового происхождения ежегодно возрастает, поэтому можно предположить, что по мере развития корневых систем скорость их роста увеличится до уровня привитых экземпляров. Однако наши наблюдения за ростом более взрослых растений можжевельника китайского ‘Vlaauw’ черенкового происхождения, произрастающих в грунте на постоянном месте, показали, что ежегодный прирост находится в пределах всего 12–16 см. Таким образом, можно сделать вывод, что на привой оказывает влияние подвой.

Успешность прививки можно также оценить визуально, осмотрев место срастания прививочных компонентов, так как с течением времени при их несовместимости либо при неподходящем способе прививки могут наблюдаться его деформация, а также различия в размерах подвоя и привоя и др. [6, 13]. В наших опытах место прививки на растениях можжевельника к настоящему времени трудноразлично. Это свидетельствует о хорошей совместимости компонентов прививки, подходящем способе ее проведения и позволяет прогнозировать долговечность полученных таким способом растений (см. рисунок).

**Заключение.** Результаты наблюдений в период с 2012 по 2018 г. за ростом растений можжевельника китайского ‘Vlaauw’, привитых в 2012 г. на двухлетние саженцы можжевельника виргинского ‘Grey Owl’ разными способами, показали, что с учетом одинаковой приживаемости прививок (около 80 %) лучшие результаты достигаются при прививке вприклад сердцевинной на сердцевину и сердцевинной на камбий. Полученные таким образом растения отличаются высокой жизнеспособностью. За весь период наблюдений выпало 38,5 % прививок, выполненных вприклад. При прививке способом в боковой зарез за 6 лет выжило всего 25 % привитых растений.

Саженцы можжевельника китайского ‘Vlaauw’, полученные путем прививки, отличаются более высокой по сравнению с саженцами черенкового происхождения скоростью роста (годовой)

прирост первых больше в 2–2,5 раза), что обусловлено влиянием подвоя. Место прививки со временем становится трудноразличимым, что свидетельствует о хорошей совместимости компонентов прививки и подходящем способе ее проведения.

Таким образом, ранневесенняя прививка можжевельника китайского ‘Blaauw’ свежезаготовленными черенками на двухлетние саженцы можжевельника виргинского ‘Grey Owl’ черенкового происхождения в фазе начала роста побегов в условиях теплицы вприклад сердцевинной на камбий или сердцевинной на сердцевину является перспективным способом размножения культивара, позволяющим получать около 80 % привитых растений с высокой жизнеспособностью и мощным ростом.

### Список использованных источников

1. Гартман, Х. Т. Размножение садовых растений / Х. Т. Гартман, Д. Е. Кестер. – М. : Сельхозиздат, 1963. – 471 с.
2. Бондорина, И. Привитые декоративные растения в озеленении городов / И. Бондорина, М. Кръстев // *Miestų želdynų formavimas*. – 2011. – Т. 8, № 1. – С. 32–34.
3. Логгинов, В. Б. Декоративные формы ели для парковых композиций и их размножение прививкой / В. Б. Логгинов // Оптимизация структуры парковых насаждений с использованием интродуцентов : сб. науч. тр. / Дендрол. заповедник «Александрия» ; под ред. Н. А. Кохно. – Киев, 1990. – С. 97–100.
4. Проказин, Е. П. Метод массового получения межвидовых и межродовых прививок хвойных в полевых условиях / Е. П. Проказин // *Ботан. журн.* – 1962. – Т. 47, № 7. – С. 987–990.
5. Тупик, П. В. Межвидовые и межродовые прививки лиственницы и пихты и особенности их роста / П. В. Тупик, Л. Ф. Поплавская // Проблемы лесоведения и лесоводства : сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2007. – Вып. 67. – С. 254–260.
6. Торчик, В. И. Интродукция псевдотсуги Мензиса (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) в условиях Беларуси / В. И. Торчик, Г. А. Холопук. – Минск : Беларус. навука, 2013. – 119 с.
7. Fordham, A. J. Propagation manual of selected gymnosperms / A. J. Fordham, L. J. Spraker // *Arnoldia*. – 1977. – Vol. 37, N 1. – P. 1–88.
8. Westervelt, D. D. The use of cutting-grafts for producing grafted junipers : a thesis submitted for the degree master of science / D. D. Westervelt. – Manhattan : Kansas State University of Agriculture and Applied Science, 1959. – 48 p.
9. Chong, C. Simultaneous grafting and rooting of juniper / C. Chong // *HortScience*. – 1981. – Vol. 16, N 4. – P. 561–562.
10. Келько, А. Ф. Вегетативное размножение можжевельника китайского ‘Blaauw’ в условиях Беларуси / А. Ф. Келько // *Проблемы совр. науки*. – 2012. – № 5, ч. 1. – С. 21–27.
11. Трусевич, Г. В. Интенсивное садоводство / Г. В. Трусевич. – М. : Россельхозиздат, 1978. – 204 с.
12. Торчик, В. И. Ризогенез у декоративных садовых форм хвойных растений и способы его интенсификации / В. И. Торчик, А. Ф. Келько, Г. А. Холопук. – Минск : Беларус. навука, 2017. – 218 с.
13. Оценка роста клонов плюсовых деревьев лжетсуги Мензиса в условиях ЦЧО / Н. С. Русин [и др.] // Генетическая оценка исходного материала в лесной селекции : сб. науч. тр. / М-во прир. ресурсов РФ, Науч.-исслед. ин-т лес. генетики и селекции ; отв. ред. А. М. Шутяев. – Воронеж, 2000. – С. 63–68.

### References

1. Gartman Kh. T., Kester D. Y. *Reproduction of garden plants*. Moscow, Sel'khozizdat Publ., 1963. 471 p. (in Russian).
2. Bondorina I., Kr'stev M. Grafted ornamental plants in city landscaping. *Miestų želdynų formavimas*, 2011, vol. 8, no. 1, pp. 32–34 (in Russian).
3. Logginov V. B. Decorative forms of spruce for park compositions and their propagation by grafting. *Optimizatsiya struktury parkovykh nasazhdenii s ispol'zovaniem introdutsentov: sbornik nauchnykh trudov* [Optimization of the structure of parkland using introducents: a collection of scientific papers]. Kiev, 1990, pp. 97–100 (in Russian).
4. Prokazin Y. P. The method of mass production of interspecies and intergeneric graftings of conifers in the field. *Botanicheskii zhurnal = Botanical Journal*, 1962, vol. 47, no. 7, pp. 987–990 (in Russian).
5. Tupik P. V., Poplavskaya L. F. Interspecific and intergeneric graftings of larch and fir and the features of their growth. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forest science and forestry: a collection of scientific papers]. Gomel', 2007, iss. 67, pp. 254–260 (in Russian).
6. Torchik V. I., Kholopuk G. A. *Introduction of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) in Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2013. 119 p. (in Russian).
7. Fordham A. J., Spraker L. J. Propagation manual of selected gymnosperms. *Arnoldia*, 1977, vol. 37, no. 1, pp. 1–88.
8. Westervelt D. D. *The use of cutting-grafts for producing grafted junipers : a thesis submitted for the degree master of science*. Manhattan, Kansas State University of Agriculture and Applied Science Publ., 1959. 48 p.
9. Chong C. Simultaneous grafting and rooting of juniper. *HortScience*, 1981, vol. 16, no. 4, pp. 561–562.

10. Kel'ko A. F. Vegetative propagation of *Juniperus chinensis* 'Blaauw' in Belarus. *Problemy sovremennoi nauki* [Problems of modern science], 2012, no. 5, pt. 1, pp. 21–27 (in Russian).
11. Trusevich G. V. *Intensive gardening*. Moscow, Rossel'khozizdat Publ., 1978. 204 p. (in Russian).
12. Torchik V. I., Kel'ko A. F., Kholopuk G. A. *Risogenesis in ornamental garden forms of conifers and ways of its intensification*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2017. 218 p. (in Russian).
13. Rusin N. S., Belyaev A. B., Posokhov V. P., Shiryayev V. I. Estimation of the growth of clones of the plus trees of the Douglas fir in conditions of the Central Chernozem region. *Geneticheskaya otsenka iskhodnogo materiala v lesnoi seleksii: sbornik nauchnykh trudov* [Genetic evaluation of the source material in forest breeding: a collection of scientific papers]. Voronezh, 2000, pp. 63–68 (in Russian).

### **Информация об авторе**

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

### **Information about the author**

*Hanna F. Kelko* – Ph. D. (Biol.), Senior 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

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616-006.487-06:616.419-033.2]:577.117.2:577.21

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-216-221>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

**Е. В. Кушнерова, И. В. Пахомова, И. В. Пролесковская**

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
Минский район, Республика Беларусь*

### **ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *TH* И *PHOX2B* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ**

**Аннотация.** Несмотря на применение комплексного лечения, выживаемость пациентов группы высокого риска при нейробластоме не превышает 50 %, при этом основная причина смертельных исходов – развитие рецидива заболевания. Ключевыми факторами неблагоприятного прогноза в отношении выживаемости и частоты развития рецидивов являются поражение костного мозга (КМ), а также наличие минимальной остаточной болезни на различных этапах терапии.

Наиболее перспективным методом, позволяющим с высокой чувствительностью и специфичностью (за счет комбинации молекулярных маркеров) выявлять клетки нейробластомы в образцах КМ является ПЦР в режиме реального времени. В данной работе нами разработан метод оценки экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* для детекции метастатического поражения КМ при нейробластоме. Разработанный метод обладает высокой чувствительностью ( $1 \cdot 10^{-4}$ ) и специфичностью к опухолевым клеткам. Экспрессия генов *TH* и *PHOX2B* оценена у 67 пациентов детского возраста с нейробластомой на момент постановки диагноза. Показано наличие клинического значения оценки экспрессии генов *TH* и *PHOX2B*, что проявляется достоверно худшими показателями общей и безрецидивной выживаемости в группе пациентов с гиперэкспрессией детектируемых генов. Разработанный метод может быть использован в клинической практике как для оценки степени поражения КМ, так и для стратификации пациентов по группам риска на момент постановки диагноза.

**Ключевые слова:** нейробластома, *TH*, *PHOX2B*, ПЦР в режиме реального времени, общая выживаемость, бессобытийная выживаемость

**Для цитирования:** Кушнерова, Е. В. Оценка экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* с использованием ПЦР в режиме реального времени для диагностики метастатического поражения костного мозга при нейробластоме / Е. В. Кушнерова, И. В. Пахомова, И. В. Пролесковская // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 216–221. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-216-221>

**L. V. Kushniarova, I. V. Pakhomava, I. V. Praliaskouskaya**

*Republican Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk region, Republic of Belarus*

### **EVALUATION OF *TH* AND *PHOX2B* GENE EXPRESSION BY REAL TIME PCR FOR DIAGNOSTIC OF BONE MARROW METASTATIC LESION IN NEUROBLASTOMA PATIENTS**

**Abstract.** Despite on using the use of complex treatment, the survival of high risk neuroblastoma patients doesn't exceed 50 % with relapse as the main cause of death. The bone marrow (BM) lesion and presence of minimal residual disease at various stages of therapy are key factors of poor outcome and high frequency of relapse.

Real time PCR is the most promising method for detecting neuroblastoma cells in BM samples due to the high sensitivity and specificity, which achieved by combination of several molecular markers. In this study we developed a method for evaluation *TH* and *PHOX2B* expression for monitoring metastatic BM lesion in neuroblastoma patients. This method has high sensitivity ( $1 \cdot 10^{-4}$ ) and specificity to tumor cells. Evaluation of *TH* and *PHOX2B* gene expression was performed for 67 children with neuroblastoma at the time of diagnosis. We demonstrated that patients with overexpression of these genes has significantly worse overall and relapse-free survival. So, the developed method can be used in clinical practice for evaluation BM lesion degree as well as for risk group stratification in neuroblastoma patients at the time of diagnosis.

**Keywords:** neuroblastoma, *TH*, *PHOX2B*, minimal residual disease, real-time PCR

**For citation:** Kushniarova L. V., Pakhomava I. V., Praliaskouskaya I. V. Evaluation of *TH* and *PHOX2B* gene expression by real time PCR for diagnostic of bone marrow metastatic lesion in neuroblastoma patients. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 216–221 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-216-221>



**Введение.** Нейробластома (НБ) является злокачественной эмбриональной опухолью симпатической нервной системы, которая составляет 10 % от всех детских онкологических заболеваний. Возраст более 1 года и наличие метастатического поражения костного мозга (КМ) на момент постановки диагноза служат основанием для отнесения пациентов к группе высокого риска, общая выживаемость (ОВ) в которой не превышает 40–50 %. Около 50 % пациентов, достигших ремиссии, рецидивируют в течение 5 лет с момента постановки диагноза. Рецидив происходит в результате активации остаточных опухолевых клеток, которые могут присутствовать как в месте локализации первичной опухоли, так и в сайтах метастазирования [1].

Оценка поражения КМ во время постановки диагноза и в ходе терапии позволяет контролировать эффективность лечения и определять группу с высоким риском развития рецидива. Применяемые в настоящее время методы оценки поражения КМ при НБ имеют ряд недостатков. Чувствительность цитологического исследования аспиратов КМ не превышает  $1 \cdot 10^{-2}$ , проточной цитофлуориметрии –  $1 \cdot 10^{-3}$ . Иммуноцитохимический анализ хоть и способен достигать большей чувствительности (вплоть до  $1 \cdot 10^{-6}$ ), но основан на оценке экспрессии поверхностного маркера GD2, который не является опухолеспецифичным. Диагностика метастатического поражения КМ методом ПЦР в режиме реального времени имеет ряд преимуществ: аналитическая чувствительность метода ПЦР в режиме реального времени может достигать  $1 \cdot 10^{-6}$  [2]; возможно использование нескольких молекулярных маркеров для более точной диагностики с учетом вероятной гетерогенности опухолевого фенотипа. При этом маркерный ген должен либо экспрессироваться исключительно в клетках НБ, либо его экспрессия в клетках НБ должна быть значительно выше экспрессии в клетках КМ.

В настоящее время в различных лабораториях для диагностики поражения КМ при НБ используется достаточно большое количество молекулярных маркеров, таких как *GAGE*, *MAGE*, *PGP9.5*, *DDC*, *CyclinD1*, *ELVAL4* [3–6]. При этом комплексный стандартизированный подход для решения поставленной задачи отсутствует. Одним из первых маркеров поражения КМ клетками НБ был предложен ген *TH* в связи с высокой продукцией клетками НБ катехоламинов [6]. Еще одним геном, экспрессия которого характерна для клеток НБ, является *PHOX2B*. Продуктом гена *PHOX2B* является транскрипционный фактор, регулирующий нейрогенез [7]. Согласно литературным данным, гиперэкспрессия обоих генов ассоциирована с неблагоприятным клиническим течением НБ [4–7].

Цель данной работы – разработка метода оценки экспрессии генов *PHOX2B* и *TH* с помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени для диагностики метастатического поражения костного мозга при нейробластоме.

**Материалы и методы исследования.** Материалом для исследования послужили образцы КМ 10 здоровых доноров и 67 пациентов с диагнозом НБ, проходивших лечение в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии по протоколу NB2004 в период с 2007 по 2017 г. Забор материала производился на момент постановки диагноза. Распределение пациентов по стадиям: стадия 1 – 6 (8,9 %) человек; стадия 2 – 2 (3 %); стадия 3 – 7 (10,5 %); стадия 4 – 52 (77,6 %). Распределение пациентов по группам риска: низкий – 6 (9 %) человек, средний – 1 (1,4 %), высокий – 60 (89,5 %). Наличие поражения КМ было детектировано в 44 случаях, для 20 пациентов наличие метастазов в КМ диагностировано не было.

Для культивирования иммортализованной клеточной линии НБ человека IMR-32 использовали среду ЕМЕМ с добавлением антибиотика/антимикотика (1 %), L-глутамин (1 %) и эмбриональной телячьей сыворотки (10 %). Пассажи проводили из расчета  $40 \text{ тыс/см}^2 \cdot \text{с}$  с периодичностью 72 ч. Для подсчета клеток и оценки их жизнеспособности использовали камеру Горяева, предварительно окрашивая клетки трипановым синим.

Для выделения клеток КМ применяли метод лизиса эритроцитов, для экстракции тотальной РНК – TRI-reagent (Invitrogen, США). Синтез кДНК осуществляли с помощью обратной транскриптазы SuperScript™III (Invitrogen, США) и смеси случайных гексамеров (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. ПЦР в режиме реального времени проводили в конечном

объеме 12,5 мкл с использованием TaqMan® Universal PCR MasterMix (AppliedBiosystems, США). Конечная концентрация праймеров и флуоресцентных зондов для генов *GUS* (контрольный ген), *TH* и *PHOX2B* составила 300 и 200 нмоль/мкл соответственно (табл. 1). В каждую ПЦР обязательно включали отрицательный (деионизированную воду) и положительный (кДНК клеточной линии IMR-32) контроля. Каждый образец анализировали в триplete. Пороговый цикл (*Ct*) для образца рассчитывали как среднее арифметическое *Ct* лунок в триplete, при условии, что разница *Ct* между лунками не превышает 0,5. При значении *Ct* контрольного гена более 30 образец исключали из исследования. Уровни экспрессии генов-маркеров рассчитывали методом  $\Delta Ct(2^{Ct(GUS)-Ct(ген-маркер)})$ .

Т а б л и ц а 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов

T a b l e 1. Nucleotide sequences of primers and fluorescent probes

Ген	Последовательность олигонуклеотида 5'/3'			Источ-ник
	Прямой праймер	Обратный праймер	Флуоресцентный зонд	
<i>GUS</i>	gaa-aat-atg-tgg-ttg-gag-agc-tca-tt	ccg-agt-gaa-gat-ccc-ctt-ttt-a	FAM-cca-gca-ctc-tcg-tcg-gtg-act-gtt-ca-BHQ1	[5]
<i>TH</i>	att-gct-gag-atc-gcc-ttc-ca	aat-ctc-ctc-ggc-ggt-gta-ctc	FAM-aca-ggc-acg-gcg-acc-cga-ttc-BHQ1	[6]
<i>PHOX2B</i>	tgc-tga-ctt-cag-ttc-ctg-ca	ccg-tgg-tcc-gtg-aag-agt-tt	FAM-agc-agt-ccg-tac-gcc-gca-gtt-cct-BHQ1	–

Аналитическую чувствительность метода оценивали, используя 10-кратные разведения клеток НБ линии IMR-32 в клетках КМ трех здоровых доноров.

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 8.0, для сравнения количественных параметров в двух независимых группах – критерий Манна–Уитни. Влияние степени поражения КМ в каждом пороге отсечения на общую и безрецидивную выживаемость (БРВ) пациентов группы высокого риска оценивали методом Log-rank путем сравнения кривых Каплана–Мейера. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Высокие показатели экспрессии гена *PHOX2B* были характерны для клеточной линии IMR-32 и части образцов КМ с диагностированным метастатическим поражением (табл. 2). При этом экспрессия данного гена не была детектирована в КМ здоровых доноров. Детектированная в образцах КМ здоровых доноров экспрессия гена *TH* была достоверно ниже экспрессии этого гена в опухолевых клетках и образцах КМ пациентов с поражением КМ (в обоих случаях  $p < 0,001$ ).

Т а б л и ц а 2. Показатели экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* в клетках IMR-32 и клетках костного мозга здоровых доноров и пациентов, Me (min–max)T a b l e 2. Expression indices of *TH* and *PHOX2B* genes in IMR-32 cells and bone marrow cells healthy donors and patients, Me (min–max)

Ген	IMR-32	КМ здоровых доноров ( $n = 10$ )	Позитивные образцы КМ ( $n = 44$ )	Негативные образцы КМ ( $n = 20$ )
<i>PHOX2B</i>	1,705	0	0,0166 (0–8,0371)	0
<i>TH</i>	0,6631	0 (0–0,0008)	0,2426 (0,001–32,2226)	0 (0–0,0007)

Таким образом, ген *PHOX2B* является опухолеспецифичным маркером, а наличие у него экспрессии является критерием присутствия в образце опухолевых клеток. Экспрессия гена *TH* ассоциирована с опухолевым фенотипом и может выступать в качестве маркера опухолевых клеток при НБ. Кроме того, комбинация изучаемых маркеров позволяет дополнительно обнаружить до 6 % позитивных образцов, в которых экспрессия *PHOX2B* не выявляется [9].

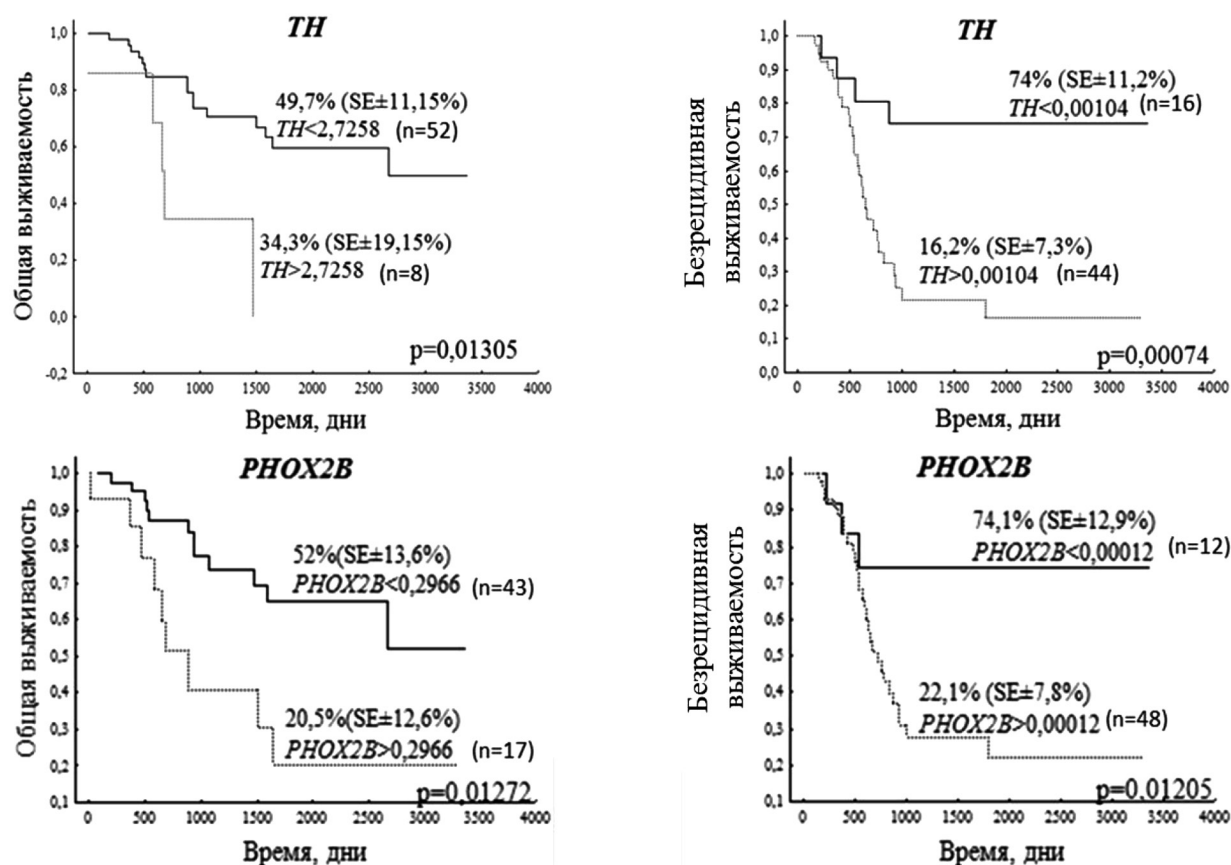
Аналитическая чувствительность при анализе серийных разведений клеток IMR-32 в клетках КМ здоровых доноров достигла  $1 \cdot 10^{-4}$  для обоих генов. Согласно представленным в табл. 3 характеристикам стандартных кривых для генов *TH* и *PHOX2B*, основные критерии качества амплификации соблюдены [10].

Таблица 3. Амплификационные характеристики стандартных кривых по генам *TH* и *PHOX2B*

Table 3. Amplification characteristics of standard curves for *TH* and *PHOX2B* genes

Клетки КМ	Эффективность, %		Коэффициент R <sup>2</sup>		Тангенс угла наклона кривой		Интерсепт	
	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>TH</i>	<i>PHOX2B</i>
Донор 1	95,6	89,2	0,992	0,999	-3,433	-3,612	23,841	19,827
Донор 2	97,2	94,3	0,996	0,984	-3,391	-3,467	19,426	16,976
Донор 3	99,6	95,7	0,994	0,999	-3,333	-3,429	21,924	19,884
Среднее значение	97,5	93,1	0,994	0,994	-3,386	-3,501	21,73	18,896
Коэффициент вариации, %	2,07	3,68	0,20	0,87	1,48	2,76	10,19	8,80

С целью отработки метода и оценки перспективности его использования в клинической практике проведена оценка экспрессии генов *TH* и *PHOX2B* в образцах КМ 67 пациентов с НБ. Наличие экспрессии гена *TH* было детектировано у 50 пациентов (медиана составила 0,15015, минимальное значение – 0,00011, максимальное – 32,22258), в то время как 17 пациентов не имели экспрессии указанного гена в образцах КМ. Экспрессия гена *PHOX2B* была детектирована у 48 пациентов (медиана составила 0,08381, минимальное значение – 0,00011, максимальное – 8,03705), отсутствие экспрессии – у 19 пациентов. При изучении влияния уровня экспрессии маркерных генов на выживаемость пациентов с НБ высокой группы риска на момент постановки диагноза ( $n = 60$ ) установлено, что гиперэкспрессия обоих генов ассоциирована с худшими показателями ОВ и БРВ (см. рисунок). Полученные результаты указывают на целесообразность использования разработанного метода в клинической практике с целью определения прогностически неблагоприятной группы пациентов детского возраста с диагнозом НБ.



Показатели выживаемости пациентов группы высокого риска на момент постановки диагноза в зависимости от уровня экспрессии генов *TH* и *PHOX2B*

Survival rates of patients at high risk at the time of formulation diagnosis, depending on the expression levels of the *TH* and *PHOX2B* genes

**Заключение.** С помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени разработан метод оценки экспрессии генов *PHOX2B* и *TH*. Используемые молекулярные маркеры обладают высокой специфичностью к клеткам НБ, а сам метод позволяет с чувствительностью  $1 \cdot 10^{-4}$  определять наличие целевых молекул в образце. Таким образом, предлагаемый метод удовлетворяет основным критериям, необходимым для использования в клинической практике, и позволяет решить такие задачи, как детекция метастатического поражения КМ при НБ и оценка прогноза заболевания (высокие показатели экспрессии генов *PHOX2B* и *TH* связаны с худшими показателями ОВ и БРВ ( $p < 0,05$ )). Кроме того, разработанный метод может быть использован для оценки минимальной остаточной болезни на различных этапах терапии НБ у пациентов высокой группы риска, а детектируемая aberrантная экспрессия генов *PHOX2B* и *TH* может выступать в качестве дополнительного фактора прогноза в ходе терапевтического процесса.

### Список использованных источников

1. Hallet, A. A review and update on neuroblastoma / A. Hallet, H. Traunecker // *Pediatr. Child Health*. – 2012. – Vol. 22, N 3. – P. 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2011.08.005>
2. Szewczyk, K. Methods for detection of minimal residual disease in neuroblastoma peditric tumor / K. Szewczyk, W. Balwierz // *Eur. J. Med. Technol.* – 2017. – Vol. 2, N 15. – P. 23–28.
3. Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma / I. Y. Cheung [et al.] // *J. Mol. Diagn.* – 2007. – Vol. 9, N 2. – P. 237–241. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060130>
4. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers / J. Stutterheim [et al.] // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55, N 7. – P. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>
5. Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma / I. Y. Cheung [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, N 21. – P. 7020–7027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-0541>
6. Minimal disease monitoring by QRT-PCR: guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials / V. Viprey [et al.] // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 216, N 2. – P. 245–252. <https://doi.org/10.1002/path.2406>
7. Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells / Z. Kuçi [et al.] // *Anticancer Res.* – 2006. – Vol. 26, N 3A. – P. 2075–2080.
8. *PHOX2B* is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma / J. Stutterheim [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, N 33. – P. 5443–5449. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.6531>
9. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers / J. Stutterheim [et al.] // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55, N 7. – P. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>
10. Fraga, D. Real-time PCR overview and principles / D. Fraga, T. Meulia, S. Fenster // *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* – 2008. – Vol. 1. – P. 10.3.1–10.3.34. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>

### References

1. Hallet A., Traunecker H. A review and update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health*, 2012, vol. 22, no. 3, pp. 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2011.08.005>
2. Szewczyk K., Balwierz W. Methods for detection of minimal residual disease in neuroblastoma peditric tumor. *European Journal of Medical Technologies*, 2017, vol. 2, no. 15, pp. 23–28.
3. Cheung I. Y., Feng Y., Vickers A., Gerald W., Cheung N.-K. V. Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2007, vol. 9, no. 2, pp. 237–241. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060130>
4. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Yalcin B., Dee R., van Noesel M. M. [et al.]. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clinical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 7, pp. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>
5. Cheung I. Y., Feng Y., Gerald W., Cheung N.-K. V. Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 2008, vol. 14, no. 21, pp. 7020–7027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-0541>
6. Viprey V. F., Lastowska M. A., Corrias M. V., Swerts K., Jackson M. S., Burchill S. A. Minimal disease monitoring by QRT-PCR: guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials. *Journal of Pathology*, 2008, vol. 216, no. 2, pp. 245–252. <https://doi.org/10.1002/path.2406>
7. Kuçi Z., Seitz G., Kuçi S., Kreyenberg H., Schumm M., Lang P., Niethammer D., Handgretinger R., Bruchelt G. Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells. *Anticancer Research*, 2006, vol. 26, no. 3A, pp. 2075–2080.

8. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Kleijn I., Dee R., Hooft L. [et al.]. *PHOX2B* is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, no. 33, pp. 5443–5449. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.6531>

9. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Yalcin B., Dee R., van Noesel M. M. [et al.]. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clinical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 7, pp. 1316–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117945>

10. Fraga D., Meulia T., Fenster S. Real-time PCR overview and principles. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 2008, vol. 1, pp. 10.3.1–10.3.34. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>

### Информация об авторах

*Кушнерова Елизавета Викторовна* – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [elizaveta.kushnerova@gmail.com](mailto:elizaveta.kushnerova@gmail.com)

*Пахомова Ирина Вениаминовна* – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: [Pachomova.Irina@gmail.com](mailto:Pachomova.Irina@gmail.com)

*Пролесковская Инна Витальевна* – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: [proleskai@mail.ru](mailto:proleskai@mail.ru)

### Information about the authors

*Lizaveta V. Kushniarova* – student. Belarusian State University Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [elizaveta.kushnerova@gmail.com](mailto:elizaveta.kushnerova@gmail.com)

*Iryna V. Pakhomava* – Junior researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: [Pachomova.Irina@gmail.com](mailto:Pachomova.Irina@gmail.com)

*Inna V. Praliaskouskaya* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Department. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: [proleskai@mail.ru](mailto:proleskai@mail.ru)

ISSN 1029-8940 (Print)  
 ISSN 2524-230X (Online)  
 УДК 54.04:577.113.4  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-222-228>

Поступила в редакцию 14.11.2018  
 Received 14.11.2018

**В. М. Королевич<sup>1</sup>, П. Блажинска<sup>2</sup>, А. Сыкула<sup>2</sup>, Е. Лодыга-Хрущинска<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Лодзинский технический университет, Лодзь, Польша*

## ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА 2'-ГИДРОКСИФЛАВАНОНА И ЕГО ПРОИЗВОДНОГО НА ОСНОВЕ МОДИФИКАЦИИ ШИФФА

**Аннотация.** Флаваноиды – крупнейший класс растительных полифенолов. 2'-Гидроксифлаванон относится к производным флавоноидов и первоначально был выделен из растения мимоза пугливая (*Mimosa pudica*). Данное химическое соединение обладает широким спектром биологической активности, в том числе и способностью к связыванию с ДНК. Нами изучены физико-химические свойства 2'-гидроксифлаванона и его производного на основе модификации Шиффа, а также механизмы их взаимодействия с ДНК. Качественный анализ проведен с помощью ядерного магнитного резонанса. Для анализа стабильности химической структуры производного 2'-гидроксифлаванона на основе модификации Шиффа использовали ультрафиолетовую спектроскопию. 2'-Гидроксифлаванон и его производное фотостабильны в диметилсульфоксиде. Взаимодействие 2'-гидроксифлаванона и его производного происходит по механизму интеркаляции. Изменение структуры молекулы 2'-гидроксифлаванона путем модификации Шиффа приводит к усилению ДНК-связывающих свойств. Высокая аффинность связывания с ДНК 2'-гидроксифлаванона и его производного в форме модификации Шиффа может найти применение при разработке противоопухолевых и антимикробных лекарств.

**Ключевые слова:** 2'-гидроксифлаванон, модификация Шиффа, ДНК-связывающие свойства, константа связывания с ДНК

**Для цитирования:** ДНК-связывающие свойства 2'-гидроксифлаванона и его производного на основе модификации Шиффа / В. М. Королевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 222–228. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-222-228>

**V. M. Korolevich<sup>1</sup>, P. Blazinska<sup>2</sup>, A. Sykula<sup>2</sup>, E. Lodyga-Chruscinska<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Lodz University of Technology, Lodz, Poland*

## DNA BINDING PROPERTIES OF 2'-HYDROXYFLAVANON AND SCHIFF BASE DERIVATIVE

**Abstract.** Flavanoids a class of plant and fungus secondary metabolites. 2'-Hydroxyflavanone was previously isolated from *Mimosa pudica* (L.) whole plant and was found to exhibit anti-inflammatory effects in vitro and binding with calf thymus DNA. There are also reports on anti-inflammatory properties of compounds bearing flavanone/chromone nucleus. The aim of this work was to develop a synthesis of new azomethine compounds derived from flavanones, to examine their spectroscopic properties and interaction with DNA. 2'-Hydroxyflavanone and thiocarbonylhydrazide were used as substrates in the synthesis. The obtained products were analyzed by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, UV-Vis. Ultraviolet spectroscopy was used to analyze the chemical-physical properties. Mechanism of interaction of bioactive 2'-hydroxyflavanone with calf thymus deoxyribonucleic acid (DNA) was studied employing UV absorption. 2'-Hydroxyflavanone and 2'-HFTCH are photostable in DMSO. The interaction of 2'-hydroxyflavanone and its derivative occurs by the mechanism of intercalation. The change in the structure of the 2'-hydroxyflavanone molecule by Schiff base modification leads to an increase in DNA-binding properties. High binding ability of 2'-hydroxyflavanone with DNA may be useful for development of new anti-inflammatory and antimicrobial remedies.

**Keywords:** 2'-hydroxyflavanone, calf thymus DNA, nuclear magnetic resonance

**For citation:** Korolevich V. M., Blazinska P., Sykula A., Lodyga-Chruscinska E. DNA binding properties of 2'-hydroxyflavanone and Schiff base derivative. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 222–228 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-222-228>

**Введение.** Флаваноиды представляют собой биологически активные соединения, относящиеся к классу полифенольных соединений. Структурную основу флаваноидов составляют два бензольных ядра, соединенных друг с другом трехуглеродным фрагментом согласно формуле C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Флаваноиды обладают широким спектром биологической активности, включая противораковые, противомаларийные, антиоксидантные, противоинфекционные свойства и др. [1]. Эффективность биологического действия определяется структурными особенностями их

молекулы. В частности, методом анализа соотношения структура – функция (QSAR, *quantitative structure – activity relationships*) молекул флавоноидов установлено, что антиоксидантная активность последних зависит от положения ОН-групп в молекуле, наличия или отсутствия двойной связи в кольце С, а также от формы молекулы [2].

Среди флавоноидов наибольшим антибактериальным и противоопухолевым эффектом обладают флаваноны. В частности, 2'-гидроксифлаванон подавляет развитие рака молочной железы в результате ингибирования пролиферации и васкуляризации опухоли [3], индуцирует апоптоз клеток рака толстой кишки [4], способствует нормальной дифференцировке клеток в карциноме почек [5]. Антибактериальные свойства 2'-гидроксифлаванона показаны для бактерий *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* и связаны с подавлением роста культуры [6]. Помимо антиоксидантной активности одним из возможных механизмов, объясняющих противоопухолевые и антибактериальные свойства 2'-гидроксифлаванона, является ранее продемонстрированная способность данного соединения к взаимодействию с ДНК, посредством чего может осуществляться регуляция экспрессии генов опухолевых и бактериальных клеток [7].

В то же время структурные изменения флавоноидов и других молекул, связанные с модификацией Шиффа, приводят к значительному усилению противомикробной и противоопухолевой активности. Основания Шиффа проявляют активность против грамположительных бактерий, таких как *S. aureus*, и грамотрицательных бактерий – *E. coli*, *P. aeruginosa*. Среди флавоноидов с модификацией Шиффа N-(салицилиден)-2-гидроксианилин показал эффективность против *M. tuberculosis* [8]. Основания Шиффа с 2,4-дихлор-5-фторфенильным фрагментом эффективны также при ингибировании роста бактерий *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* [9]. Гесперетин с модификацией Шиффа полностью подавлял рост культуры *S. aureus* [10]. В то же время механизмы, приводящие к усилению биологической активности флавоноидов в случае модификации Шиффа, практически не изучены.

Исследование взаимодействий флавоноидов с ДНК может помочь в разработке терапевтических агентов с целью регуляции экспрессии генов. Малые молекулы способны связываться с ДНК с помощью следующих механизмов [11]:

интеркалирующего связывания, когда молекула включается в пары оснований нуклеиновых кислот;

связывания в малой или большой бороздках двойной спирали ДНК путем ван-дер-ваальсовых взаимодействий;

электростатического взаимодействия между отрицательно заряженной фосфатной группой ДНК и катионным концом молекулы.

Среди перечисленных выше механизмов малые молекулы, интеркалированные в ДНК, более устойчивы к воздействию внешних агентов. Данный механизм связывания с ДНК наблюдается также у флавоноидов [12].

Цель настоящей работы – исследование физико-химических свойств 2'-гидроксифлаванона и его производного на основе модификации Шиффа, а также механизмов их взаимодействия с ДНК.

Для достижения цели нашего исследования были поставлены следующие задачи:

проанализировать физико-химические свойства 2'-гидроксифлаванона и его производного;

изучить особенности взаимодействия 2'-гидроксифлаванона и его производного с ДНК;

определить константу связывания 2'-гидроксифлаванона и его производного с ДНК.

**Материалы и методы исследования.** Производное 2'-гидроксифлаванона на основе модификации Шиффа с использованием тиокарбогидрида обозначено нами как 2'НФТСН. Для синтеза 2'НФТСН использовали тиокарбогидрид и 2'-гидроксифлаванон (Sigma Aldrich, США) согласно методу, приведенному в работе [13]. После полного растворения тиокарбогидрида в колбу с  $C_2H_5OH$  добавляли 2'-гидроксифлаванон и полученный раствор, постоянно помешивая, в течение 25 ч нагревали до 89 °С в присутствии 99 % концентрированной серной кислоты. Полученный желтый осадок фильтровали, промывали холодной водой и высушивали.

Качественный анализ синтезированного соединения – производного 2'-гидроксифлаванона на основе модификации Шиффа – был проведен с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

и ультрафиолетовой спектроскопии. Спектр ЯМР был записан на спектрометре Bruker AV200 200МН в ДМСО с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. Для изучения фотостабильности использовали растворы 2'-гидроксифлаванона и производного 2'-гидроксифлаванона на основе модификации Шиффа в концентрации 0,01 М (ДМСО). Фотостабильность 2'-гидроксифлаванона и его производного исследовали с помощью ультрафиолетовой спектроскопии при длине волны 323 нм.

Для определения констант связывания с ДНК 2'-гидроксифлаванона и 2'НФТСН с ДНК осуществляли путем смешивания раствора исследуемого флавоноида (25 мкМ) с растворами ДНК (СТ-DNA, Sigma, Германия) в концентрации от 0 до 25 мкМ и затем рассчитывали спектры поглощения полученных растворов. Растворы СТ-DNA и флавоноидов готовили на фосфатном буфере (50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7,4). Для последующих расчетов использовали  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ . Все измерения проводили после инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре. Анализ спектров поглощения осуществляли с помощью программы OriginPro8 (OriginLab, США). Константу связывания рассчитывали по уравнению

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_b) + 1/\text{Kb}(\epsilon_a - \epsilon_f),$$

где  $[\text{DNA}]$  – концентрация ДНК,  $\epsilon_a$  – коэффициент молярного поглощения комплекса исследуемого флавоноида с ДНК,  $\epsilon_f$  – коэффициент молярного поглощения исследуемого флавоноида в отсутствие ДНК,  $\epsilon_b$  – коэффициент молярного поглощения полностью связанного соединения и его производного с ДНК. Формула  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  в соотношении с  $[\text{DNA}]$  дает угловой коэффициент –  $1/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ , а линейный коэффициент равен  $1/\text{Kb}(\epsilon_b - \epsilon_f)$ . Константа связывания (Kb) определяется через отношение углового коэффициента к линейному [14].

**Результаты и их обсуждение.** Химическое уравнение реакции синтеза производного на основе модификации Шиффа представлено на рис. 1. В состав молекулы вновь синтезированного соединения входят две молекулы 2'-гидроксифлаванона, соединенные между собой тиокарбонгидразильной группой.

С целью исключения изменения химической структуры 2'-гидроксифлаванона и 2'НФТСН нами была проверена фотостабильность соединений в ДМСО в течение 4 ч (рис. 2).

Наблюдаемые на рис. 2 незначительные изменения оптической плотности 2'-гидроксифлаванона (от 0,2566 до 0,27096 (рис. 2, а) и его производного (от 0,50828 до 0,49608 (рис. 2, б) свидетельствуют о стабильности данных химических соединений в ДМСО.

Чистоту производного на основе модификации Шиффа 2'НФТСН проверяли с помощью метода ЯМР (рис. 3). Характерные области химических сдвигов протонов различных фрагментов (NH, OH, H, H<sub>2</sub>O, DMSO) в спектре ЯМР указывали на наличие определенных атомных групп в молекуле 2'НФТСН.

На рис. 4 представлены спектры поглощения 2'-гидроксифлаванона и его производного на основе модификации Шиффа 2'НФТСН при наличии и отсутствии ДНК, характеризующие ДНК-связывающие свойства исследуемых соединений.

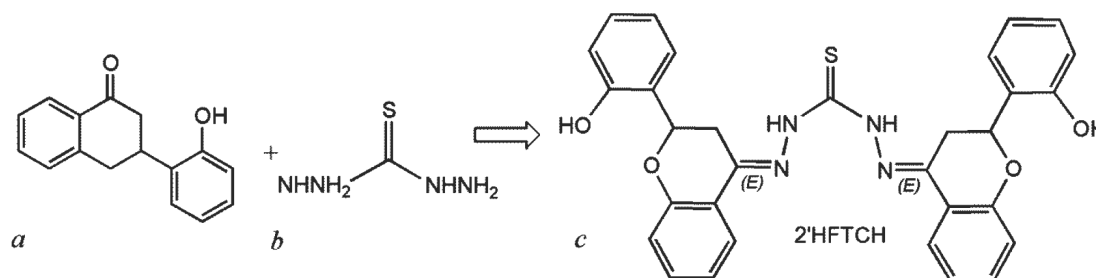


Рис. 1. Реакция синтеза производного 2'-гидроксифлаванона на основе модификации Шиффа:  
а – 2'-гидроксифлаванон; б – тиокарбонгидразид; с – 2'НФТСН

Fig. 1. Synthesis of Schiff base derivative of the 2'-hydroxyflavanone: а – 2'-hydroxyflavanone;  
b – thiocarbonyl dihydrazide; с – 2'NFTCH



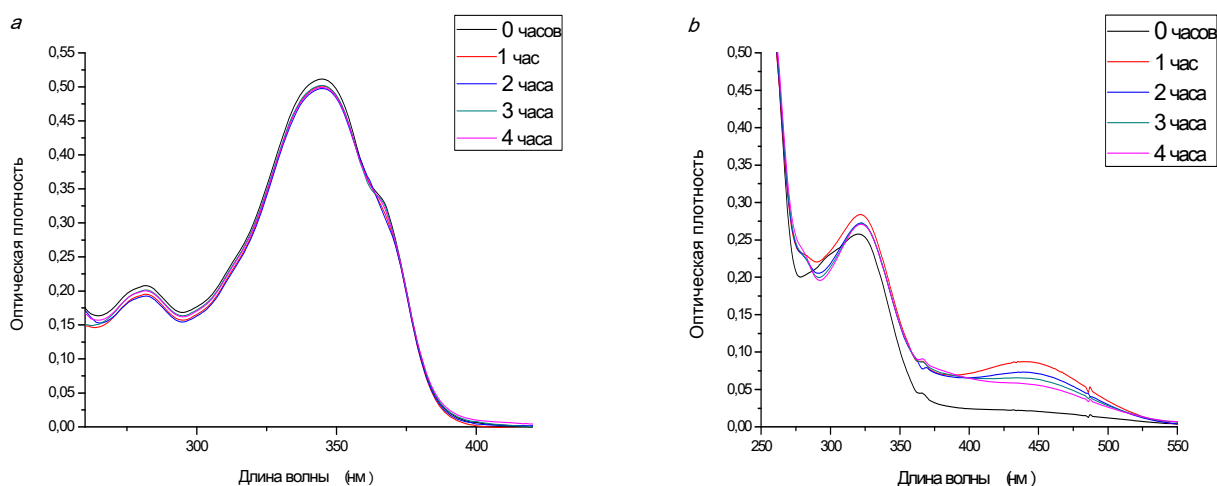


Рис. 2. Фотостабильность 2'-гидроксифлаванона (а) и 2'HFTCH (b)

Fig. 2. Fotostability of 2'-hydroxyflavanone (a) and 2'HFTCH (b)

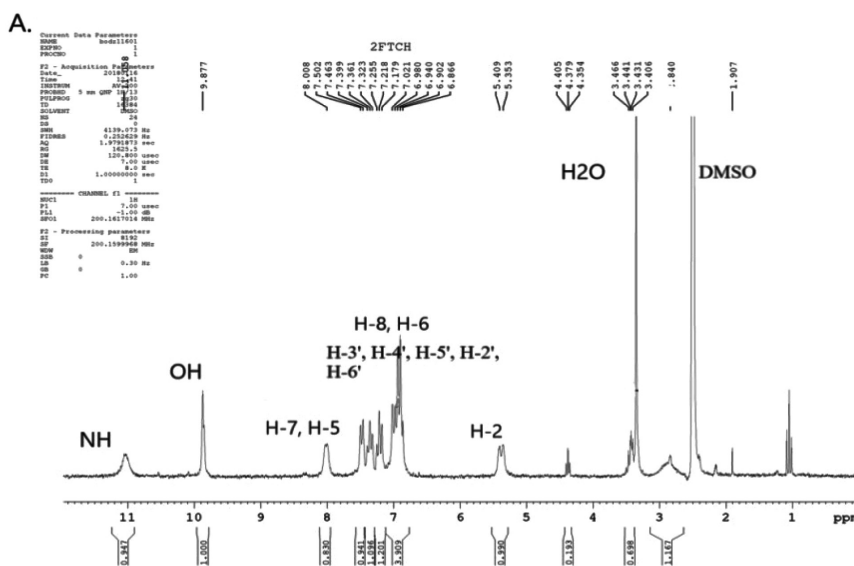


Рис. 3. Спектр ядерного магнитного резонанса 2'HFTCH

Fig. 3. Nuclear magnetic resonance spectra 2'HFTCH

Основываясь на том, что фенольный каркас молекул флавоноидов содержит 15 атомов углерода, образующих два ароматических кольца (рис. 4, а, b), которые соединены тремя углеродными атомами, исследуемый 2'HFTCH находится в системе В (второй пик на рис. 4). Исходя из этого, в спектре 2'-гидроксифлаванона максимальный пик приходится на длину волны 323 нм. В случае с производным на основе модификации Шиффа 2'HFTCH максимальный пик приходится на длину волны 357 нм. При добавлении ДНК к раствору 2'-гидроксифлаванона с фосфатным буфером происходит незначительный сдвиг (на 1 нм) максимума поглощения при  $\lambda_{\max} = 323$  нм, в то время как при добавлении ДНК к 2'HFTCH в фосфатном буфере наблюдается значительный сдвиг (на 10 нм) максимума поглощения в фиолетовую (коротковолновую) сторону (синее смещение) при  $\lambda_{\max} = 357$  нм. Это обусловлено тем, что взаимодействие между ДНК и исследуемыми соединениями происходит путем интеркаляции. Синий сдвиг может быть обусловлен Н-связыванием между интеркалирующим соединением и ДНК [15].

Значительное изменение интенсивности поглощения наблюдалось в двух случаях: на спектре с 2'-гидроксифлаванона экстинкция увеличилась от 0,08301 (оптическая плотность несвязанной

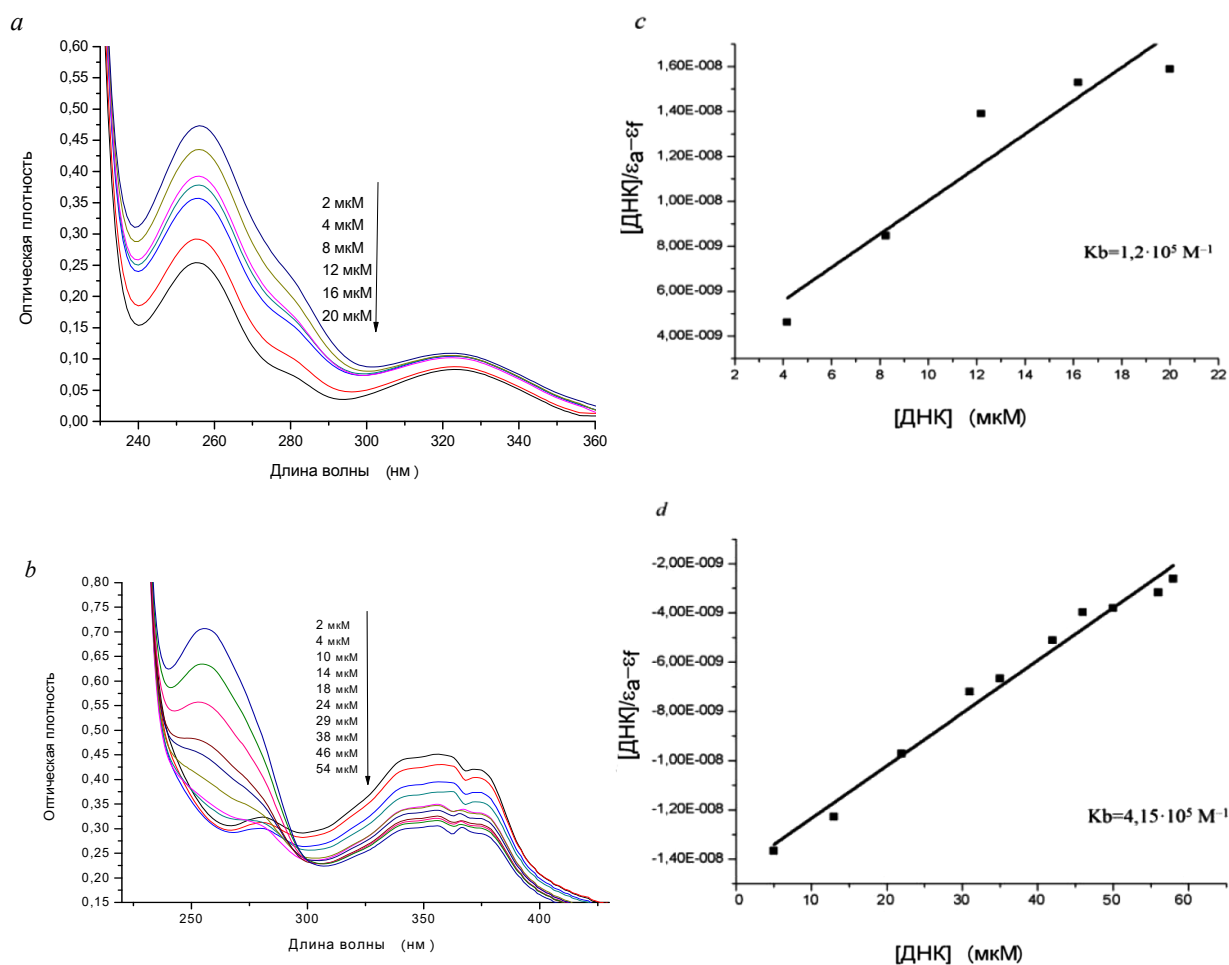


Рис. 4. Спектры поглощения и константы связывания с ДНК 2'-гидроксифлаванона и 2'HFTCH при различных концентрациях ДНК тимуса телянка: *a*, *b* – спектры поглощения 2'-гидроксифлаванона и 2'HFTCH соответственно; *c*, *d* – графики определения константы связывания с ДНК для 2'-гидроксифлаванона и 2'HFTCH соответственно. Время инкубации 10 мин. Стрелка показывает направление изменения оптической плотности при добавлении различных концентраций ДНК. Концентрация исследуемого флаваноида во всех пробах  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М.  $K_b$  – константа связывания с ДНК

Fig. 4. Absorption spectra and binding constant with CT-DNA of 2'-hydroxyflavanone and 2'HFTCH at varicose concentration of CT-DNA: *a*, *b* – absorption spectra of 2'-hydroxyflavanone and 2'HFTCH, respectively; *c*, *d* – plots of determination binding constant of CT-DNA for 2'-hydroxyflavanone and 2'HFTCH, respectively. Incubation time 10 minutes. The arrow shows the direction of the change wavelength when adding different concentration of CT-DNA. The concentration of the flavanoids in all of samples are  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M.  $K_b$  – binding constant with DNA

формы флаваноида) до 0,10905 (при максимальной концентрации ДНК 20 мкМ), а на спектре с 2'HFTCH оптическая плотность снизилась с 0,45087 (оптическая плотность несвязанной формы флаваноида) до 0,34686 (при максимальной концентрации ДНК 54 мкМ). Наблюдаемое изменение оптической плотности доказывает взаимодействие исследуемых флавоноидов с ДНК.

Константы связывания ( $K_b$ ) 2'-гидроксифлаванона и его производного на основе модификации Шиффа 2'HFTCH с ДНК определяли с помощью графиков, отражающих отношение  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  к  $[DNA]$  (рис. 4, *c*, *d*). Константа связывания с ДНК для 2'-гидроксифлаванона составила  $1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , а для производного на основе модификации Шиффа 2'HFTCH –  $4,15 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Более высокое значение  $K_b$  для 2'HFTCH свидетельствует о его более высоких ДНК-связывающих свойствах.

**Закключение.** Согласно полученным данным, 2'-гидроксифлаванон и его производное 2'HFTCH фотостабильны в ДМСО. Это является хорошим результатом, так как их химическая структура остается постоянной на протяжении всего эксперимента. Взаимодействие 2'-гидроксифлаванона

и его производного на основе модификации Шиффа 2'-НФТСН происходит по механизму интеркаляции. Изменение структуры молекулы 2'-гидроксифлаванона путем модификации Шиффа приводит к усилению ДНК-связывающих свойств. Таким образом, ДНК является мишенью в клетке для 2'-гидроксифлаванона и его производного на основе модификации Шиффа. Высокая аффинность связывания с ДНК 2'-гидроксифлаванона и его производных в форме модификации Шиффа может найти применение при разработке противоопухолевых и антимикробных лекарств.

### Список использованных источников

1. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans / T. Walle [et al.] // *J. Nutr.* – 2005. – Vol. 135, N 1. – P. 48–52. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.48>
2. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes / D. J. Dorta [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2005. – Vol. 152, N 2–3. – P. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.02.004>
3. Denny, B. J. Antagonistic interactions between the flavonoids hesperetin and naringenin and beta-lactam antibiotics against *Staphylococcus aureus* / B. J. Denny, P. W. West, T. C. Mathew // *Br. J. Biomed. Sci.* – 2008. – Vol. 65, N 3. – P. 145–147. <https://doi.org/10.1080/09674845.2008.11732819>
4. A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) study of the antioxidant activity of flavonoids / B. F. Rasulev [et al.] // *QSAR Combinatorial Sci.* – 2005. – Vol. 24, N 9. – P. 1056–1065. <https://doi.org/10.1002/qsar.200430013>
5. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma / A. P. Rogerio [et al.] // *Inflamm. Res.* – 2007. – Vol. 56, N 10. – P. 402–408. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7005-6>
6. 2'-Hydroxyflavanone effectively targets RLIP76-mediated drug transport and regulates critical signaling networks in breast cancer / L. D. Nagaprashantha [et al.] // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9, N 26. – P. 18053–18068. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24720>
7. Hegde, A. H. Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods / A. H. Hegde, S. N. Prashanth, J. Seetharamappa // *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis.* – 2012. – Vol. 63. – P. 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.034>
8. Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities / C. M. da Silva [et al.] // *J. Adv. Res.* – 2011. – Vol. 2, N 1. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.004>
9. Schiff bases as an antimicrobial agent / A. Rani [et al.] // *JBCS.* – 2015. – Vol. 2, N 1. – P. 62–91.
10. Chelating ability and biological activity of hesperetin Schiff base / E. Lodyga-Chruscinska [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2018. – Vol. 143. – P. 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.11.005>
11. Exploration of mode of binding of ctDNA with 3-hydroxyflavone: a contrast to the mode of binding with flavonoids having additional hydroxyl groups / J. Barnali [et al.] // *J. Phys. Chem.* – 2011. – Vol. 116, N 1. – P. 639–645. <https://doi.org/10.1021/jp2094824>
12. Physicochemical, antioxidant, DNA cleaving properties and antimicrobial activity of fisetin-copper chelates / E. Łodyga-Chruscińska [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2018. – Vol. 180. – P. 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.12.006>
13. Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA / A. M. Pyle [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – Vol. 111, N 8. – P. 3051–3058. <https://doi.org/10.1021/ja00190a046>
14. Interaction of chalcones with ct-dna by spectrophotometric analysis and theoretical simulations / X. Zarate [et al.] // *Química Nova.* – 2016. – Vol. 39, N 8. – P. 914–918. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160114>
15. Kumaramangalam, J. DNA/protein binding and cytotoxicity studies of copper(II) complexes containing N,N0,N00-trisubstituted guanidine ligands / J. Kumaramangalam, S. Nagamani, S. P. Nattamai // *RSC Advances.* – 2014. – Vol. 4, N 33. – P. 17179–17195. <https://doi.org/10.1039/c4ra01459f>

### References

1. Walle T., Browning A. M., Steed L. L., Reed S. G., Walle U. K. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *Journal of Nutrition*, 2005, vol. 135, no. 1, pp. 48–52. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.48>
2. Dorta D. J., Pigoso A. A., Mingatto F. E., Rodrigues T., Prado I. M. R., Helena A. F. C., Uyemura S. A., Santos A. C., Curti C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chemico-Biological Interactions*, 2005, vol. 152, no. 2–3, pp. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.02.004>
3. Denny B. J., West P. W., Mathew T. C. Antagonistic interactions between the flavonoids hesperetin and naringenin and beta-lactam antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*, 2008, vol. 65, no. 3, pp. 145–147. <https://doi.org/10.1080/09674845.2008.11732819>
4. Rasulev B. F., Abdullaev N. D., Syrov V. N., Leszczynski J. A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) study of the antioxidant activity of flavonoids. *QSAR & Combinatorial Science*, 2005, vol. 24, no. 9, pp. 1056–1065. <https://doi.org/10.1002/qsar.200430013>
5. Rogerio A. P., Kanashiro A., Fontanari C., da Silva E. V. G., Lucisano-Valim Y. M., Soares E. G., Faccioli L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research*, 2007, vol. 56, no. 10, pp. 402–408. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7005-6>

6. Nagaprashantha L. D., Singhal J., Li H., Warden Ch., Liu X., Horne D., Awasthi S., Salgia R., Singhal S. S. 2'-Hydroxyflavanone effectively targets RLIP76-mediated drug transport and regulates critical signaling networks in breast cancer. *Oncotarget*, 2018, vol. 9, no. 26, pp. 18053–18068. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24720>

7. Hegde A. H., Prashanth S. N., Seetharamappa J. Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, vol. 63, pp. 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.034>

8. Da Silva C. M., da Silva D. L., Modolo L. V., Alves R. B., de Resende M. A., Martins C. V. B., de Fátima Â. Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2011, vol. 2, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.004>

9. Rani A., Kumar M., Khare R., Tuli H. S. Schiff bases as an antimicrobial agent. *JBCS*, 2015, vol. 2, no. 1, pp. 62–91.

10. Lodyga-Chruscinska E., Symonowicz M., Sykula A., Bujacz A., Garribba E., Rowinska-Zyrek M. [et al.]. Chelating ability and biological activity of hesperetin Schiff base. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, vol. 143, pp. 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.11.005>

11. Barnali J., Sudipta S., Debanjana G., Debosreeta B., Nitin C. Exploration of mode of binding of ctDNA with 3-hydroxyflavone: a contrast to the mode of binding with flavonoids having additional hydroxyl groups. *Journal of Physical Chemistry*, 2011, vol. 116, no. 1, pp. 639–645. <https://doi.org/10.1021/jp2094824>

12. Łodyga-Chruscińska E., Pilo M., Zucca A., Garribba E., Klewicka E., Symonowicza M., Chruscinski L., Cheshev V. Physicochemical, antioxidant, DNA cleaving properties and antimicrobial activity of fisetin-copper chelates. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, vol. 180, pp. 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.12.006>

13. Pyle A. M., Rehmann J. P., Meshoyrer R., Kumar C. V., Turro N. J., Barton J. K. Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, vol. 111, no. 8, pp. 3051–3058. <https://doi.org/10.1021/ja00190a046>

14. Zarate X., Schott E., Escobar C. A., Lopez-Castro R., Echeverria C., Alvarado-Soto L., Ramirez-Tagle R. Interaction of chalcones with ct-dna by spectrophotometric analysis and theoretical simulations. *Química Nova*, 2016, vol. 39, no. 8, pp. 914–918. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160114>

15. Jeyalakshmi K., Selvakumaran N., Bhuvanesh N. S. P., Sreekanth A., Karvembu R. DNA/protein binding and cytotoxicity studies of copper(II) complexes containing N,N0,N00-trisubstituted guanidine ligands. *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no. 33, pp. 17179–17195. <https://doi.org/10.1039/c4ra01459f>

### Информация об авторах

*Королевич Виолетта Михайловна* – магистр биол. наук. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Брестская область, Республика Беларусь). E-mail: [Violetta.Korolevich@mail.ru](mailto:Violetta.Korolevich@mail.ru)

*Паулина Блажинска* – магистр хим. наук, аспирант. Лодзинский технический университет (ул. Стефановски, 4/10, 90-924, Лодзь, Польша). E-mail: [Paulina.blazinska@edu.p.lodz.pl](mailto:Paulina.blazinska@edu.p.lodz.pl)

*Анна Сыкула* – канд. хим. наук, доцент. Лодзинский технический университет (ул. Стефановски, 4/10, 90-924, Лодзь, Польша). E-mail: [Anna.sykula@p.lodz.pl](mailto:Anna.sykula@p.lodz.pl)

*Елизавета Лодыга-Хрущинска* – д-р хим. наук, профессор. Лодзинский технический университет (ул. Стефановски, 4/10, 90-924, г. Лодзь, Польша). E-mail: [Elalodyg@p.lodz.pl](mailto:Elalodyg@p.lodz.pl)

### Information about the authors

*Violetta M. Korolevich* – Master of Biology. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: [Violetta.Korolevich@mail.ru](mailto:Violetta.Korolevich@mail.ru)

*Paulina Blazińska* – Master of Chemistry, Postgraduate student. Lodz University of Technology (4/10, Stefanowskii Str., 90-924, Lodz, Poland). E-mail: [paulina.blazinska@edu.p.lodz.pl](mailto:paulina.blazinska@edu.p.lodz.pl)

*Anna Sykula* – Ph. D. (Chem.), Assistant Professor. Lodz University of Technology (4/10, Stefanowskii Str., 90-924, Lodz, Poland). E-mail: [anna.sykula@p.lodz.pl](mailto:anna.sykula@p.lodz.pl)

*Elżbieta Lodyga-Chruscińska* – D. Sc. (Chem.), Professor. Lodz University of Technology (4/10, Stefanowskii Str., 90-924, Lodz, Poland). E-mail: [elalodyg@p.lodz.pl](mailto:elalodyg@p.lodz.pl)

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 58.006  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-229-237>

Поступила в редакцию 30.09.2018  
Received 30.09.2018

**В. Н. Ильина<sup>1</sup>, И. З. Андреева<sup>2</sup>, Л. М. Абрамова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Самарский социально-педагогический университет, Самара, Российская Федерация

<sup>2</sup>Южно-Уральский ботанический сад-институт УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

## **СТРУКТУРА ЦЕНОТИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ *ADENOPHORA LILIFOLIA* (L.) A. DC. НА ЮЖНОМ УРАЛЕ И В СРЕДНЕМ ПОВОЛЖЬЕ**

**Аннотация.** С помощью стандартных методик изучены особенности онтогенетической и пространственной структуры ценотических популяций (ЦП) *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC., включенного в Красную книгу Самарской области (категория 3 – редкий вид), на особо охраняемых природных территориях разного ранга – в степной и лесостепной зонах Среднего Поволжья (Самарская область) и Южного Урала (Республика Башкортостан), а также в горной зоне Южного Урала.

Изученные ЦП расположены на опушках дубово-липовых, березовых, реже – кленово-липовых или осиновых лесов, редколесий или лесных колков. Общая плотность особей колеблется от 0,8 до 4,2 экз/м<sup>2</sup>. Генеративная фракция в популяциях составляет 81,1 %, прегенеративная – 19,3 % от общего числа особей. Базовый онтогенетический спектр *A. lilifolia* является центрированным. Хотя доля генеративных особей во всех ЦП высокая, распределение по онтогенетическим группам в двух регионах имеет свои особенности. Средние значения демографических индексов свидетельствуют о достаточно высокой стабильности популяций вида в Среднем Поволжье и на Южном Урале. По критерию «дельта-омега» большинство из 14 изученных ЦП *A. lilifolia* являются зрелыми, а кроме того, выявлены переходная и зреющие ЦП. На Южном Урале состояние популяций в целом достаточно благополучное. В Самарской области все изученные популяции испытывают высокую антропогенную нагрузку, а численность особей в конкретных местообитаниях невелика.

**Ключевые слова:** *Adenophora lilifolia*, особо охраняемая природная территория, Самарская область, Республика Башкортостан, возрастная структура, ценопопуляция, редкий вид, Красная книга, Среднее Поволжье, Южный Урал

**Для цитирования:** Ильина, В. Н. Структура ценотических популяций *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. на Южном Урале и в Среднем Поволжье / В. Н. Ильина, И. З. Андреева, Л. М. Абрамова // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 229–237. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-229-237>

**V. N. Ilina<sup>1</sup>, I. Z. Andreeva<sup>2</sup>, L. M. Abramova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Samara State University of Social Sciences and Education, Samara, Russian Federation

<sup>2</sup>South Ural Botanical Garden-Institute, Ufa Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

## **STRUCTURE OF CENOOTHIC POPULATIONS OF *ADENOPHORA LILIFOLIA* (L.) A. DC. IN THE SOUTHERN URALS AND THE MIDDLE VOLGA REGION**

**Abstract.** The study of rare plants at the level of cenothic populations throughout the range greatly contributes to the identification of the features of their biology and ecology. We carried out the identification of the features of the age and spatial structure of the *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. cenothic populations in the ecological conditions of the steppe, forest-steppe zones of the Middle Volga (Samara region) and the Southern Urals (Republic of Bashkortostan), as well as the mountainous zone of the Southern Urals. *Adenophora lilifolia* is included in the Red Book of the Samara region (category 3 – a rare species).

The study of *A. lilifolia* populations was carried out in different years on the territory of specially protected territories of different rank. In determining the structure of cenothic populations, standard techniques were used. The studied cenopopulations are located on the fringes of oak-lime, birch, less often maple-linden or aspen forests, sparse forests or forest potholes. The total density of individuals varies from 0.8 to 4.2 specimens/m<sup>2</sup>. The mean values of the generative fraction in the populations are 81.1 %, the prevalent fraction is 19.3 %. The basic ontogenetic spectrum of *A. lilifolia* is characterized as centered. Although the share of generative individuals in all cenopopulations is high, the distribution by ontogenetic groups in the two regions differs. The average values of demographic indices indicate a fairly high stability of the species populations. Of the 14 investigated cenopopulations of *A. lilifolia*, according to the “delta-omega” criterion, most are mature, in addition, transitional and maturing are identified. In general, the state of the populations in the Southern Urals is fairly prosperous. All studied populations in the Samara region have a high anthropogenic load, and the number of individuals in specific habitats is low.

**Keywords:** *Adenophora lilifolia*, specially protected natural area, Samara Region, Republic of Bashkortostan, age structure, cenopopulation, rare view, Red Book, The Middle Volga region, Southern Urals

**For citation:** Ilina V. N., Andreeva I. Z., Abramova L. M. Structure of cenothic populations of *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. in the Southern Urals and the Middle Volga region. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seryya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 229–237 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-229-237>

**Введение.** Изучение природных популяций редких растений в разных частях их эколого-географического ареала имеет важное значение, так как позволяет выявить или уточнить причины их редкой встречаемости, определить лимитирующие факторы и составить рекомендации по их охране в условиях антропогенного влияния на местообитания. В последние десятилетия такие работы проводятся нами как на Южном Урале [1–11], так и в Среднем Поволжье [12–18].

Сравнительный анализ структуры и состояния природных популяций редких представителей флоры представляет собой важный этап в деле сохранения биоразнообразия регионов [9–18]. Особый интерес в этом отношении вызывают редкие виды, находящиеся на краю ареалов [7, 10, 17]. В окраинных популяциях проявляются индивидуальные как морфологические, так и биологические особенности растений в связи с тем, что на границе ареала условия произрастания видов нетипичные и более сложные. Пограничные популяции отличаются внутренней организацией, структурой, экологической приуроченностью и некоторыми другими параметрами. Поэтому изучение популяций редких растений на краю ареала и сравнение их структуры с популяциями, находящимися в центральной его части, имеет важное биологическое значение.

Одним из редких растений является теневыносливый вид бубенчик лилиелистный *Adenophora lilifolia*, который имеет широкий географический ареал, включая Европу, Западную Сибирь, север Средней Азии. Он произрастает по опушкам, лесным полянам, разреженным лесам, кустарникам, поймам рек. В степной зоне данный вид произрастает на краю ареала [2].

*Adenophora lilifolia* включен в Красную книгу Самарской области (СО) [19] (категория 3 – редкий вид), под охраной он находится и в Саратовской области [20]. В СО он встречается как в Предволжье, так и в Заволжье (практически во всех административных районах, за исключением самых южных территорий, близких к условиям опустыненной степи). В Республике Башкортостан (РБ) он довольно обычен в горнолесной зоне Южного Урала, а в лесостепной и особенно в степной зоне встречается редко. *Adenophora lilifolia* ранее был включен в Красную книгу Башкирской АССР [21] и в список редких видов Южного Урала [22]. В последних изданиях Красной книги РБ [23, 24] вид исключен из «красного списка» как не нуждающийся в специальной охране.

Цель работы – изучение особенностей возрастной структуры ценопопуляций бубенчика лилиелистного (*Adenophora lilifolia* (L.) A. DC.) в экологических условиях степной, лесостепной и горной зон двух регионов – Среднего Поволжья и Южного Урала.

**Материалы и методы исследования.** *A. lilifolia* – стержнекорневой травянистый поликарпик высотой 50–100 см. Корень толстый, веретеновидный или редьковидный. Имеет симподиальные полурозеточные побеги [25]. Стебли прямые, простые или ветвистые, облиственные, продольно-полосатые, голые, реже – негустоволосистые. Листья голые или слегка опушенные по краям и жилкам мелкими волосками, прикорневые – с почковидно-сердцевидными пластинками, черешчатые, стеблевые – продолговато-яйцевидные, зубчатые или пильчато-зубчатые, 4–12 см длиной, бесчерешковые, верхние – более мелкие и узкие. Цветки поникающие, около 1,5 см длиной, собранные в многоцветковую пирамидальную метелку. Чашечка голая, доли ее узколанцетные, заостренные [26]. Венчик светло-голубой, колокольчатый, 5-лопастный, с 5 свободными тычинками и расширенными при основании нитями; столбик нитевидный, с трехраздельным рыльцем, выдается из венчика, при его основании имеется надпестичный и короткотрубчатый диск. Плод – обратногрушевидная коробочка, при созревании открывающаяся двумя отверстиями при основании. Семена яйцевидные, немного сплюснутые. Плоды созревают в августе – сентябре. Размножается семенами.

В Среднем Поволжье и на Южном Урале исследование популяций *A. lilifolia* осуществлялось в разные годы на особо охраняемых природных территориях разного ранга – от заповедников до памятников природы регионального значения, в том числе проектируемых [1–4, 19].

Онтогенез бубенчика лилиелистного описан нами ранее в условиях Южного Урала [1, 2, 4]. Для определения демографической структуры и плотности ценопопуляций (ЦП) в каждой из них на трансекте закладывалось 25 пробных площадок размером 1 м<sup>2</sup>. Порядок заложения (линейный или шахматный) и шаг трансекты (5 или 10 м) зависели от площади, занимаемой конкретной ЦП. Определялись ведущие популяционные характеристики, такие как плотность, возрастной состав, демографические показатели.

Возрастную структуру ЦП определяли согласно стандартным критериям [27–33, 35], учитывая следующие онтогенетические состояния особей: ювенильные (*j*), имматурные (*im*), виргинильные (*v*), молодые генеративные (*g*<sub>1</sub>), средние генеративные (*g*<sub>2</sub>), старые генеративные (*g*<sub>3</sub>), субсенильные (*ss*). На основании полученных данных был построен усредненный онтогенетический спектр ЦП.

Для характеристики онтогенетической структуры ЦП применяли общепринятые демографические показатели: индекс восстановления, индекс старения. Индекс восстановления рассчитывали по формуле  $I_v = (j + im + v)/(g_1 + g_2 + g_3)$  как соотношение числа потомков на одну генеративную особь в данный момент времени, а индекс замещения – по формуле  $I_z = (j + im + v)/(g_1 + g_2 + g_3 + ss + s + sc)$  как соотношение числа дочерних особей на одно взрослое растение особей взрослой части популяции, которое может заместить «подрост» ЦП.

Для оценки состояния ЦП был применен критерий «дельта-омега» Л. А. Животовского [34], основанный на совместном использовании индексов возрастности ( $\Delta$ ) [28] и эффективности ( $\omega$ ) [34].

**Результаты и их обсуждение.** Данные о локализации и краткая характеристика изученных ЦП *Adenophora lilifolia* приведены в табл. 1. В СО исследованиями были охвачены 1 заповедник федерального уровня, 3 региональных и 1 проектируемый памятник природы, в РБ – 1 заповедник, 3 проектируемых заказника, 1 региональный и 2 проектируемых памятника природы. Изученные ЦП расположены на опушках дубово-липовых, березовых, реже – кленово-липовых или осиновых лесов, редколесий или лесных колков в степной зоне.

Т а б л и ц а 1. Краткая характеристика местообитаний и плотность изученных ценопопуляций *Adenophora lilifolia*

Table 1. Brief description of habitats and density of studied *Adenophora lilifolia* cenothic populations

ЦП	Особо охраняемая природная территория	Местообитание	Плотность, экз/м <sup>2</sup>	Общее проективное покрытие травостоя, %
1 СО	Могутова гора (Самарская Лука, Жигули, Предволжье)	Дубово-липовый разреженный лес, склон северный, 10°, Государственный природный заповедник федерального значения	3,1	75
2 СО	Гора Зеленая (Высокое Заволжье)	Дубово-липовый лес с подростом клена платановидного, склон северо-западный, 5–7°, постпирогенные изменения, памятник природы регионального значения	1,4	50
3 СО	Камышлинская Мацеста (Высокое Заволжье)	Осинник крапиво-ясменниковый, под пологом леса, склон восточный, 3–5°, памятник природы регионального значения	4,2	80
4 СО	Дубовый древостой (Высокое Заволжье)	Дубово-липовый лес с бересклетом бородавчатым, под пологом леса, выровненный участок, выпас скота, памятник природы регионального значения	2,5	65
5 СО	Верховья р. Бинарадка (Низменное Заволжье)	Кленово-липовый лес с шиповником майским, склон северо-западный, 5–7°	2,7	60
1 РБ	Реветь (центральная часть Южного Урала)	Березово-липовый лес, склон горы, северный, 20°, Южно-Уральский государственный природный заповедник	2,5	70
2 РБ	Куркак (восточный макросклон Южного Урала)	Березовый лес, склон северный, 30°, ботанический памятник природы регионального значения	2,7	75
3 РБ	Кузгунташ (восточный макросклон Южного Урала)	Березовый лес, лесная поляна, склон восточный, 5°, комплексный памятник природы регионального значения	1,5	95
4 РБ	Ирендик (восточный макросклон Южного Урала)	Опушка березового леса, склон восточный, 20°	1,0	100

Окончание табл. 1

ЦП	Особо охраняемая природная территория	Местообитание	Плотность, экз/м <sup>2</sup>	Общее проективное покрытие травостоя, %
5 РБ	Аушкуль (лесостепное Зауралье)	Опушка березового леса и редколесье из березы, склон западный, 5°	0,8	90
6 РБ	Бусхангай (лесостепное Зауралье)	Опушка березового леса, слабый северо-западный склон, 1°	0,8	95
7 РБ	Аян (лесостепное Зауралье)	Березово-осиновый лес, степная колка, склон северо-западный, 1–5°	1,9	75
8 РБ	Тюлькюлитау (степное Зауралье)	Березово-осиновый лес, степная колка, опушка леса, слабый северо-восточный склон, 1°	1,0	70
9 РБ	Сукракские вишарники (степное Зауралье)	Березовое редколесье, степная колка, опушка леса, склон 5°, выровнено, ботанический памятник природы регионального значения	1,3	70

Общая плотность бубенчика в ЦП варьируется от 0,8 до 4,2 экз/м<sup>2</sup>. Максимальные значения показателей плотности выявлены у ЦП 3 СО (4,2 экз/м<sup>2</sup>), минимальные – у ЦП 5, 6 РБ (0,8 экз/м<sup>2</sup>).

Возрастная структура представляет собой один из существенных признаков популяции, который обеспечивает способность популяционной системы к самоподдержанию и определяет ее устойчивость [30]. Растения разных онтогенетических состояний потребляют ресурсы среды разными темпами. Вклад растений разных возрастных состояний в популяционную плотность соответствует их энергетической эффективности [33].

Возрастной состав в ЦП *A. lilifolia* представлен в табл. 2. Средние значения генеративной фракции составляли 81,1 %, прегенеративной – 19,3 %. Такой тип спектра отмечается, когда возобновительный процесс слабо выражен, а сенильный период не выявлен.

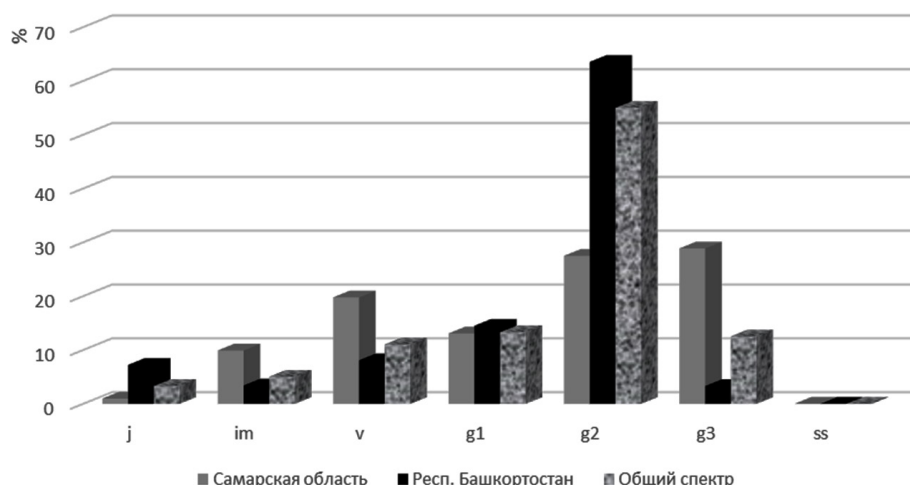
Таблица 2. Онтогенетический состав ценопопуляций *Adenophora lilifolia*Table 2. Ontogenetic composition of *Adenophora lilifolia* cenothic populations

ЦП	Онтогенетическая группа особей, %						
	<i>j</i>	<i>im</i>	<i>v</i>	<i>g</i> <sub>1</sub>	<i>g</i> <sub>2</sub>	<i>g</i> <sub>3</sub>	<i>ss</i>
1 СО	0	6,6	26,4	11,2	35,6	20,2	0
2 СО	0	13,2	26,5	14,6	20,6	25,1	0
3 СО	2,6	13,7	28,7	12,5	26,3	16,2	0
4 СО	0	10,2	11,5	15	29,8	33,5	0
5 СО	2,2	5,7	5,7	12	25,1	49,3	0
1 РБ	9,1	10,7	27,3	19,6	31,8	1,5	0
2 РБ	18,5	4,4	4,4	32,6	39,1	1,0	0
3 РБ	5,8	1,9	1,9	1,9	84,6	3,9	0
4 РБ	2,7	0	2,7	8,1	78,4	8,1	0
5 РБ	0	0	4,1	10,2	83,7	2,0	0
6 РБ	2,7	0	2,7	8,1	78,4	8,1	0
7 РБ	2,4	1,2	4,9	20,7	68,3	2,5	0
8 РБ	0	0	0	9,8	88,2	2,0	0
9 РБ	0	1,9	7,4	9,3	80,4	1,0	0
Среднее значение	3,3	5,0	11,0	13,3	55,0	12,5	0

Усредненный (базовый) онтогенетический спектр *A. lilifolia*, характеризующийся как центрированный (см. рисунок) с максимумом на средневозрастных генеративных особях, представляет растения всех возрастных состояний, кроме субсенильного и сенильного.

Онтогенетическая структура конкретных ЦП *A. lilifolia* имеет два типа спектра – левосторонний и центрированный, которые в разной степени отличаются от усредненного. Это зависит от экологических условий обитания, которые влияют на особенности прорастания семян и темпы развития особей в том или ином онтогенетическом состоянии. В ЦП 1–3 СО и 1 РБ хорошо





Базовые онтогенетические спектры ценопопуляций *Adenophora lilifolia* в Среднем Поволжье и на Южном Урале. По оси абсцисс – онтогенетическое состояние особей: *j* – ювенильное, *im* – имматурное, *v* – виргинильное, *g*<sub>1</sub> – молодое генеративное, *g*<sub>2</sub> – средневозрастное генеративное, *g*<sub>3</sub> – старое генеративное; по оси ординат – доля особей данного онтогенетического состояния, %

Basic ontogenetic spectra of *Adenophora lilifolia* cenoecological populations in the Middle Volga region and in the Southern Urals. On the abscissa axis – ontogenetic state: *j* – juvenile, *im* – immature, *v* – virginal, *g*<sub>1</sub> – young generative, *g*<sub>2</sub> – middle-aged generative, *g*<sub>3</sub> – old generative; on the ordinate axis – the proportion of individuals of this ontogenetic state, %

представлены имматурные, виргинильные особи, в ЦП 2 РБ – ювенильные, что свидетельствует об интенсивности возобновления. В СО эти ЦП расположены как в Предволжье (Жигулевская возвышенность), так и в Высоком Заволжье (отроги Бугульмино-Белебеевской возвышенности), в РБ – в центральной части горной зоны и на восточном макросклоне Южного Урала, где формируются благоприятные условия для произрастания этого теневоего вида. Максимально представлены средневозрастные особи (78,4–88,2 %) в ЦП 3–6, 8, 9 РБ, расположенных преимущественно в лесостепной и степной зонах, где условия для возобновления растений менее благоприятные. Несмотря на то что общая генеративность (доля генеративных особей) составляет 70–80 %, распределение по онтогенетическим группам в этих регионах имеет свои особенности (см. рисунок). В СО молодые генеративные растения составляют до около 13 % от численности ЦП, зрелые генеративные – около 27, старые генеративные – примерно 28 %. В РБ молодые генеративные особи занимают примерно те же позиции в ЦП – около 14 %, зрелых генеративных насчитывается более 63 %, а старых генеративных – чуть более 3 %. Установлено, что в РБ длительность онтогенеза бубенчика больше, чем в условиях СО, прежде всего это касается среднегенеративной стадии. В СО эколого-фитоценотические условия и антропогенная нагрузка способствуют более быстрому переходу зрелых генеративных особей в старогенеративные. Вероятно, течение старогенеративного состояния в условиях СО более продолжительное, и старогенеративные особи накапливаются в фитоценозах.

Демографические показатели изученных ЦП характеризуют их устойчивость. Средние значения индексов (табл. 3) свидетельствуют о стабильности ЦП: индекс замещения составил 0,29, индекс восстановления – 0,29, возрастность – 0,41, эффективность – 0,81. Однако в конкретных регионах данные параметры отличаются от усредненных. В СО индекс замещения почти в 2 раза выше и составляет 0,44, индекс восстановления имеет то же значение – 0,44, возрастность совпадает со средними значениями – 0,41, эффективность чуть ниже среднего показателя – 0,79. В РБ существенно ниже по сравнению с СО и усредненными показателями индексы замещения и восстановления (0,23), возрастность имеет почти те же значения (0,42), а эффективность несколько выше (0,87). Стабильность ЦП в РБ – 81 %, в СО – лишь 69 %, так как местообитания ЦП на Средней Волге испытывают большую антропогенную нагрузку по сравнению с южноуральскими.

Таблица 3. Демографическая характеристика ценопопуляций *Adenophora lilifolia*Table 3. Demographic characteristic of *Adenophora lilifolia* cenothic populations

ЦП	Тип ЦП	$I_z$	$I_n$	$\Delta$	$\omega$
1 СО	Зрелая	0,49	0,49	0,39	0,73
2 СО	Переходная	0,66	0,66	0,36	0,65
3 СО	Зреющая	0,82	0,82	0,32	0,64
4 СО	Зрелая	0,28	0,28	0,45	0,75
5 СО	Зрелая	0,16	0,16	0,53	0,77
1 РБ	Зреющая	0,89	0,89	0,26	0,62
2 РБ	Зреющая	0,38	0,38	0,30	0,69
3 РБ	Зрелая	0,11	0,11	0,46	0,91
4 РБ	Зрелая	0,06	0,06	0,48	0,92
5 РБ	Зрелая	0,04	0,04	0,47	0,95
6 РБ	Зрелая	0,06	0,06	0,48	0,92
7 РБ	Зрелая	0,09	0,09	0,42	0,89
8 РБ	Зрелая	0	0	0,48	0,97
9 РБ	Зрелая	0,10	0,10	0,44	0,92
Среднее значение		0,29	0,29	0,41	0,81

По критерию «дельта-омега» из 14 исследованных ЦП *A. lilifolia* большинство (10) являются зрелыми, кроме того, выявлены 1 переходная и 3 зреющие ЦП. Зреющие популяции характерны также для горной части РБ и отрогов (увалов) Бугульмино-Белебеевской возвышенности на территории СО, а в степной и лесостепной зонах РБ, в Предволжье и Низменном Заволжье СО доминируют зрелые популяции со средне- и старовозрастными растениями.

**Заключение.** Изучение 14 ценопопуляций бубенчика лилиелистного (*Adenophora lilifolia* (L.) A. DC.) на особо охраняемых территориях разного ранга в СО и РБ, расположенных в горной зоне Южного Урала и в лесостепной и степной зонах Зауралья и Средней Волги, показало, что плотность популяций в большинстве местообитаний вида невысокая – от 0,8 до 4,2 раст/м<sup>2</sup>. Усредненный (базовый) онтогенетический спектр *A. lilifolia* характеризуется как центрированный с абсолютным максимумом на средневозрастных генеративных особях; в нем представлены растения всех возрастных состояний, кроме постгенеративного. Однако в РБ онтогенетические спектры ЦП ближе к усредненному (базовому), а в СО отличаются от него в большей степени, что характерно для видовых популяций в центре и на краю ареала. Онтогенетическая структура конкретных ЦП *A. lilifolia* имеет два типа спектра – левосторонний и центрированный, которые в разной степени отличаются от усредненного. Из 14 ЦП выявлено 10 зрелых, 3 зреющих и 1 переходная. Наиболее благоприятные условия для произрастания вида формируются в центральной части горной зоны и на восточном макросклоне Южного Урала. В целом состояние популяций на Южном Урале достаточно благополучное и стабильное. Все изученные ЦП на территории СО испытывают значимую антропогенную нагрузку, поэтому их численность невелика. Вызывает опасение малочисленность популяций в степной зоне двух регионов, где мест с подходящими эколого-фитоценологическими условиями для произрастания данного вида значительно меньше, а его возобновление снижено.

#### Список использованных источников

1. Андреева, И. З. Онтогенез бубенчика лилиелистного (*Adenophora lilifolia* (L.) A. DC.) / И. З. Андреева // Онтогенетический атлас растений. – Йошкар-Ола, 2007. – Т. 5. – С. 110–114.
2. Андреева, И. З. Эколого-биологическая характеристика, химический состав и интродукция *Adenophora lilifolia* (L.) DC. на Южном Урале : дис. ... канд. биол. наук / И. З. Андреева / Оренбург. гос. пед. ун-т. – Уфа, 2008. – 180 л.
3. Абрамова, Л. М. Структура и состояние ценопопуляций *Aithaea officinalis* (Malvaceae) на юге Предуралья (Республики Башкортостан) / Л. М. Абрамова, О. А. Каримова, И. З. Андреева // Раст. ресурсы. – 2010. – Т. 46, № 4. – С. 47–54.
4. Андреева, И. З. Онтогенетическая и виталитетная структура ценопопуляций *Adenophora lilifolia* (L.) DC. на Южном Урале / И. З. Андреева, Л. М. Абрамова // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – Вып. 14/1. – № 3. – С. 198–202.

5. Каримова, О. А. Характеристика ценопопуляции и особенности биологии редкого вида *Thermopsis schischkini* (Fabaceae) на Южном Урале / О. А. Каримова, Л. М. Абрамова, Я. М. Голованов // Раст. ресурсы. – 2012. – Т. 48, № 4. – С. 518–530.
6. Характеристика ценопопуляций редких горно-скальных видов в Зауралье Республики Башкортостан / О. А. Каримова [и др.] // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. – 2013. – № 2. – С. 70–83.
7. Абрамова, Л. М. Оценка состояния краевых популяций некоторых редких видов растений Южного Урала / Л. М. Абрамова, О. А. Каримова, А. Н. Мустафина // Вестн. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 4. – С. 23–27.
8. Каримова, О. А. Современное состояние и виталитетная структура природных популяций редкого вида *Cephalaria uralensis* (Murr.) Schrad. ex Roem. et Schult. на Южном Урале / О. А. Каримова, А. Н. Мустафина, Л. М. Абрамова // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. – 2015. – № 3. – С. 27–39.
9. Сравнительный анализ структуры популяций *Hedysarum grandiflorum* (Fabaceae) в Самарской области и Республике Башкортостан / Л. М. Абрамова [и др.] // Раст. ресурсы. – 2016. – Т. 52, № 2. – С. 225–239.
10. Каримова, О. А. Современное состояние природных популяций редкого вида *Medicago cancellata* Bieb. в Республике Башкортостан / О. А. Каримова, А. Н. Мустафина, Л. М. Абрамова // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. – 2016. – № 3. – С. 43–59.
11. Андреева, И. З. Состояние ценопопуляций *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. на ООПТ Республики Башкортостан / И. З. Андреева, Л. М. Абрамова // Самар. Лука: проблемы регион. и глобал. экологии. – 2017. – Т. 26, № 4. – С. 215–218.
12. Ильина, В. Н. Характеристика растительных сообществ с участием редких копеечников (*Hedysarum* L., Fabaceae) / В. Н. Ильина, В. И. Матвеев // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 199–205.
13. Ильина, В. Н. Некоторые итоги изучения ценопопуляций адонисов весеннего и волжского (*Adonis vernalis* L. и *A. wolgensis* Stev.) в бассейне Средней Волги / В. Н. Ильина, С. В. Саксонов // Бюл. Гл. ботан. сада. – 2011. – Вып. 196. – С. 107–116.
14. Ильина, В. Н. О положении ценопопуляций копеечника Гмелина (*Hedysarum gmelinii* Ledeb.) в экологическом пространстве (в условиях бассейна Средней Волги) / В. Н. Ильина, Ю. А. Дорогова // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 1745–1749.
15. Родионова, Г. Н. Популяционные стратегии жизни избранных полукустарничков сем. Бобовые (Fabaceae) в условиях антропогенного пресса / Г. Н. Родионова, В. Н. Ильина // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 776–778.
16. Ильина, В. Н. Демографическая структура ценопопуляций *Oxytropis spicata* (Pall.) O. et B. Fedtsch. (Fabaceae) / В. Н. Ильина // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 98–104.
17. Ильина, В. Н. Онтогенетическая структура популяций *Atraphaxis frutescens* (L.) C. Koch (Polygonaceae) вблизи северной границы ареала (Самарская область) / В. Н. Ильина // Вестн. Удмурт. ун-та. Сер. Биология. Науки о Земле. – 2017. – Т. 27, № 3. – С. 271–277.
18. Особенности организации популяций редкого вида *Cephalaria uralensis* (Murr.) Schrad. ex Roem. et Schult (Dipsacaceae) в Заволжье и Предуралье / Л. М. Абрамова [и др.] // Поволж. экол. журн. – 2018. – № 1. – С. 3–15.
19. Красная книга Самарской области : в 2 т. / под ред. С. А. Сенатора, С. В. Саксонова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара : Изд-во Самар. гос. обл. акад. (Наяновой), 2017. – Т. 1 : Редкие виды растений и грибов / Е. Г. Бирюкова [и др.]. – 378 с.
20. Красная книга Саратовской области : грибы, лишайники, растения, животные / науч. ред. Г. В. Шляхтин. – Саратов : Изд-во Торгово-промышл. палаты Саратов. обл., 2006. – 526 с.
21. Красная книга Башкирской АССР. Редкие растения и животные. Проблемы их охраны / отв. ред. Е. В. Кучеров. – Уфа : Башкнигоиздат, 1984. – 199 с.
22. Кучеров, Е. В. Охрана редких видов растений на Южном Урале / Е. В. Кучеров, А. А. Мулдашев, А. Х. Галеева. – М. : Наука, 1987. – 203 с.
23. Кучеров, Е. В. Красная книга Республики Башкортостан / Е. В. Кучеров, А. А. Мулдашев, А. Х. Галеева. – Уфа : Китап, 2001. – Т. 1: Редкие и исчезающие виды высших сосудистых растений. – 273 с.
24. Красная книга Республики Башкортостан : в 2 т. / Л. М. Абрамова [и др.] ; под ред. Б. М. Миркина. – 2-е изд., доп. и переработ. – Т. 1 : Растения и грибы. – Уфа : МедиаПринт, 2011. – 384 с.
25. Шулькина, Т. В. Архитектурные модели в семействе *Campanulaceae* S. Str., их география и возможные пути преобразования / Т. В. Шулькина // Ботан. журн. – 1988. – Т. 73, № 1. – С. 3–16.
26. Олонова, М. В. Семейство *Campanulaceae* – Колокольчиковые // Флора Сибири = Flora Sibiriæ : в 14 т. / Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Центр. сиб. ботан. сад. – Новосибирск, 1990–2003. – Т. 12 : Solanaceae-Lobeliaceae / сост. А. В. Положий [и др.] ; под ред. А. В. Положий, Г. А. Пешковой. – Новосибирск, 1997. – С. 156–164.
28. Работнов, Т. А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах / Т. А. Работнов // Тр. Ботан. ин-та Акад. наук СССР. Сер. 3, Геоботаника. – 1950. – Вып. 6. – С. 7–204.
29. Уранов, А. А. Возрастной спектр фитоценопопуляции как функция времени и энергетических волновых процессов / А. А. Уранов // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. – 1975. – Вып. 2. – С. 7–34.
30. Ценопопуляции растений (основные понятия и структура) / Л. И. Воронцова [и др.]. – М. : Наука, 1976. – 214 с.
31. Заугольнова, Л. Б. Возрастная структура ценопопуляций многолетних растений и ее динамика / Л. Б. Заугольнова, О. В. Смирнова // Журн. общ. биол. – 1978. – Т. 39, № 6. – С. 849–857.
32. Жукова, Л. А. Популяционная жизнь луговых растений / Л. А. Жукова. – Йошкар-Ола : Ланар, 1995. – 224 с.

33. Глотов, Н. В. Об оценке параметров возрастной структуры популяций растений / Н. В. Глотов // Жизнь популяций в гетерогенной среде : материалы 2-го Всерос. популяц. семинара (16–20 февр. 1998 г., Йошкар-Ола, Марий Эл) : сб. : в 2 ч. / Марийск. гос. ун-т [и др.] ; под ред. Л. А. Жуковой [и др.]. – Йошкар-Ола, 1998. – Ч. 1. – С. 146–149.

34. Животовский, Л. А. Онтогенетические состояния, эффективная плотность и классификация популяций растений / Л. А. Животовский // Экология. – 2001. – № 1. – С. 3–7.

35. Жукова, Л. А. Многообразие путей онтогенеза в популяциях растений // Экология. – 2001. – № 3. – С. 169–176.

## References

1. Andreeva I. Z. Ontogenesis of the *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. *Ontogenetic Atlas of Plants. Vol. 5.* Yoshkar-Ola, 2007, pp. 110–114 (in Russian).

2. Andreeva I. Z. Ecological and biological characteristics, chemical composition and introduction of *Adenophora lilifolia* (L.) DC. in the southern Urals. Ph. D. Thesis. Ufa, 2008. 180 p. (in Russian).

3. Abramova L. M., Karimova O. A., Andreeva I. Z. The structure and state of *Althaea officinalis* (Malvaceae) coenopopulations in the south of the Pre-Urals (Republic of Bashkortostan). *Rastitel'nye resursy* [Plant resources], 2010, vol. 46, no. 4, pp. 47–54 (in Russian).

4. Andreeva I. Z., Abramova L. M. Ontogenetic and vitality structure of coenopopulation *Adenophora lilifolia* (L.) DC. in the Southern Urals. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki = Belgorod State University Scientific Bulletin. Series Natural Sciences*, 2011, iss. 14/1, no. 3 (98), p. 198–202 (in Russian).

5. Karimova O. A., Abramova L. M., Golovanov Ya. M. Characteristics of coenopopulation and biology features of a rare species *Thermopsis schischkini* (Fabaceae) in the Southern Urals. *Rastitel'nye resursy* [Plant resources], 2012, vol. 48, no. 4, pp. 518–530 (in Russian).

6. Karimova O. A., Zhigunov O. Yu., Golovanov Ya. M., Abramova L. M. Characteristics of coenopopulations of rare mountain-rock species in Zauraleye in the Republic of Bashkortostan. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*, 2013, no. 2, pp. 70–83 (in Russian).

7. Abramova L. M., Karimova O. A., Mustafina A. N. Assessment of the state of marginal populations of some rare plant species of the Southern Urals. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*, 2014, no. 4, pp. 23–27 (in Russian).

8. Karimova O. A., Mustafina A. N., Abramova L. M. The present state and the vital structure of natural populations of a rare species *Cephalaria uralensis* (Murr.) Schrad. ex Roem. et schult. in the Southern Urals. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*, 2015, no. 3 (31), pp. 27–39 (in Russian).

9. Abramova L. M., Il'ina V. N., Karimova O. A., Mustafina A. N. Comparative analysis of the structure of populations of *Hedysarum grandiflorum* (Fabaceae) in the Samara region and the Re-public of Bashkortostan. *Rastitel'nye resursy* [Plant resources], 2016, vol. 52, no. 2, pp. 225–239 (in Russian).

10. Karimova O. A., Mustafina A. N., Abramova L. M. The current state of natural populations of a rare species *Medicago cancellata* Bieb. in the Republic of Bashkortostan. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*, 2016, no. 3, pp. 43–59 (in Russian).

11. Andreeva I. Z., Abramova L. M. The state of coenopopulation *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. on the PAs of the Republic of Bashkortostan. *Samarskaya Luka: problemy regional'noi i global'noi ekologii* [Samarskaya Luka: problems of regional and global ecology], 2017, vol. 26, no. 4, pp. 215–218 (in Russian).

12. Il'ina V. N., Matveev V. I. The characteristics of plant communities with the participation of rare pennies (*Hedysarum* L., Fabaceae). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 2005, vol. 7, no. 1, pp. 199–205 (in Russian).

13. Il'ina V. N., Saksonov S. V. Some results of the study of coenopopulation *Adonis vernalis* L. and *A. wolgensis* Stev. in the Middle Volga basin. *Byulleten' Glavnogo botanicheskogo sada* [Bulletin of the Main Botanical Garden], 2011, iss. 196, pp. 107–116 (in Russian).

14. Il'ina V. N., Dorogova Yu. A. On the position of copepopulation of *Hedysarum gmelinii* Ledeb. in the ecological space (in the conditions of the Middle Volga basin). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 2012, vol. 14, no. 1, pp. 1745–1749 (in Russian).

15. Rodionova G. N., Il'ina V. N. Population life strategies of selected semi-shrubs Legumes (Fabaceae) under the conditions of an anthropogenic press. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 2013, vol. 15, no. 3, pp. 776–778 (in Russian).

16. Il'ina V. N. Demographic structure of coenopopulation *Oxytropis spicata* (Pall.) O. et B. Fedtsch. (Fabaceae). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 2015, vol. 17, no. 4, pp. 98–104 (in Russian).

17. Il'ina V. N. Ontogenetic structure of *Atraphaxis frutescens* (L.) C. Koch (*Polygonaceae*) populations near the northern boundary of the range (Samara region). *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Seriya "Biologiya. Nauki o Zemle" = Bulletin of Udmurt University. Series Biology. Earth Sciences*, 2017, vol. 27, no. 3, pp. 271–277 (in Russian).

18. Abramova L. M., Il'ina V. N., Mustafina A. N., Karimova O. A. Features of the organization of populations of a rare species *Cephalaria uralensis* (Murr.) Schrad. ex Roem. et Schult. (Dipsacaceae) in the Trans-Volga and Pre-Urals. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal = Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2018, no. 1, pp. 3–15 (in Russian).

19. Biryukova E. G., Bogdanova Ya. A., Burkova T. N., Vasyukov V. M., Golovlev A. A., Il'ina V. N., Il'ina E. D., Kavelenova L. M., Kalashnikova O. V., Kalmykova O. G. *Red Book of Samara Region. 2nd ed. Vol. 1. Rare plant and mushroom species*. Samara, Publishing house of the Samara State Regional Academy (Nayanova), 2017. 378 p. (in Russian).
20. Shlyakhtin G. V. (ed.). *The Red Book of the Saratov region: mushrooms, lichens, plants, animals*. Saratov, Publisher Chamber of Commerce of the Saratov region, 2006. 526 p. (in Russian).
21. Kucherov E. V. (ed.). *Red Book of the Bashkir Autonomous Soviet Socialist Republic. Rare plants and animals. Problems of their protection* Ufa, Bashkniigoizdat Publ., 1984. 199 p. (in Russian).
22. Kucherov E. V., Muldashev A. A., Galeeva A. Kh. *Protection of rare plant species in the Southern Urals*. Moscow, Nauka Publ., 1987. 203 p. (in Russian).
23. Kucherov E. V., Muldashev A. A., Galeeva A. Kh. *The Red Book of the Republic of Bashkortostan. Vol. 1. Rare and endangered species of higher vascular plants*. Ufa, Kitap Publ., 2001. 273 p. (in Russian).
24. Abramova L. M., Baisheva E. Z., Galeeva A. Kh., Elizav'eva O. A., Zhirnova T. V., Zhuravleva S. E. [et al.]. *The Red Book of the Republic of Bashkortostan. Vol. 1. Plants and mushrooms. 2nd ed.* Ufa, MediaPrint Publ., 2011. 384 p. (in Russian).
25. Shul'kina T. V. Architectural models in the Campanulaceae S. Str. Family, their geography and possible transformation paths. *Botanicheskii zhurnal* [Botanical journal], 1988, vol. 73, no. 1, pp. 3–16 (in Russian).
26. Olonova M. V. Campanulaceae Family – Bellflower. *Flora sibiriae. Volume 12. Solanaceae-Lobeliaceae*. Novosibirsk, 1997, pp. 156–164 (in Russian).
28. Rabotnov T. A. The life cycle of perennial herbaceous plants in meadow cenoses. *Trudy Botanicheskogo instituta Akademii nauk SSSR. Seriya 3. Geobotanika* [Proceedings of the Botanical Institute of the USSR Academy of Sciences. Series 3. Geobotany], 1950, iss. 6, pp. 77–204 (in Russian).
29. Uranov A. A. Age spectrum of phytocenopopulations as a function of time and energy wave processes. *Nauchnye doklady vysshei shkoly. Biologicheskie nauki* [Scientific reports of higher education. Biological sciences], 1975, iss. 2, pp. 7–34 (in Russian).
30. Vorontsova L. I., Gattsuk L. E., Egorova V. N., Ermakova I. M., Zhukova L. A., Zaugol'nova L. B. [et al.]. *Cenopopulation of plants (basic concepts and structure)*. Moscow, Nauka Publ., 1976. 214 p. (in Russian).
31. Zaugol'nova L. B., Smirnova O. V. The age structure of perennial plant coenopopulation and its dynamics. *Zhurnal obshchei biologii* [Journal of general biology], 1978, vol. 39, no. 6, pp. 849–857 (in Russian).
32. Zhukova L. A. *Population life of meadow plants*. Ioshkar-Ola, Lanar Publ. 224 p. (in Russian).
33. Glotov N. V. On estimation of parameters of the age structure of plant populations. *Zhizn' populyatsii v geterogennoi srede: materialy 2-go Vserossiiskogo populyatsionnogo seminara (16–20 fevralya 1998 goda, Ioshkar-Ola, Marii El): sbornik. Chast' 1* [Population life in a heterogeneous environment: materials of the 2nd All-Russian population seminar (February 16–20, 1998, Yoshkar-Ola, Mari El): collection. Pt. 1]. Yoshkar-Ola, 1998, pp. 146–149 (in Russian).
34. Zhivotovsky L. A. Ontogenetic States, Effective Density, and Classification of Plant Populations. *Russian Journal of Ecology*, 2001, vol. 32, no. 1, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1023/A:100953612>
35. Zhukova L. A. Diversity of ontogenetic pathways in plant populations. *Russian Journal of Ecology*, 2001, vol. 32, no. 3, pp. 151–158.

### Информация об авторах

*Ильина Валентина Николаевна* – канд. биол. наук, доцент. Самарский государственный социально-педагогический университет (ул. Максима Горького, 65/67, 443099, г. Самара, Российская Федерация). E-mail: siva@mail.ru

*Андреева Ирина Закиевна* – канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник. Южно-Уральский ботанический сад-институт Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ул. Менделеева, 195/3, 450080, г. Уфа, Российская Федерация). E-mail: aiz81@mail.ru

*Абрамова Лариса Михайловна* – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Южно-Уральский ботанический сад-институт Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ул. Менделеева, 195/3, 450080, г. Уфа, Российская Федерация). E-mail: abramova.lm@mail.ru

### Information about the authors

*Valentina N. Ilina* – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Samara State University of Social Sciences and Education (65/67, Maxim Gorky Str., 443099, Samara, Russian Federation). E-mail: siva@mail.ru

*Irina Z. Andreeva* – Ph. D. (Biol.), Junior researcher. South Ural Botanical Garden-Institute, Ufa Scientific Centre of Russian Academy of Sciences (195/3, Mendeleev Str., 450080, Ufa, Russian Federation). E-mail: aiz81@mail.ru

*Larisa M. Abramova* – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. South Ural Botanical Garden-Institute, Ufa Scientific Centre of Russian Academy of Sciences (195/3, Mendeleev Str., 450080, Ufa, Russian Federation). E-mail: abramova.lm@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 581.5; 502.13(1-751.1)(419)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-238-254>

Поступила в редакцию 03.01.2019

Received 03.01.2019

**И. П. Вознячук<sup>1</sup>, А. Б. Власова<sup>2</sup>, И. М. Степанович<sup>1</sup>, А. Т. Годнева<sup>3</sup>, В. Н. Решетников<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>3</sup>*Заповедник полевых цветов, Зеленый фонд, Иерусалим, Израиль*

## **ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ ПРИДОРОЖНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ВЫСОКОЙ БОТАНИЧЕСКОЙ И ЭСТЕТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ: ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ КОНЦЕПЦИИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ**

**Аннотация.** Сформулированы основные принципы развития новой для Беларуси системы озеленения с целью формирования (реставрации) устойчивых придорожных растительных сообществ высокой ботанической и эстетической ценности на основе использования методов сохранения, восстановления и внедрения декоративных видов природной флоры, характерных для конкретного региона. Положения концепции рекомендованы для дорог республиканского значения и апробированы на модельном участке (г. Мядель – курортный поселок Нарочь) автомагистрали Р28. Зарубежный опыт и оригинальные исследования показали, что вдоль дорог сохраняется высокий, в том числе адаптационный, потенциал природной флоры, способный при изменении режима кошения сформировать устойчивые растительные сообщества и повысить эстетику и выразительность ключевых элементов ландшафта придорожных территорий. Реализация стратегии предусматривает разработку ассортимента аборигенных видов растений, которые могут быть использованы при озеленении придорожных территорий с учетом их геоботанических и эдафических особенностей, создание банка семян травосмеси, формирование естественных генетических резерватов (полевых банков) луговой флоры для каждого геоботанического района или округа в целях сохранения и повышения общего экосистемного и генетического баланса. Атлас растений «Придорожные цветы», составленный для Национального парка «Нарочанский», может быть рекомендован для озеленения дорожных полос в границах Ошмянско-Минского геоботанического округа. Для расширения полученного положительного опыта по повышению биоразнообразия придорожных экосистем и снижения затрат на их содержание целесообразно внедрение данной стратегии на территории дорожной сети Беларуси. Это влечет за собой регулирование технологий управления придорожными экосистемами, направленное прежде всего на сохранение, восстановление и формирование естественных растительных сообществ, включая луговые и водно-болотные.

**Ключевые слова:** концепция, озеленение, придорожные полосы, декоративные виды природной флоры, сохранение биоразнообразия, сообщества высокой эстетической и ботанической ценности, Беларусь

**Для цитирования:** Вознячук, И. П. Формирование устойчивых придорожных растительных сообществ высокой ботанической и эстетической ценности: основные положения концепции и экспериментальное обоснование / И. П. Вознячук [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 238–254. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-238-254>

**I. P. Voznyachuk<sup>1</sup>, N. B. Vlasava<sup>2</sup>, I. M. Stepanovich<sup>1</sup>, A. T. Godneva<sup>3</sup>, V. N. Reshetnikov<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>3</sup>*Wildflowers Preserve, Green Fund, Jerusalem, Israel*

## **ESTABLISHING SUSTAINABLE ROADSIDE VEGETATION COMMUNITIES OF HIGH BOTANICAL AND AESTHETIC VALUE: THE BASIC CONCEPT STATEMENT AND EXPERIMENTAL JUSTIFICATION**

**Abstract.** The basic principles for the development of a new greening system for the region of Belarus aimed at creation and restoration of sustainable roadside plant communities of high botanical and aesthetic value are formulated on the basis of the use of conservation, restoration and “incorporation” methods of flowering native plant species, characteristic of a particular region. The statements of the concept are developed and recommended for roadways and highways in the Republic of Belarus and tested on the model site between the city of Myadel and the resort village of Naroch of Highway P28. Roadside vegetation management practices in other countries as well as our research has shown that along the investigated roads there is a high adaptive potential of native flora; by changing the mowing regime, sustainable plant communities can be established while enhancing the aesthetics and expressiveness of key elements of the landscape of the roadsides. The implementation of the strategy for each geobotanical region depends on the development of an assortment of native plant species that can be used for the greening of roadside areas. This should be done by taking into account their geobotanical and edaphic features,

creation of a seed bank for grass mixtures, the formation of natural genetic reserves (field banks) of meadow flora to conserve the local and overall ecosystem and genetic balance. For examples, the atlas of plants “Roadside flowers” developed for the National Park “Narochansky” is recommended for use in roadsides (verges) greening within the boundaries of the Oshmyany–Minsk geobotanical district. To expand the use of gained positive experience on increasing the biodiversity of roadside ecosystems and reducing the cost of their maintenance, it is desirable to implement this strategy for the entire road network of Belarus, which will require adjustment in technologies for managing roadside ecosystems, based on priorities of conservation, restoration and formation of native plant communities, including meadows and wetlands.

**Keywords:** concept, greening, roadside zone, flowering native plant species, biodiversity conservation, communities of high aesthetic and botanical value, Belarus

**For citation:** Voznyachuk I. P., Vlasava N. B., Stepanovich I. M., Godneva A. T., Reshetnikov V. N. Establishing sustainable roadside vegetation communities of high botanical and aesthetic value: the basic concept statement and experimental justification. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 238–254 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-238-254>

**Введение.** В настоящее время в мировой практике озеленения приоритеты сдвигаются в сторону сохранения естественных экосистем *in situ*. Благодаря многообразию составляющих видов, адаптированных в ходе совместной эволюции, естественные экосистемы способны к саморегуляции, развитию и самовосстановлению. Они поддерживают благоприятную для человека и его хозяйственной деятельности устойчивую среду с меньшими экономическими затратами.

В концепции формирования устойчивых придорожных растительных сообществ высокой ботанической и эстетической ценности (далее – Концепция) сформулированы и предложены к практической реализации основные принципы и направления стратегического развития системы озеленения придорожных экосистем, учитывающие современные подходы и методы оптимизации придорожной среды. Реализация Концепции способствует выполнению международных обязательств Республики Беларусь по природоохранным конвенциям [1–5], повышению эстетичности и выразительности ключевых элементов ландшафта придорожных территорий, снижению затрат человеческих и материальных ресурсов на обслуживание дорог при сокращении площади и частоты кошения придорожных полос, повышению биологического разнообразия и устойчивости придорожных экосистем, достижению экономического эффекта при сохранении и поддержании существующих качественных естественных растительных сообществ над восстановлением при их деградации и экологического эффекта при восстановлении редких природных экосистем.

**Актуальность разработки Концепции.** Среди экологических проблем современности сокращение разнообразия видов и трансформация природных экосистем занимает особое место. Наиболее уязвимы травянистые сообщества – основные компоненты луговых, прибрежно-водных и лугово-болотных экосистем. В результате изменения режима землепользования (прекращение кошения и выпаса скота) Беларусь теряет ежегодно 2–5, в отдельных случаях до 10–15 % площади естественных лугов. За последние 11 лет луга сократились на 506,1 тыс. га, или на 15,4 %, травяные болота – на 92,7 тыс. га, или на 10,1 % [6]. Сокращаются или исчезают вообще популяции «краснокнижных» видов растений, приуроченных к луговым сообществам. Необходимо осознать, что если в предстоящее десятилетие не будут предприняты эффективные меры по сохранению луговой растительности, то в недалеком будущем пополнится список редких видов и луговое разнообразие будет безвозвратно утеряно для Беларуси, расположенной в лесной природной зоне.

Беларусь располагает разветвленной сетью дорог общей протяженностью 86,6 тыс. км, в том числе 15,7 тыс. км дорог магистрального и 70,9 тыс. км дорог республиканского назначения, вдоль которых благодаря организации дорожными службами регулярного сезонного многократного кошения сохранились значительные площади травянистых сообществ. К сожалению, основная цель установленного кошения – поддержание травостоя на определенной высоте, что, как правило, приводит к разрушению естественных сообществ с присущим им разнообразием растительного и животного мира. А ведь именно придорожные полосы, пересекающие различные экосистемы, могут являться убежищем для многих видов растений луговой флоры, в том числе редких и исчезающих, а при надлежащем уходе стать рефугиумом их сохранения. Кроме того, при прокладке новых дорог, в результате чего происходит трансформация рельефа, почв и растительного покрова, мероприятия по уходу должны включать оптимизацию прилегающих ландшафтов, включая

посев (подсев) и посадку (подсадку) растений, и лучше если это будет сделано из местных декоративных видов природной флоры.

Цель Концепции – разработка научно обоснованной стратегии формирования вдоль дорог флористических ландшафтов высокой ботанической и эстетической ценности на основе использования методов сохранения, восстановления и внедрения цветущих видов природной флоры с сохранением общего экосистемного и генетического баланса каждого региона в отдельности.

Приоритетные задачи, на решение которых направлена Концепция:

разработка практических рекомендаций по содержанию придорожных территорий с целью сохранения и формирования растительных сообществ природной декоративной флоры и получения экономического эффекта путем снижения затрат человеческих и материальных ресурсов на обслуживание дорог при сокращении площади и частоты кошения придорожных полос;

разработка ассортимента аборигенных видов растений (в том числе редких и охраняемых), создание естественных генетических резерватов растительных сообществ и питомников по выращиванию (размножению) видов природной флоры, а также создание условий для восстановления редких природных растительных сообществ;

повышение биоразнообразия придорожных полос с привлечением локального генофонда аборигенных видов, характерных для отдельных регионов, создание резерватов луговой и водно-болотной флоры (*in situ* полевые банки, *ex situ* семенные банки и т. д.), повышение устойчивости придорожных сообществ и предотвращение инвазий;

повышение значимости природной флоры в общественном сознании.

**Объекты и методы исследования.** Данная Концепция предложена впервые в Беларуси и рекомендована для дорог республиканского значения. Начиная с 2016 г. Концепция апробирована на модельном участке (окраина г. Мядель – поворот на курортный поселок Нарочь) автомагистрали Р28, проходящей через Национальный парк «Нарочанский», который относится к Ошмянско-Минскому округу подзоны дубово-темнохвойных подтаежных лесов (общая протяженность маршрута – 12 км) (рис. 1).

Дорога Р28 (Минск – Молодечно – Нарочь) по уровню предъявляемых требований относится к третьей категории («Республиканские автомобильные дороги, не отнесенные к уровням требований 1 и 2, соединяющие, как правило, административные центры районов между собой по одному из направлений...» [7]).



Рис. 1. Местоположение ключевых участков: 1 – «Симоны» (0,5 км южнее д. Симоны Мядельского р-на Минской обл., вдоль автомобильной дороги Р28, GPS-координаты: 54.90055 с. ш., 26.75095 в. д.); 2 – «Теляки» (0,8 км южнее д. Теляки, 54.88847 с. ш., 26.79305 в. д.); 3 – «Микольцы» (0,1 км южнее д. Микольцы, 54.87987 с. ш., 26.86481 в. д.); 4 – «Минчаки» (0,5 км юго-восточнее д. Минчаки, 54.8874 с. ш., 26.89833 в. д.)

Fig. 1. The location of key points: 1 – “Simany” (0.5 km south of the village (v) of Simany, Myadelsky district, Minsk Region, along the P28 highway, GPS coordinates: 54.90055 N, 26.75095 E); 2 – “Telyaki” (0.8 km south of v. Telyaki, 54.88847 N, 26.79305 E); 3 – “Mikoltsy” (0.1 km south of v. Mikoltsy, 54.87987 N, 26.86481 E.); 4 – “Minchaki” (0.5 km southeast of v. Minchaki, 54.8874 N, 26.89833 E)



Для определения эстетического и ботанического потенциалов придорожных экосистем были заложены 4 ключевых участка (далее – КУ) в различных экспозициях дороги: «нулевая отметка» (разница между высотой полотна дороги и правой стороной обочины в пределах 1 м) представлена КУ-1 «Симоны» (рис. 2), «выемка» (поверхность полотна дороги расположена ниже 1 м относительно правой стороны обочины) – КУ-2 «Теляки» и КУ-4 «Минчаки» (рис. 3), «насыпь» (поверхность полотна дороги расположена выше 1 м относительно правой стороны обочины) – КУ-3 «Микольцы» (рис. 4).

На каждом КУ вдоль линии эколого-фитоценотического профиля (ЭФП) заложены по две постоянные пробные площадки (ППП) размером 10×10 м. Вдоль ЭФП фиксировали все фитоценотические различия, отнесенные к определенному рангу синтаксонов (ассоциации и субассоциации) системы Й. Браун–Бланке [8], что отражено на рис. 2–4.

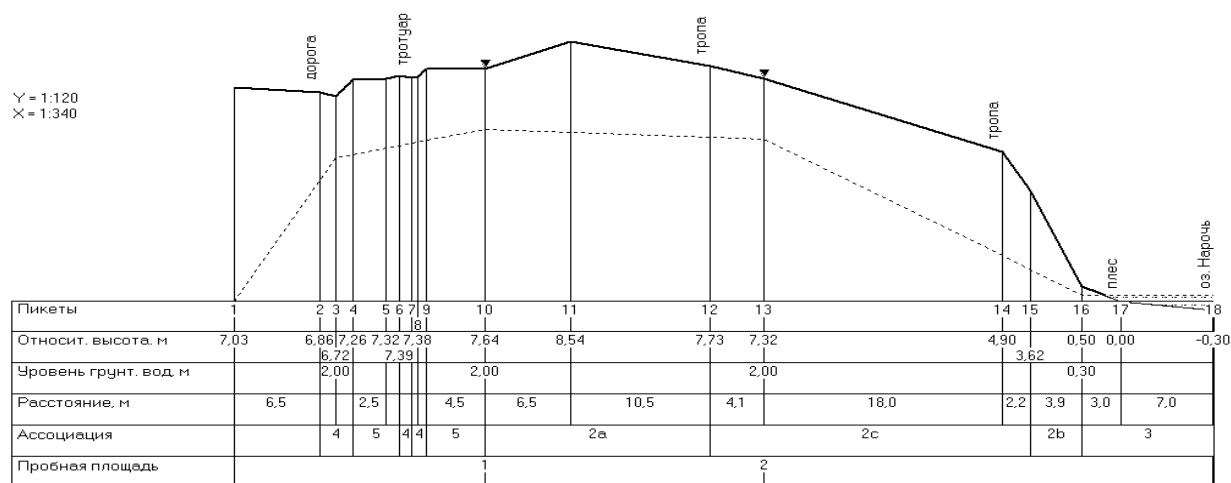


Рис. 2. Эколого-фитоценотический профиль придорожной полосы при прохождении дороги в экспозиции «нулевая отметка». Ассоциации (здесь и далее названия синтаксонов даны по сводке [8]): 1 – *Phragmitetum communis* (subass. *Ph. c. typicum*); 2 – *Festucetum rubrae* (subass.: a – *F. r. dactylidetosum glomeratae*; b – *F. r. galietosum mollugi*; c – *F. r. calamagrostidetosum epigeji*); 3 – *Salicetum fragilis* (subass. *S. f. phragmitetosum australis*); 4 – *Lolio-Plantaginetum majoris* (subass. *L.-P. m. polygonetosum aviculari*); 5 – *Convolvulo arvensis–Agropyretum repentis* (subass. *C. a.–A. r. medicagetosum lupulinae*)

Fig. 2. Ecological and phytocenotic profile of the roadside at the “zero mark” exposition. Plant associations (the names of the syntaxons are given according [8]): 1–5 (see above)

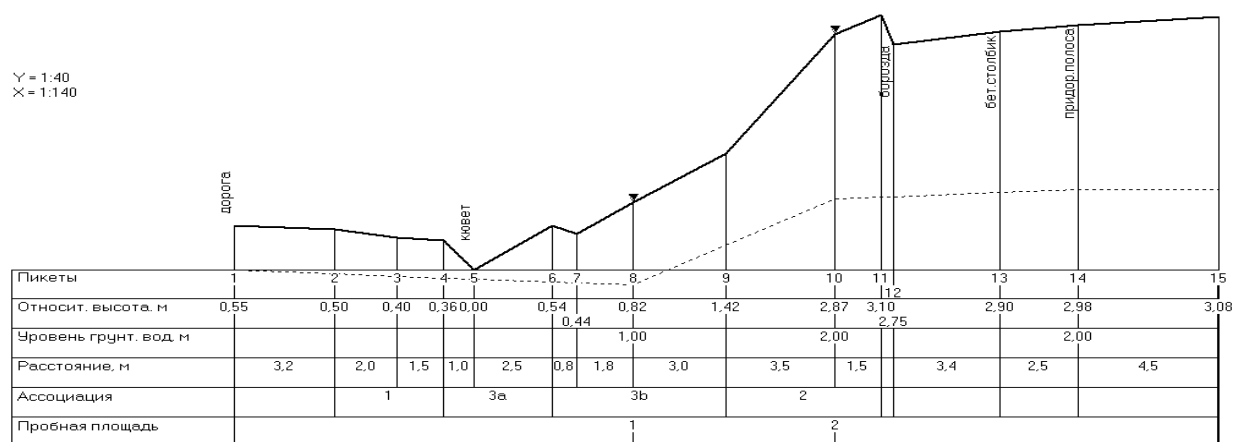


Рис. 3. Эколого-фитоценотический профиль придорожной полосы при прохождении дороги в экспозиции «выемка». Ассоциации: 1 – *Lolio-Plantaginetum majoris* (subass. *L. – P. m. potentilletosum anserinae*); 2 – *Poetum ngustifoliae* (subass. *P. a. fragarietosum viridis*); 3 – *Calamagrostidetum epigeji* (subass.: a – *C. e. poetosum angustifoliae*; b – *C. e. piloselletosum officinari*); 4 – полоса из *Picea abies*

Fig. 3. Ecological and phytocenotic profile of the roadside at the “notch” exposition. Plant associations: 1–4 (see above).

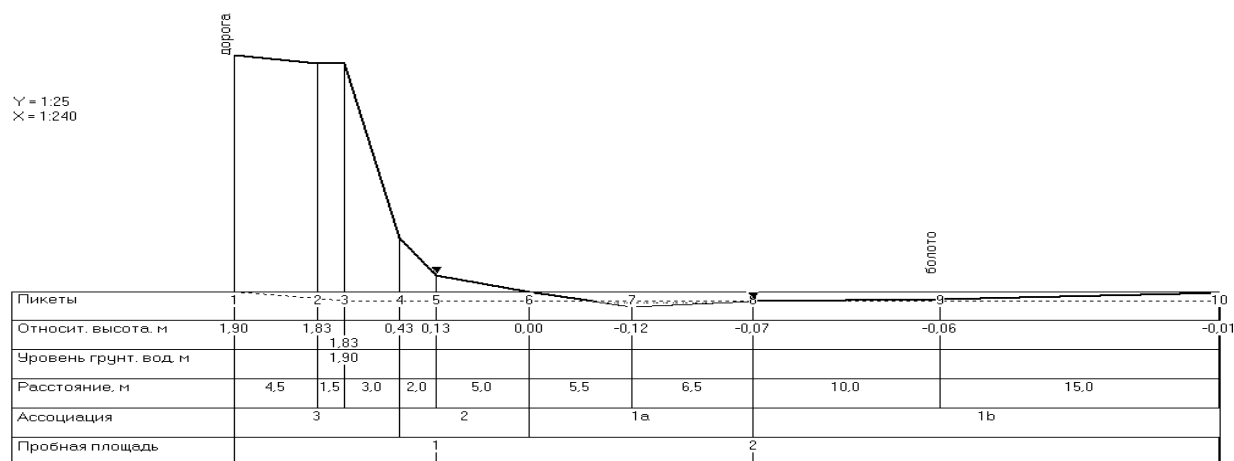


Рис. 4. Эколого-фитоценогический профиль придорожной полосы при прохождении дороги в экспозиции «насыпь». Ассоциации: 1 – *Typhetum latifoliae* (subass.: a – *T. l. menyanthetosum trifoliatae*; b – *T. l. typicum*); 2 – *Scirpetum silvatici* (subass. *S. s. lysimachietosum vulgaris*); 3 – *Dactylidetum glomeratae* (subass. *D. g. festucetosum rubrae*)

Fig. 4. Ecological and phytocenotic profile of the roadside at the “body of road” exposition. Plant associations: 1–3 (see above)

Графическое построение ЭФП выполнено с помощью компьютерной программы PROFIL. С использованием отработанной методики [9] дано полное геоботаническое описание фитоценозов на 8 ППП, изучены почвенно-гидрологические условия. Описание растительного покрова приведено для разных периодов вегетации: весеннего (конец мая), летнего (начало – середина июля) и осеннего (начало сентября). Декоративность растений определена по литературным источникам [10–12] и оригинальным наблюдениям. Учитывались внешний вид (привлекательность) до и после цветения, продолжительность цветения, адаптационная способность к условиям произрастания (жизненность).

**Результаты и их обсуждение.** Интерес к обочинам дорог как среде сохранения природных видов растений и животных зародился в США и Северной Европе и начал активно развиваться в 1970–1990-х годах. Пионерные эксперименты, проведенные на придорожных территориях, впоследствии переросли в целое движение. Согласно результатам проведенных в Англии исследований, более 800 видов природной флоры (более 40 % от всех видов растений Британских островов, включая редкие) встречаются вдоль обочин дорог. При повышении биоразнообразия природной флоры и устойчивости экосистем вдоль дорог отмечаются достоверный рост активности опылителей [13, 14], снижение численности инвазионных видов растений, в том числе крайне агрессивных [15]. Комиссией Природного Наследия Шотландии составлены детальные рекомендации по эффективному управлению биоразнообразием вдоль обочин [16]. Успешные примеры реализации проектов по реставрации и восстановлению экосистем придорожных территорий с использованием природных видов растений осуществлены в Англии, США, Нидерландах, Польше, Австралии и др. [17–21]. В ряде работ [13–19, 22] отмечается, что увеличение биологического разнообразия, повышение эстетической и ботанической ценности придорожных экосистем является важной природоохранной целью и повышает общее благосостояние регионов. В последнее время обсуждается вопрос оптимизации режима кошения в целях повышения биоразнообразия растительного и животного мира [14, 21, 23–25]. Одним из основных документов США, направленных на формирование данной стратегии, является разработанный Департаментом транспорта “Roadside use of native plants” [26], который включает основные положения стратегии на территории США и списки видов для каждого из 50 штатов в отдельности.

В последние десятилетия на фоне активного развития дорожной сети Беларуси проведены исследования по изучению влияния дорог на придорожные растительные сообщества. Так, установлено, что качество природной среды, скорость трансформации и характер последствий определяются в основном двумя группами факторов: комплексом антропогенного воздействия (масштабом, структурой и режимом загрязнения) и природными условиями, способными усилить

или ослабить это воздействие. При этом флористическое разнообразие и специфика различных типов растительности определяются следующими показателями: категорией дороги (магистральные, республиканские, местные), зональным районированием, различиями почвенно-грунтовых условий, эколого-фитоценотическими особенностями прилегающих биотопов, а также спецификой и интенсивностью хозяйственного использования земель. Эколого-фитоценотические особенности придорожных полос в значительной степени определяются экспозицией дороги, которая влияет на водный режим и физико-химические характеристики почв [27–31].

Расчет данных о прохождении автомагистрали в различной экспозиции на маршруте исследования показал, что основная доля (51,9 % от всей продолжительности маршрута) приходится на «нулевую отметку», «насыпь» составляет 34,1 %, «выемка» – 14 %. При прохождении дороги в экспозиции «нулевая отметка» травянистые сообщества представлены видами широкого спектра экологических ниш – от мезогигрофитов до ксеромезофитов, в зависимости от характера подстилающей поверхности (табл. 1). При прохождении в экспозиции «выемка» придорожные растительные сообщества представлены ксеромезофитным, реже мезофитным травяным покровом. Многие виды растений здесь приспособлены к обитанию в среде с недостаточным или более-менее достаточным, но не избыточным увлажнением почвы (табл. 2). Доля видов различных экологических ниш определяется эдафическими характеристиками экотопа, экспозицией склона относительно сторон горизонта и углом его наклона относительно дороги. При прохождении дороги в экспозиции «насыпь» формируется растительность из мезогигрофитов, гигромезофитов и даже гидрофитов (табл. 3).

Таблица 1. Список видов, составляющих эстетический потенциал придорожной растительности вдоль автомагистрали Р28 на отрезке дороги г. Мядель – курортный поселок Нарочь (по состоянию на 2017 г.), проходящей относительно прилегающих территорий в экспозиции «нулевая отметка» (КУ-1 «Симоны»)

Table 1. List of species forming the aesthetic potential of roadside vegetation along the P28 highway in the segment Myadel – the resort v. Naroch (by 2017) with the passage of the road relative to the adjacent territories in the “zero point” exposition

Название растения*	Средняя высота, м	Фенофаза	Жизненность, балл	Проективное покрытие, %	Обилие**	Декоративность	Сроки высокой декоративности	Происхождение
<i>Achillea millefolium</i>	0,65	Цв	4	7	Sp	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Ajuga genevensis</i>	0,48	Цв	4	+	Rg	Высокая	Конец мая – начало июня	Ест.
<i>Ajuga reptans</i>	0,3	Цв	4	+	Rg	Средняя	Июнь	Ест.
<i>Anthemis tinctoria</i>	0,5	Цв	4	1	Sol	Высокая	Конец июня – начало августа	Культ. (из ест.)
<i>Arrhenatherum elatior</i>	0,9	Цв	5	12	Sp	Высокая	Конец мая – начало июня	Ест. (инв.)
<i>Betonica officinalis</i>	0,51	Цв	3	+	Rg	Высокая	Конец июня – начало августа	Культ. (из ест.)
<i>Briza media</i>	0,6	Пл	4	8	Sp	Высокая	Конец июня – июль	Ест.
<i>Campanula patula</i>	0,65	Цв	4	+	Un	Высокая	Конец июня – начало августа	Ест.
<i>Campanula lomerata</i>	0,6	Цв	4	+	Rg	Высокая	Конец июня – июль	Ест.
<i>Centaurea scabiosa</i>	1,2	Цв	5	20	Sp	Высокая	Июль	Ест.
<i>Cichorium intybus</i>	0,8	Цв	4	+	Rg	Высокая	Июнь–август	Ест.
<i>Convallaria majalis</i>	0,25	Цв	3	3	Sol	Средняя	Июнь	Ест.
<i>Convolvulus arvensis</i>	0,7	Цв	4	4	Sol	Высокая	Июль – начало августа	Ест.
<i>Dactylis glomerata</i>	1,25	Бут–цв	4	5	Sp	Средняя	Июнь – начало июля	Ест.
<i>Echium vulgare</i>	0,52	Пл	4	+	Rg	Высокая	Конец июня – июль	Ест.
<i>Festuca rubra</i>	0,65	Бут–пл	4	10	Sp	Средняя	Июнь–июль	Ест.
<i>Fragaria viridis</i>	0,15	Цв–пл	4	21	Сop <sub>1</sub>	Средняя	Конец июня – июль	Ест.

Окончание табл. 1

Название растения*	Средняя высота, м	Фенофаза	Жизненность, балл	Проективное покрытие, %	Обилие**	Декоративность	Сроки высокой декоративности	Происхождение
<i>Galium mollugo</i>	0,8	Цв	4	25	Cop <sub>1</sub>	Высокая	Конец июня – начало августа	Ест.
<i>Hypericum perforatum</i>	0,5	Цв	4	1	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.
<i>Juniperus communis</i>	2,3	Вер–пл	5	1	Sol	Очень высокая	Весь год	Ест.
<i>Knautia arvensis</i>	0,85	Цв	4	5	Sp	Высокая	Конец июня – июль	Ест.
<i>Leucanthemum vulgare</i>	0,55	Цв	4	1	Sol	Высокая	Конец июня – июль	Ест.
<i>Linaria vulgaris</i>	0,3	Цв	4	+	Rr	Средняя	Июль–август	Ест.
<i>Malus sylvestris</i>	0,8	Вер	4	1	Sol	Средняя	Середина мая – начало июня	Ест.
<i>Medicago falcata</i>	0,7	Цв	5	30	Cop <sub>1</sub>	Высокая	Июнь–июль	Ест.
<i>Melilotus albus</i>	1,1	Цв	4	1	Sol	Средняя	Июль	Ест.
<i>Melilotus officinalis</i>	0,95	Цв	4	4	Sol	Высокая	Июль	Ест.
<i>Peucedanum oreoselinum</i>	0,9	Цв	4	1	Sol	Средняя	Июль	Ест.
<i>Picea abies</i>	0,7	Вер	4	3	Sol	Высокая	Весь год	Ест.
<i>Pilosella officinarum</i>	0,15	Вер	4	17	Sp	Высокая	Конец мая – начало июня	Ест.
<i>Pimpinella saxifraga</i>	0,6	Вер	4	2	Sol	Средняя	Июль	Ест.
<i>Plantago media</i>	0,45	Цв	4	+	Rr	Высокая	Середина июня – начало июля	Ест.
<i>Polygala comosa</i>	0,1	Цв	4	3	Sol	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Ranunculus polyanthemos</i>	0,7	Цв	4	3	Sol	Высокая	Июнь–июль	Ест.
<i>Rosa canina</i>	0,4	Цв	4	+	Rr	Средняя	Середина июня – июль	Ест.
<i>Sedum acre</i>	0,1	Цв	4	1	Sol	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Solidago virgaurea</i>	0,83	Цв	4	+	Rr	Средняя	Конец июня – июль	Ест.
<i>Sorbus aucuparia</i>	1,5	Вер–пл	4	+	Rr	Средняя	Май–октябрь	Ест.
<i>Tragopogon pratensis</i>	1,0	Пл	5	+	Rr	Средняя	Середина июня – начало июля	Ест.
<i>Trifolium arvense</i>	0,2	Цв	4	2	Sol	Средняя	Конец июня–июль	Ест.
<i>Trifolium medium</i>	0,5	Цв–пл	4	20	Sp	Средняя	Конец июня – начало августа	Ест.
<i>Trifolium montanum</i>	0,5	Цв	5	7	Sp	Высокая	Конец июня–июль	Ест.
<i>Trifolium pratense</i>	0,4	Цв	4	1	Sol	Средняя	Конец июня–июль	Ест.
<i>Tripleurospermum inodorum</i>	0,6	Цв	4	+	Rr	Средняя	Конец июня–начало августа	Ест.
<i>Verbascum lychnitis</i>	1,3	Цв	4	1	Sol	Высокая	Июль – середина августа	Ест.
<i>Verbascum nigrum</i>	0,9	Цв	5	4	Sol	Средняя	Июль – начало августа	Ест.

Примечание. \* – здесь и далее названия видов сосудистых растений даны по С. К. Черепанову [32]; \*\* – обилие видов определено по усовершенствованной шкале О. Друде: Un (unicum) – растения представлены одной особью; Rr (rari) – растения встречаются единично; Sol (solitariae) – растения встречаются редко; Sp (sparsae) – растения встречаются в небольшом количестве, рассеянно; Cop<sub>1-3</sub> (copiosae) – растения представлены большим количеством особей; Soc (sociales) – растения образуют фон, наземные части их смыкаются; знак «+» обозначает покрытие менее 1 %.

Т а б л и ц а 2. Список видов, составляющих эстетический потенциал придорожной растительности вдоль автомагистрали Р28 на отрезке дороги г. Мядель – курортный поселок Нарочь (по состоянию на 2017 г.), проходящей относительно прилегающих территорий в экспозиции «выемка» (КУ-2 «Теляки»)

Table 2. List of species forming the aesthetic potential of roadside vegetation along the P28 highway in the segment Myadel – the resort v. Naroch (by 2017) with the passage of the road relative to the adjacent territories in the “cut” exposition

Название растения	Средняя высота, м	Фенофаза	Жизненность, балл	Проективное покрытие, %	Обилие	Декоративность	Сроки высокой декоративности	Происхождение	Статус охраны, категория
<i>Acer platanoides</i>	0,7	Вег	4	1	Sol	Высокая	Май–октябрь	Ест.	
<i>Achillea millefolium</i>	0,6	Цв	4	5	Sp	Средняя	Июнь–август	Ест.	
<i>Agrimonia eupatoria</i>	0,7	Цв	4	3	Sol	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Allium angulosum</i>	0,35	Бут–цв	4	5	Sp	Средняя	Середина июня – июль	Ест.	
<i>Anemone sylvestris</i>	0,35	Бут–цв	4	3	Sol	Средняя	Июнь	Ест.	Охр. IV
<i>Anthemis tinctoria</i>	0,42	Цв	4	1	Sol	Высокая	Конец июня – начало августа	Ест.	
<i>Arrhenatherum elatius</i>	0,9	Цв–пл	5	30	Сор <sub>1</sub>	Высокая	Конец мая – начало июня	Ест. (инв.)	
<i>Betonica officinalis</i>	0,3	Цв	3	1	Sol	Высокая	Конец июня – начало августа	Кульг. (из ест.)	
<i>Betula pendula</i>	8,0	Вег	4	5	Sp	Высокая	Весь год	Ест.	
<i>Briza media</i>	0,5	Цв–пл	4	16	Sp	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Campanula glomerata</i>	0,5	Цв	4	1	Sol	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Campanula trachelium</i>	0,55	Цв	4	1	Sol	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Carex ornitopoda</i>	0,15	Цв	4	10	Sp	Средняя	Май – начало июня	Ест.	Охр. II
<i>Carlina intermedia</i>	0,8	Бут	5	4	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Centaurea scabiosa</i>	1,05	Цв	4	1	Sol	Высокая	Июль	Ест.	
<i>Cichorium intybus</i>	0,85	Цв	5	3	Sol	Высокая	Июнь–август	Ест.	
<i>Convolvulus arvensis</i>	0,5	Цв	4	2	Sol	Высокая	Июль – начало августа	Ест.	
<i>Dactylis glomerata</i>	1,1	Бут–цв	4	3	Sol	Средняя	Июнь – начало июля	Ест.	
<i>Daucus carota</i>	0,9	Цв	4	2	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Echium vulgare</i>	0,5	Цв	4	3	Sol	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Festuca rubra</i>	0,65	Бут–пл	4	6	Sp	Средняя	Июнь–июль	Ест.	
<i>Fragaria viridis</i>	0,15	Цв–пл	4	30	Сор <sub>1</sub>	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Galium mollugo</i>	0,8	Цв	4	7	Sp	Средняя	Конец июня – начало августа	Ест.	
<i>Galium verum</i>	0,85	Цв	4	2	Sol	Высокая	Конец июня – начало августа	Ест.	
<i>Gentiana cruciata</i>	0,25	Бут–цв	4	3	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	Охр. III
<i>Helichrysum arenarium</i>	0,35	Цв	4	1	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Hypericum perforatum</i>	0,5	Цв	4	1	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	

Окончание табл. 2

Название растения	Средняя высота, м	Фенофаза	Жизненность, балл	Проективное покрытие, %	Обилие	Декоративность	Сроки высокой декоративности	Происхождение	Статус охраны, категория
<i>Juniperus communis</i>	2,0	Вег	5	30	Cop <sub>1</sub>	Очень высокая	Весь год	Ест.	
<i>Knautia arvensis</i>	0,75	Цв	4	2	Sol	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Leontodon hispidus</i>	0,65	Цв	4	8	Sp	Высокая	Июнь	Ест.	
<i>Leucanthemum vulgare</i>	0,4	Цв	4	10	Sp	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Linaria vulgaris</i>	0,35	Цв	4	+	Rg	Средняя	Июль–август	Ест.	
<i>Malus sylvestris</i>	2,5	Вег	3	+	Rg	Средняя	Середина мая – начало июня	Ест.	
<i>Pimpinella saxifraga</i>	0,65	Бут–цв	4	3	Sol	Средняя	Июль	Ест.	
<i>Thalictrum lucidum</i>	1,25	Цв	4	+	Rg	Высокая	Июль	Ест.	
<i>Veronica spicata</i>	0,35	Цв	4	2	Sol	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Medicago falcata</i>	0,65	Цв	4	8	Sp	Средняя	Июнь–июль	Ест.	
<i>Medicago lupulina</i>	0,15	Цв	4	1	Sol	Средняя	Июнь–август	Ест.	
<i>Melampyrum nemorosum</i>	0,3	Цв	5	5	Sp	Высокая	Июнь–август	Ест.	
<i>Melilotus albus</i>	0,7	Цв	3	+	Rg	Средняя	Июль	Ест.	
<i>Origanum vulgare</i>	0,45	Бут–цв	5	45	Cop <sub>2</sub>	Высокая	Конец июня – начало августа	Ест.	
<i>Picea abies</i>	9,5	Вег	4	15	Sp	Высокая	Весь год	Ест.	
<i>Pilosella officinarum</i>	0,15	Цв	4	25	Cop <sub>1</sub>	Высокая	Конец мая – начало июня	Ест.	
<i>Pilosella onegensis</i>	0,3	Цв	5	3	Sol	Высокая	Июнь	Ест.	
<i>Pinus sylvestris</i>	4,0	Вег	4	25	Cop <sub>1</sub>	Высокая	Весь год	Ест.	
<i>Plantago media</i>	0,5	Пл	4	2	Sol	Средняя	Середина июня – начало июля	Ест.	
<i>Polygala comosa</i>	0,1	Цв	4	5	Sp	Высокая	Июнь–август	Ест.	
<i>Primula veris</i>	0,25	Цв	4	12	Sp	Средняя	Середина мая – начало июня	Ест.	
<i>Ranunculus polyanthemos</i>	0,7	Цв	4	5	Sp	Высокая	Июнь–июль	Ест.	
<i>Salix acutifolia</i>	3,0	Вег	4	2	Sol	Высокая	Весь год	Ест.	
<i>Solidago virgaurea</i>	0,8	Цв	4	1	Sol	Высокая	Конец июля – август	Ест.	
<i>Tragopogon pratensis</i>	0,95	Цв	5	1	Sol	Средняя	Середина июня – начало июля	Ест.	
<i>Trifolium arvense</i>	0,2	Цв	4	2	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Trifolium montanum</i>	0,4	Цв	4	7	Sp	Высокая	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Trifolium pratense</i>	0,25	Цв	3	1	Sol	Средняя	Конец июня – июль	Ест.	
<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	0,7	Цв–пл	4	10	Sp	Средняя	Июнь–август	Ест.	
<i>Viscaria vulgaris</i>	0,55	Цв	4	1	Sol	Высокая	Конец мая – июнь	Ест.	

Таблица 3. Список видов, составляющих эстетический потенциал придорожной растительности вдоль автомагистрали Р28 на отрезке дороги г. Мядель – курортный поселок Нарочь (по состоянию на 2017 г.), проходящей относительно прилегающих территорий в экспозиции «насыпь» (КУ-3 «Микольцы»)

Table 3. List of species forming the aesthetic potential of roadside vegetation along the P28 highway in the segment Myadel – the resort v. Naroch (by 2017) with the passage of the road relative to the adjacent territories in the “body of road” exposition

Название растения	Средняя высота, м	Фенофаза	Жизненность, балл	Проективное покрытие, %	Обилие	Декоративность	Сроки высокой декоративности	Происхождение
<i>Acorus calamus</i>	0,7	Вег–пл	4	+	Rr	Высокая	Май–август	Ест.
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	0,85	Вег–пл	4	+	Rr	Средняя	Июнь – середина августа	Ест.
<i>Calla palustris</i>	0,53	Вег–пл	4	+	Rr	Средняя	Май–сентябрь	Ест.
<i>Caltha palustris</i>	0,5	Цв	4	1	Sol	Высокая	Апрель – начало мая	Ест.
<i>Carex pseudocyperus</i>	0,8	Цв–пл	4	1	Sol	Средняя	Июль – начало августа	Ест.
<i>Carex rostrata</i>	0,7	Вег–пл	4	4	Sol	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Comarum palustre</i>	0,6	Бут–цв	4	10	Sp	Средняя	Конец июня – середина августа	Ест.
<i>Equisetum fluviatile</i>	0,9	Вег	4	10	Sp	Высокая	Май–август	Ест.
<i>Iris pseudacorus</i>	0,75	Цв	4	1	Sol	Высокая	Середина июня – середина июля	Кульг. (из ест.)
<i>Iris sibirica</i>	0,57	Цв	4	+	Rr	Высокая	Середина июня – середина июля	Кульг. (из ест.)
<i>Lemna gibba</i>	0,01	Вег	4	30	Cor <sub>1</sub>	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Lemna minor</i>	0,01	Вег	4	10	Sp	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Lemna trisilca</i>	0,01	Вег	4	10	Sp	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Lysimachia vulgaris</i>	0,8	Цв	5	15	Sp	Высокая	Июль – начало сентября	Ест.
<i>Lythrum salicaria</i>	1,0	Цв	5	5	Sp	Высокая	Июль – начало сентября	Ест.
<i>Menyanthes trifoliata</i>	0,4	Вег–цв	4	90	Soc	Средняя	Июнь – середина августа	Ест.
<i>Naumburgia thyrsiflora</i>	0,65	Цв	4	4	Sol	Средняя	Июль – середина августа	Ест.
<i>Persicaria amphibia</i>	0,5	Вег	4	15	Sp	Средняя	Июнь–август	Ест.
<i>Solanum dulcamara</i>	0,95	Цв	5	10	Sp	Высокая	Июль–август	Ест.
<i>Typha latifolia</i>	1,3	Вег–пл	4	30	Cor <sub>1</sub>	Высокая	Май–август	Ест.
<i>Utricularia minor</i>	0,3	Вег	4	20	Sp	Средняя	Июнь–август	Ест.

Анализ сезонной динамики флористического состава, продуктивности и экологического состояния сообществ определил основные декоративные виды аборигенной флоры, которые формируют придорожные экосистемы. Эти виды и должны составлять основу для создания банка семян травосмесей, необходимых для озеленения придорожных полос. Согласно табл. 1–3, естественный эстетический потенциал придорожной растительности на модельном участке значителен, при этом 46 видов растений оцениваются 4–5 баллами (высокая и очень высокая эстетическая ценность) и более 60 – 3 баллами (средняя эстетическая ценность). В общем плане наибольшее количество видов высокодекоративных растений (32) представлено на склонах при прохождении дороги в экспозиции «выемка» (КУ-2 «Теляки» и КУ-4 «Минчаки») (рис. 5). Здесь же они совокупно занимают 87 % от площади, покрытой растительностью, в то время как при прохождении дороги в экспозиции «насыпь» (КУ-3 «Микольцы») их покрытие составляет 37 %, в экспозиции «нулевая отметка» (КУ-1 «Симоны») – 58 % (рис. 6).



Рис. 5. Количество видов высокодекоративных растений при различных экспозициях дороги

Fig. 5. The number of highly ornamental plant species in the key areas (expositions)



Рис. 6. Доля (%) высокодекоративных растений при различных экспозициях дороги

Fig. 6. Proportion (%) of highly decorative plants in the common ground cover in the key areas (expositions)

В соответствии с нормами [33] высота травы на обочинах, разделительной полосе и откосах дорог третьей категории не должна превышать 20 см. При соблюдении этого регламента около 25 % видов, фиксированных в составе видового разнообразия в осенний период на КУ, проходили бы полный фенологический цикл, повышая в период цветения эстетический фон откосов и усиливая позиции в сообществе. При увеличении на 10 см (до 30 см) нормы высоты травостоя доля видов, высота которых в природе не достигает более 30 см, повышается от 1 до 5 %, более 40 см – от 5 до 13 %, более 50 см – от 14 до 20 %. При установлении нормы высоты травостоя 50 см доля видов, проходящих все фенологические фазы, составит 37–43 %. Следует отметить, что если в пределах экспозиции «выемка» высокая декоративность участка достигается за счет пестроты – видового разнообразия красиво цветущих растений, то в экспозиции «насыпь», наоборот, за счет обилия нескольких, но высокодекоративных видов – *Typha latifolia*, *Menyanthes trifoliata*, *Equisetum fluviatile* и др.

Флористический состав обследованных КУ неоднороден, особенно в пределах экспозиции дороги «выемка», где экологическая амплитуда растений очень широкая – от эвтрофных гигромезофитов до ксеромезофитов и оксилomezотрофных псаммофитов. Высокодекоративных растений больше всего среди эвтрофных эумезофитов (*Arrhenatherum elatius*, *Leucanthemum vulgare*, *Briza media* и др.) и ксеромезофитов (*Centaurea scabiosa*, *Origanum vulgare*, *Medicago falcata* и др.), предпочитающих умеренно влажные средние части придорожных склонов с супесчаными и суглинистыми почвами. Наилучшие условия для этих растений в экспозиции дороги «нулевая отметка», где они составляют 46 % от общего числа видов. Наибольшая декоративность растительного покрова приходится на период цветения большинства трав – конец июня – начало августа (табл. 4).

Таблица 4. Количество и доля высокодекоративных высших сосудистых растений в напочвенном покрове вдоль автомагистрали Р28 на КУ (2017 г.)

Table 4. The number and proportion of highly decorative higher vascular plants along the P28 highway at KP (2017)

Экспозиция	Ключевой участок	Пробная площадь	Показатель	Конец мая	Середина июля	Начало сентября
Выемка	КУ-2 «Теляки»	ППП-1	К-во видов, шт.	6	16	1
			Доля, %	22,3	23,1	0,5
	КУ-4 «Минчаки»	ППП-1	К-во видов, шт.	10	15	5
			Доля, %	39,4	35,9	15,5
Насыпь	КУ-3 «Микольцы»	ППП-1	К-во видов, шт.	4	5	3
			Доля, %	4,2	9,9	15,9
		ППП-2	К-во видов, шт.	3	2	1
			Доля, %	15,1	17,7	16,5
Нулевая отметка	КУ-1 «Симоны»	ППП-1	К-во видов, шт.	5	16	3
			Доля, %	7,5	46,0	2,2
		ППП-2	К-во видов, шт.	5	6	2
			Доля, %	26,1	6,0	0,5



Декоративность растений изменяется в зависимости от увлажнения почвы, экспозиции склона и температурного режима. Так, в верхних частях придорожных склонов холмов в экспозициях «выемка» и «нулевая отметка» в обилии раннецветущие травы: *Primula veris*, *Arrhenatherum elatius*, *Pilosella officinarum* и др., яркие пятна которых на фоне молодой зелени демонстрируют высокую декоративность. У подножия холмов пик расцвета трав приходится на июль. В понижениях рельефа в экспозиции «насыпь» наблюдается некоторое смещение декоративности растений на вторую половину вегетации. Главными факторами, лимитирующими декоративность травяного покрова, здесь являются степень и продолжительность обводнения и температурные условия. Декоративность и видовая презентативность придорожных полос на КУ была значительно повышена при прекращении кошения в период весенней и летней вегетации растений.

По результатам исследований разработан технологический регламент формирования придорожных растительных сообществ природной декоративной флоры, где определены основные этапы работ и требования к ним.

**Проектирование работ по озеленению придорожной территории.** Растительные сообщества в течение всей своей жизни претерпевают естественные изменения, тем более под воздействием агрессивной среды на магистралях.

Уже на стадии планирования и проектирования, предвидя возможные варианты развития событий, работы по озеленению следует начинать, соблюдая следующую последовательность:

определить геоботаническую принадлежность проектируемого участка;

оценить качественные и количественные характеристики эдафических условий, представленных экотопов, растительных сообществ и травянистых растений, в том числе с выделением редких и охраняемых видов;

составить список видов для эффективного воспроизведения на конкретном участке;

разработать проектную документацию по ландшафтному проектированию с использованием местных видов природной флоры.

При разработке проектной документации следует придерживаться простого в плане реализации, содержания и ухода дизайна проектируемого участка. Предпочтительно использовать травосмеси, состоящие минимально из трех видов во избежание формирования крупных монодоминантных пятен.

**Подбор ассортимента видов для озеленения придорожных полос** должен основываться на представлении о разнообразии флоры в границах определенного геоботанического округа согласно геоботаническому районированию Беларуси [34]. При этом следует отдавать предпочтение тем видам, которые выявлены при предварительной инвентаризации территории в соответствии с условиями, в которых проводится залужение. В этом случае можно добиться большего эффекта за более короткий период.

Не допускается использование интродуцентов. При выявлении инвазионных видов озеленение проводят только после проведения мероприятий по их выведению из естественных растительных сообществ путем вырубki, корчевания, выкашивания в период до цветения растений (май–июнь), вторично – в период массового цветения до момента образования семян, обработки гербицидами участков, где инвазионный вид получил массовое распространение и где сложно проводить сенокосение.

Списки видов растений необходимо сортировать по группам с учетом их эколого-биологических особенностей: предпочитаемых условий увлажнения и трофности почвы, периода цветения, высоты растений и окраски цветков. Создание травосмесей должно сопровождаться информацией о регионе и дате изъятия семян. Для сохранения генетической принадлежности семена собирают исключительно в границах определенного геоботанического округа.

По результатам исследований и с учетом списка видов, произрастающих на территории Нарочано-Вилейского геоботанического района, из наиболее высокодекоративных и экологически значимых видов составлен Атлас растений «Придорожные цветы» для Национального парка «Нарочанский». Виды растений, перечисленные в этом Атласе, могут быть рекомендованы также для озеленения дорожных полос в границах Ошмянско-Минского геоботанического округа.

**Сохранение и оптимизация условий мест произрастания редких видов.** При выявлении в ходе инвентаризации участка растений, относящихся к видам, включенным в Красную книгу Республики Беларусь [35], и/или фитоценозов высокой биологической и созологической ценности необходимы реставрация и управление придорожными экосистемами, направленные на их сохранение и оптимизацию условий мест произрастания.

Приоритетными мероприятиями по сохранению редких видов, нуждающихся в охране, являются способы их развития в условиях природной среды (*in situ*), поскольку только в такой среде возможно поддержание полноценного и долговременного жизненного состояния популяции. В случае малого количества особей в популяции, плохого естественного возобновления (слабое плодоношение, прорастание, укоренение) проводятся мероприятия по оптимизации среды произрастания (улучшение минерального питания, водного и светового режимов), условий для размножения (кошение после осеменения, минерализация площадок для посева семян), по снятию/снижению внешних антропогенных угроз, а также мероприятия по размножению растений в условиях *ex situ* для последующей их репатриации в места естественного произрастания [36, 37]. Эффективным способом оценки жизнеспособности популяций редких видов растений (как подерживаемых, так и после репатриации) является их мониторинг и оценка параметров генетического разнообразия во времени [38, 39].

Целесообразным является создание сети хозяйств и питомников по размножению видов природной флоры, создание генетических естественных резерватов, банков травосмесей [40].

**Содержание и уход.** Наиболее экономически затратные, поддерживаемые частым кошением травяные сообщества фактически не могут выполнять функцию видосбережения природной флоры, являясь местами обитания опылителей, энтомофагов, групп беспозвоночных животных и экологическими коридорами для редких видов. Для сохранения биоразнообразия и растительного покрова высокой декоративности содержание и интенсивность ухода должны свестись к разовому скашиванию травостоя в конце созревания семян большинства видов (август–сентябрь), за исключением обводненных участков. Непосредственно полосы отвода и кюветы выкашиваются многократно (3–4 раза) с последующей уборкой покоса, что не только обеспечивает необходимую видимость и безопасность движения вдоль дорожного полотна, но и стимулирует развитие низовых растений, в том числе довольно высокой декоративности (*Trifolium repens*, *Medicago lupulina*, *Lotus corniculatus* и др.).

Для продления цветения и в годы с особенно сильным ростом трав скашивание может быть смещено на первую половину лета, а в засушливые годы, при повышенной пожарной опасности допускается дополнительное летнее скашивание. В целях сохранения опылителей, энтомофагов и других функциональных групп беспозвоночных животных целесообразно мозаичное скашивание (пятнами, полосами и т. д.). При стрижке и последующей уборке травы большая часть живых организмов травостоя и подстилки на скошенной части этих газонов погибает, семена многих видов не вызревают и восстановление идет за счет миграции с участков, оставленных нестриженными. Их можно выкашивать только после отрастания и зацветания растений на участках, состриженных ранее.

Травостой разнотравного и низкотравного травяных сообществ придорожных полос можно не косить несколько лет без существенного изменения видового состава, однако длительное содержание без выкашивания ведет к зарастанию древесно-кустарниковой растительностью и обеднению разнотравья из-за вытеснения его злаками.

Таким образом, преимущества данной стратегии ведения хозяйства в придорожных полосах заключаются в следующем: 1) повышении эстетичности и выразительности ключевых элементов ландшафта придорожных территорий; 2) повышении биологического разнообразия и устойчивости придорожных экосистем; 3) экологическом эффекте от восстановления редких природных экосистем; 4) экономическом эффекте от сохранения и поддержания существующих качественных естественных растительных сообществ над восстановлением при их деградации; 5) снижении затрат человеческих и материальных ресурсов на обслуживание дорог при сокращении площади и частоты кошения придорожных полос: сокращение кошения с 3 до 1 раза в год, площади кошения – с 3 до 0,3 га на 1 км.

**Заклучение.** Эколого-ботаническое обследование модельного участка показало, что вдоль дорог республиканского значения третьей категории [7] сохраняется высокий потенциал природной флоры, в том числе адаптивный, способный при изменении режима кошения сформировать устойчивые растительные сообщества высокой ботанической и эстетической ценности, а внедрение высокодекоративных аборигенных видов повысит эстетику и выразительность ключевых элементов ландшафта и экологическую устойчивость придорожных экосистем.

Для реализации Концепции на территории дорожной сети Беларуси необходима оптимизация технологий управления придорожными экосистемами по сохранению, восстановлению и формированию естественных растительных сообществ. Кроме того, Концепция предусматривает разработку ассортимента аборигенных видов растений, которые могут быть внедрены при озеленении придорожных территорий с учетом их геоботанических и эдафических особенностей и флористического разнообразия, создание банка семян травосмеси, формирование естественных генетических резерватов (полевых банков) луговой флоры для каждого геоботанического района или округа. Такой список (Атлас растений «Придорожные цветы»), составленный для Национального парка «Нарочанский», может быть успешно использован и в границах Ошмянско-Минского геоботанического округа.

**Благодарности.** Практическая реализация концепции выполнена в рамках отраслевой научно-технической программы «Интродукция, озеленение, экобезопасность» на 2016–2020 гг. (задание № 2.1.4). Авторы благодарят за совместную работу сотрудников научного отдела Национального парка «Нарочанский», директора ДЭУ-66 РУП «Минскавтодор-Центр» В. Т. Буйко, за консультации и поддержку проекта американских коллег д-ра Майкла Коста и д-ра Дэвида Миченера (Ботанический сад и Арборетум Университета штата Мичиган), д-ра Джоэту Шарму (Техасский Технологический Университет), д-ра Дэвида Ремукала и Даниэля Миллера (Ландшафтный Арборетум Университета Миннесоты).

**Acknowledgements.** The practical implementation of the concept was carried out in the frames of the sectoral scientific and technical program “Introduction, landscaping, and environmental safety” for 2016–2020 (task No 2.1.4). The authors thank for the joint work of the staff of the scientific department of the National Park “Narochansky”, Director of Road Operating service DEU–66 RUE “Minskavtodor–Center” Victor T. Buiko, for valuable expertise and support for the project to the colleagues from USA botanical institutions Dr. Michael Kost and Dr. David Michener (University of Michigan Matthaei Botanical Garden and Nichols Arboretum), Dr. Jyotsna Sharma (Texas Tech University), Dr. David Remucal and Daniel Miller (University of Minnesota Landscape Arboretum).

### Список использованных источников

1. Конституция Республики Беларусь 1994 года (с изменениями и дополнениями, принятыми на республиканских референдумах 24 ноября 1996 г. и 17 октября 2004 г.). – Минск : Амалфея, 2018. – 48 с.
2. О присоединении Республики Беларусь к Картахенскому протоколу по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии : Закон Респ. Беларусь от 6 мая 2002 г., № 97–3 // Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь. – 2002. – № 53–54. – 2/846.
3. О присоединении Республики Беларусь к Конвенции об охране дикой фауны и флоры и природных сред обитания в Европе : Указ Президента Респ. Беларусь от 7 февр. 2013 г. № 70 // Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь. – 2013. – № 7. – 1/14069.
4. Конвенция о биологическом разнообразии от 5 июня 1992 г. : ратифицирована Верхов. Советом Респ. Беларусь 10 июня 1993 г. // Ведамасці Вярхоўнага Савета Рэсп. Беларусь. – 1993. – № 29. – С. 50–80.
5. О некоторых вопросах в области сохранения и устойчивого использования биологического разнообразия : постановление Совета Министров Респ. Беларусь от 19 нояб. 2010 г., № 1707 // Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь. – 2010. – № 287. – 5/32887.
6. Сцепановіч, І. М. Сучасны стан і стратэгія ўстойлівага выкарыстання луговой расліннасці Беларусі / І. М. Сцепановіч // Природ. ресурсы. – 2017. – № 2. – С. 58–74.
7. СТБ 1291–2016. Дороги автомобильные и улицы. Требования к эксплуатационному состоянию, допустимому по условиям обеспечения безопасности дорожного движения. – Минск : Госстандарт, 2017. – 15 с.
8. Сцепановіч, Я. М. Фітацэнаразнастайнасць расліннасці Беларусі / Я. М. Сцепановіч // Ботаника (исследования) : сб. науч. тр. / Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск, 2006. – Вып. 34. – С. 264–281.
9. Степанович, И. Мониторинг луговой и лугово-болотной растительности Беларуси: науч.-метод. основы, технология, сеть пунктов / И. Степанович, Е. Степанович. – Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2015. – 328 с.
10. Биологическое разнообразие Национального парка «Нарочанский»: сосудистые растения / Д. В. Дубовик [и др.] ; под ред. В. И. Парфенова. – Борисов : Борисов. укрупн. тип. им. 1 Мая, 2014. – 256 с.
11. Рожков, Л. Н. Методика эстетической оценки пейзажей / Л. Н. Рожков // Лесн. хоз-во. – 1978. – № 12. – С. 23–26.
12. Priedītis, N. Latvijas augi – Plants of Latvia – Растения Латвии : enciklopēdija / N. Priedītis. – Rīga : Grands, 2014. – 888 p.
13. Ries L., Debinski D. M., Wieland M. L. Conservation value of roadside prairie restoration to butterfly communities / L. Ries, D. M. Debinski, M. L. Wieland // Conservation Biol. – 2001. – Vol. 15, N 2. – P. 401–411. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015002401.x>

14. Optimizing grassland management for flower-visiting insects in roadside verges / J. Noordijk [et al.] // *Biol. Conservation*. – 2009. – Vol. 142, N 10. – P. 2097–2103. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.009>
15. Wigginton, S. K. Passive roadside restoration reduces management costs and fosters native habitat / S. K. Wigginton, L. A. Meyerson // *Ecol. Restoration*. – 2018. – Vol. 36, N 1. – P. 41–51. <https://doi.org/10.3368/er.36.1.41>
16. The management of roadside verges for biodiversity : Scottish Natural Heritage Commissioned Report no. 551 [Electronic resource]. – Mode of access : <https://www.nature.scot/sites/default/files/2018-04/Publication%202013%20-%20SNH%20Commissioned%20Report%20551%20-%20The%20management%20of%20roadside%20verges%20for%20biodiversity.pdf>. – Date of access : 15.11.2018.
17. Sykora, K. V. A phytosociological and floristic evaluation of a 15-year management of roadside verges in the Netherlands / K. V. Sykora, J. M. Kalwij, P.-J. Keizer // *Preslia*. – 2002. – Vol. 74. – P. 421–436.
18. Karim, M. N. Roadside revegetation by native plants: I. Roadside microhabitats, floristic zonation and species traits / M. N. Karim, A. U. Mallik // *Ecol. Engineering*. – 2008. – Vol. 32, N 3. – P. 222–237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.11.003>
19. Akbar, K. F. Assessment of scenic beauty of the roadside vegetation in northern England / K. F. Akbar, W. H. Hale, A. D. Headley // *Landscape and Urban Planning*. – 2003. – Vol. 63, N 3. – P. 139–144. [https://doi.org/10.1016/s0169-2046\(02\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s0169-2046(02)00185-8)
20. Johnson, A. M. Best practices handbook for roadside vegetation management [Electronic resource] / A. M. Johnson. – Minnesota, 2008. – Mode of access : <https://www.lrrb.org/pdf/200820.pdf>. – Date of access : 15.11.2018.
21. Auestad, I. Road verges: potential refuges for declining grassland species despite remnant vegetation dynamics / I. Auestad, K. Rydgren, I. Austad // *Annales Botanici Fennici*. – 2011. – Vol. 48, N 4. – P. 289–303. <https://doi.org/10.5735/085.048.0401>
22. Wrobel, M. Origin and spatial distribution of roadside vegetation within the forest and agricultural areas in Szczecin lowland (west Poland) / M. Wrobel // *Polish J. Ecol.* – 2006. – Vol. 54. – P. 137–144.
23. Tikka, P. M. Road and railway verges serve as dispersal corridors for grassland plants / P. M. Tikka, H. Högmander, P. S. Koski // *Landscape Ecol.* – 2001. – Vol. 16, N 7. – P. 659–666. <https://doi.org/10.1023/A:1013120529382>
24. Garbuzov, M. Public approval plus more wildlife: twin benefits of reduced mowing of amenity grass in a suburban public park in Saltdean, UK / M. Garbuzov, K. A. Fensome, F. L. Ratnieks // *Insect Conservation and Diversity*. – 2014. – Vol. 8, N 2. – P. 107–119. <https://doi.org/10.1111/icad.12085>
25. Simple modifications of mowing regime promote butterflies in extensively managed meadows: Evidence from field-scale experiments / L. Bruppacher [et al.] // *Biol. Conservation*. – 2016. – Vol. 196. – P. 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.02.018>
26. Roadside use of native plants / ed. : B. Harper-Lore, M. Wilson. – Washington : Island Press Publ., 2000. – 667 p.
27. Состояние зеленых насаждений в зоне воздействия Минской кольцевой автодороги и пути повышения их устойчивости / А. В. Пугачевский [и др.] // *Ботаника (исследования) : сб. науч. тр. / Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси*. – Минск, 2006. – Вып. 33. – С. 220–235.
28. Трансформация лесной растительности вдоль автомобильных дорог различных категорий / И. П. Вознячук [и др.] // *Проблемы лесоведения и лесоводства : сб науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси*. – Гомель, 2008. – Вып. 68. – С. 33–41.
29. Особенности воздействия противогололедных материалов на почвы придорожных территорий / О. В. Бурова [и др.] // *Автомобильные дороги и мосты*. – 2008. – № 1. – С. 49–52.
30. Sudnik, A. V. State of forest ecosystems in the zone of influence of roads in Belarus / A. V. Sudnik, I. P. Voznyachuk // *ENVIROAD 2009. II International conference environmentally friendly roads*. October 15–16, 2009. – Warsaw, 2009. – 10 p.
31. Сцепановіч, Я. М. Сінтаксанамічная структура і экалагічны стан прыдарожных фітацэнозаў г. Мінска / Я. М. Сцепановіч, М. А. Ганцоўская // *Антропогенная трансформация ландшафтов : сб. науч. ст. / Белорус. гос. пед. ун-т им. М. Танка ; редкол. : М. Г. Ясовеев [и др.]*. – Минск, 2012. – С. 122–124.
32. Черепанов, С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств / С. К. Черепанов. – СПб. : Мир и семья, 1995. – 990 с.
33. ТКП 366–2012 (02191). Автомобильные дороги. Правила содержания. – Минск : Белавтодор, 2012. – 62 с.
34. Юркевич, И. Д. География, типология и районирование лесной растительности Белоруссии / И. Д. Юркевич, В. С. Гельтман. – Минск : Наука и техника, 1965. – 288 с.
35. Красная книга Республики Беларусь. Растения : редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / редкол. : И. М. Качановский [и др.]. – 4-е изд. – Минск : Беларус. энцыкл., 2015. – 445 с.
36. Li, D. Z. The science and economics of ex situ plant conservation / D. Z. Li, H. W. Pritchard // *Trends Plant Sci.* – 2009. – Vol. 14, N 11. – P. 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.005>
37. Асептическая коллекция и банк ДНК Центрального ботанического сада НАН Беларуси как эффективные инструменты сохранения редких растений / Е. В. Спиридович [и др.] // *Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 3. – С. 117–128.
38. George, S. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms / S. George, J. Sharma, V. L. Yadon // *Am. J. Bot.* – 2009. – Vol. 96, N 11. – P. 2022–2030. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800368>
39. Allendorf, F. W. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes / F. W. Allendorf // *Mol. Ecol.* – 2017. – Vol. 26, N 2. – P. 420–430. <https://doi.org/10.1111/mec.13948>
40. Evolution of plant materials for ecological restoration: insights from the applied and basic literature / E. K. Espeland [et al.] // *J. Appl. Ecol.* – 2017. – Vol. 54, N 1. – P. 102–115. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12739>

## References

1. Constitution of the Republic of Belarus 1994 (with amendments and additions adopted at republican referendums on November 24, 1996 and October 17, 2004). Minsk, Amalfeya Publ., 2018. 48 p. (in Russian).
2. On the accession of the Republic of Belarus to the Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity (Law of the Republic of Belarus of May 6, 2002, No. 97–3). *Natsional'nyi reestr pravovyykh aktov Respubliki Belarus'* [The National Register of the Ministry of Education of the Republic of Belarus], 2002, no. 53–54, 2/846 (in Russian).
3. On the accession of the Republic of Belarus to the Convention on the Protection of Wild Fauna and Flora and Natural Habitats in Europe (Decree of the President of the Republic of Belarus of February 7, 2013 No. 70). *Natsional'nyi reestr pravovyykh aktov Respubliki Belarus'* [The National Register of the Ministry of Education of the Republic of Belarus], 2013, no. 7, 1/14069 (in Russian).
4. Convention on Biological Diversity of June 5, 1992: ratified by the Supreme Council of the Republic of Belarus on June 10, 1993. *Vedamastsi Vyarkhounaga Saveta Respubliki Belarus'* [Bulletin of the Supreme Council of the Republic of Belarus], 1993, no. 29, pp. 50–80 (in Russian).
5. On some issues in the field of conservation and sustainable use of biological diversity (Resolution of the Council of Ministers of the Republic of Belarus of November 19, 2010 No. 1707). *Natsional'nyi reestr pravovyykh aktov Respubliki Belarus'* [The National Register of the Ministry of Education of the Republic of Belarus], 2010, no. 287, 5/32887 (in Russian).
6. Stsepanovich I. M. Current status and strategy of sustainable use of meadow vegetation in Belarus. *Prirodnye resursy* [Natural resources], 2017, no. 2, pp. 58–74 (in Belarusian).
7. *State Standard of Republic of Belarus 1291–2001. Highway and street. Requirements for operational states, adopted on the condition of traffic safety*. Minsk, Gosstandart Publ., 2017. 15 p. (in Russian).
8. Stsepanovich Ya. M. Phytocenotic diversity of vegetation in Belarus. *Botanika (issledovaniya): sbornik nauchnykh trudov* [Botany (research): a collection of scientific papers]. Minsk, 2006, iss. 34, pp. 264–281 (in Belarusian).
9. Stepanovich I., Stepanovich E. *The monitoring of meadow and meadow-mire vegetation of Belarus: scientific and methodological basis, technology, network*. Saarbrücken, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2015. 328 p. (in Russian).
10. Dubovik D. V., Skuratovich S. A., Tret'yakov D. I., Parfenov V. I., Dzhus M. N., Tikhomirov V. N., Savchuk S. S., Sautkina T. A. *Biological diversity of the National Park "Narochansky": vascular plants*. Ed. V. I. Parfenov. Borisov, Borisov Enlarged Printing House named after May 1, 2014. 256 p. (in Russian).
11. Rozhkov L. N. Methodology for aesthetic assessment of landscapes. *Lesnoye khozyaistvo* [Forestry], 1978, no. 12, pp. 23–26 (in Russian).
12. Priedītis N. *Latvijas augi – Plants of Latvia – Rasteniya Latvii: encyclopedija*. Rīga, Grands Publ., 2014. 888 p.
13. Ries L., Debinski D. M., Wieland M. L. Conservation value of roadside prairie restoration to butterfly communities. *Conservation Biology*, 2001, vol. 15, no. 2, pp. 401–411. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015002401.x>
14. Noordijk J., Delille K., Schaffers A. P., Sýkora K. V. Optimizing grassland management for flower-visiting insects in roadside verges. *Biological Conservation*, 2009, vol. 142, no. 10, pp. 2097–2103. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.009>
15. Wigginton S. K., Meyerson L. A. Passive roadside restoration reduces management costs and fosters native habitat. *Ecological Restoration*, 2018, vol. 36, no. 1, pp. 41–51. <https://doi.org/10.3368/er.36.1.41>
16. *The management of roadside verges for biodiversity: Scottish Natural Heritage Commissioned Report no. 551*. Available at: <https://www.nature.scot/sites/default/files/2018-04/Publication%202013%20-%20SNH%20Commissioned%20Report%20551%20-%20The%20management%20of%20roadside%20verges%20for%20biodiversity.pdf> (accessed: 15 November, 2018).
17. Sýkora K. V., Kalwij J. M., Keizer P.-J. A phytosociological and floristic evaluation of a 15-year management of roadside verges in the Netherlands. *Preslia*, 2002, vol. 74, pp. 421–436.
18. Karim M. N., Mallik A. U. Roadside revegetation by native plants: I. Roadside microhabitats, floristic zonation and species traits. *Ecological Engineering*, 2008, vol. 32, no. 3, pp. 222–237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.11.003>
19. Akbar K. F., Hale W. H., Headley A. D. Assessment of scenic beauty of the roadside vegetation in northern England. *Landscape and Urban Planning*, 2003, vol. 63, no. 3, pp. 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0169-2046\(02\)00185-8](https://doi.org/10.1016/S0169-2046(02)00185-8)
20. Johnson A. M. *Best practices handbook for roadside vegetation management*. Minnesota, 2008. Available at: <https://www.lrrb.org/pdf/200820.pdf> (accessed 15 November, 2018).
21. Auestad I., Rydgren K., Auestad I. Road verges: potential refuges for declining grassland species despite remnant vegetation dynamics. *Annales Botanici Fennici*, 2011, vol. 48, no. 4, pp. 289–303. <https://doi.org/10.5735/085.048.0401>
22. Wrobel M. Origin and spatial distribution of roadside vegetation within the forest and agricultural areas in Szczecin lowland (west Poland). *Polish Journal of Ecology*, 2006, vol. 54, pp. 137–144.
23. Tikka P. M., Högmänder H., Koski P. S. Road and railway verges serve as dispersal corridors for grassland plants. *Landscape Ecology*, 2001, vol. 16, no. 7, pp. 659–666. <https://doi.org/10.1023/A:1013120529382>
24. Garbuzov M., Fensome K. A., Ratnieks F. L. Public approval plus more wildlife: twin benefits of reduced mowing of amenity grass in a suburban public park in Saltdean, UK. *Insect Conservation and Diversity*, 2014, vol. 8, no. 2, pp. 107–119. <https://doi.org/10.1111/icad.12085>
25. Bruppacher L., Pellet J., Arlettaz R., Humbert J. Y. Simple modifications of mowing regime promote butterflies in extensively managed meadows: evidence from field-scale experiments. *Biological Conservation*, 2016, vol. 196, pp. 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.02.018>
26. Harper-Lore B., Wilson M. (ed.). *Roadside use of native plants*. Washington, Island Press Publ., 2000. 667 p.

27. Pugachevskii A. V., Sudnik A. V., Voznyachuk I. P., Vershitskaya I. N., Efimova O. E., Likhovitskii A. B., Korotkevich N. A., Maksimova I. A. The state of greenery in the zone of impact of the Minsk belt highway and ways to improve their sustainability. *Botanika (issledovaniya): sbornik nauchnykh trudov* [Botany (research): a collection of scientific papers]. Minsk, 2006, iss. 33, pp. 220–235 (in Russian).

28. Voznyachuk I. P., Voznyachuk N. L., Efimova O. E., Likhovitskii A. B., Rogovoi A. P. Transformation of forest vegetation along the roads of various categories. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forest science and forestry: a collection of scientific papers]. Gomel', 2008, iss. 68, pp. 33–41 (in Russian).

29. Burova O. V., Voznyachuk I. P., Demidovich I. A., Lyaskovskaya L. P. Peculiarities of the effect of anti-icing materials on the soil of roadside areas. *Avtomobil'nye dorogi i mosty* [Highways and bridges], 2008, no. 1, pp. 49–52 (in Russian).

30. Sudnik A. V., Voznyachuk I. P. State of forest ecosystems in the zone of influence of roads in Belarus. *ENVIROAD 2009. II International conference environmentally friendly roads. October 15–16, 2009*. Warsaw, 2009. 10 p.

31. Stepanovich Ya. M., Gantsouskaya M. A. Sytaxonomic structure and ecological status of roadside phytocenoses in Minsk. *Antropogennaya transformatsia landshaftov: sbornik nauchnykh statei* [Anthropogenic transformation of landscapes: a collection of scientific articles]. Minsk, 2012, pp. 122–124 (in Belarusian).

32. Cherepanov S. K. *Vascular plants of Russia and neighboring countries*. St. Petersburg, Mir i sem'ya Publ., 1995. 990 p. (in Russian).

33. *Technical codes of routine practice TKP 366–2012 (02191). Highway transportation facilities. Maintenance regulations*. Minsk, Belavtodor, 2012. 62 p. (in Russian).

34. Yurkevich I. D., Gel'tman V. S. *Geography, typology and zoning of forest vegetation Belarus*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1965. 288 p. (in Russian).

35. *The Red Book of the Republic of Belarus. Plants: rare and endangered species of wild plants. 4th ed.* Minsk, Belaruskaya Entsylapedyya Publ., 2015. 445 p. (in Russian).

36. Li D. Z., Pritchard H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. *Trends in Plant Science*, 2009, vol. 14, no. 11, pp. 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.005>

37. Spiridovich E. V., Fomenko T. I., Vlasava N. B., Kozlova O. N., Vaynovskaya I. F., Yukhimuk A. N., Kuz'menkova S. M., Nosilovskii O. A., Reshetnikov V. N. Aseptic collection and DNA bank of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus as effective tools for the conservation of rare plants. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 3, pp. 117–128 (in Russian).

38. George S., Sharma J., Yadon V. L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany*, 2009, vol. 96, no. 11, pp. 2022–2030. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800368>

39. Allendorf F. W. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 420–430. <https://doi.org/10.1111/mec.13948>

40. Espeland E. K., Emery N. C., Mercer K. L., Woolbright S. A., Kettenring K. M., Gepts P., Etterson J. R. Evolution of plant materials for ecological restoration: insights from the applied and basic literature. *Journal of Applied Ecology*, 2017, vol. 54, no. 1, pp. 102–115. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12739>

## Информация об авторах

*Вознячук Ирина Петровна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ipv@tut.by](mailto:ipv@tut.by)

*Власова Анастасия Борисовна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [nastassia\\_vlasova@yahoo.com](mailto:nastassia_vlasova@yahoo.com)

*Степанович Иосиф Михайлович* – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [jazep.st@hotmail.com](mailto:jazep.st@hotmail.com)

*Годнева Анна Тихоновна* – канд. биол. наук, менеджер проекта «Заповедник полевых цветов», Зеленый фонд (Неве-Яков, 95005, г. Иерусалим, Израиль). E-mail: [a\\_godneva@yahoo.com](mailto:a_godneva@yahoo.com)

*Решетников Владимир Николаевич* – академик, д-р биол. наук, заведующий отделом. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [v.reshetnikov@cbg.org.by](mailto:v.reshetnikov@cbg.org.by)

## Information about the authors

*Irina P. Voznyachuk* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [ipv@tut.by](mailto:ipv@tut.by)

*Nastassia B. Vlasava* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [nastassia\\_vlasova@yahoo.com](mailto:nastassia_vlasova@yahoo.com)

*Iosiph M. Stepanovich* – D. Sc. (Biol.), Chief 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: [jazep.st@hotmail.com](mailto:jazep.st@hotmail.com)

*Hanna T. Hodneva* – Ph. D. (Biol.), Manager of the project “Wildflower Sanctuary”, Green Fund, Jerusalem, Israel (Neve-Jakov, 95005 Jerusalem, Israel). E-mail: [a\\_godneva@yahoo.com](mailto:a_godneva@yahoo.com)

*Vladimir N. Reshetnikov* – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Department. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [v.reshetnikov@cbg.org.by](mailto:v.reshetnikov@cbg.org.by)

**ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ**  
**SCIENTISTS OF BELARUS**

**ЭМИЛИЯ ИВАНОВНА КОЛОМИЕЦ**  
**(К юбилею)**

Эмилия Ивановна Коломиец родилась 10 февраля 1949 г. в деревне Заполичи Свислочского района Гродненской области в крестьянской семье. В 1966 г. окончила с золотой медалью Порозовскую среднюю школу, в 1971 г. – инженерно-технологический факультет Белорусского ордена Трудового Красного Знамени политехнического института и получила специальность инженера-технолога бродильных производств.

Трудовую деятельность Э. И. Коломиец начала в 1971 г. в должности инженера участка химических анализов Физико-технического института АН БССР. С 1974 г. по настоящее время Эмилия Ивановна работает в Институте микробиологии НАН Беларуси, где прошла путь от инженера до генерального директора ГНПО «Химический синтез и биотехнологии» – директора Института микробиологии НАН Беларуси (с 2012 г.). В 1980 г. она защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Микробиология», в 2000 г. – диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям «Микробиология» и «Биотехнология». В 2004 г. Э. И. Коломиец избрана членом-корреспондентом НАН Беларуси. В 2018 г. ей присвоено ученое звание профессора по специальности «Общая биология».

Исследования Э. И. Коломиец вносят весомый вклад в развитие микробных биотехнологий в Республике Беларусь. Она сформировала и активно развивает отечественную научную школу по изучению биогенеза биологически активных соединений с антимикробным действием и созданию биологических средств защиты растений и животных. Среди наиболее значимых результатов ее научной деятельности следует отметить создание коллекции промышленно ценных микроорганизмов, перспективных для разработки биопестицидов, биодезинфектантов, пробиотиков, кормовых добавок; установление механизмов взаимодействия бактерий-антагонистов с патогенами растений и животных, расшифровку природы продуцируемых антимикробных метаболитов и их направленный синтез; разработку оригинальных технологий создания биопрепаратов с фитозащитной, дезинфицирующей, рост- и иммуностимулирующей активностью. Э. И. Коломиец предложены эффективные способы биоремедиации агробиоценозов и повышения урожайности сельскохозяйственных культур с использованием поликомпонентных микробных препаратов, разработаны методы биоконверсии сельскохозяйственных и промышленных отходов в хозяйственно ценные продукты. Проведенные на молекулярном уровне исследования в области биохимии и генетики микроорганизмов – продуцентов биологически активных соединений, работы по селекции и генно-инженерному конструированию штаммов с заданными свойствами, их направленному культивированию обеспечили конкурентоспособность создаваемой биотехнологической продукции. Выполненные под руководством Э. И. Коломиец и при ее непосредственном участии научно-технические разработки успешно внедрены в производство и востребованы как в Республике Беларусь, так и за рубежом.

Э. И. Коломиец – крупный организатор науки. Она выступила инициатором, разработчиком и научным руководителем ряда программ межгосударственного и республиканского значения



в сфере биотехнологии, в том числе межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» (2011–2015). При ее непосредственном участии разработаны Концепция развития фармацевтической и биотехнологической промышленности Республики Беларусь на 2011–2015 гг. и на период до 2020 г., План развития биотехнологической отрасли на 2012–2015 гг. и на период до 2020 г., осуществляется мониторинг их реализации.

Научно-исследовательскую и организационную работу Э. И. Коломиец успешно сочетает с активной общественной деятельностью. Она возглавляет Белорусское общественное объединение микробиологов, является главным редактором сборника научных трудов «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», членом редакционной коллегии журналов «Наука и инновации», «Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук».

По результатам научных исследований Э. И. Коломиец опубликовано свыше 460 научных работ, включая 4 коллективные монографии, получено 19 патентов и 3 авторских свидетельства. Ею подготовлено 5 кандидатов и 1 доктор наук. Она является членом советов по защите диссертаций при Институте микробиологии НАН Беларуси и Институте защиты растений НАН Беларуси.

За значительные достижения в научной деятельности Э. И. Коломиец удостоена Ордена Почета (2019), почетных званий «Заслуженный деятель науки Республики Беларусь» (2014) и «Ученый года НАН Беларуси» (2017), награждена почетными грамотами Совета Министров Республики Беларусь (2009), Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь (2010), Национального собрания Республики Беларусь (2014), Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь (2015, 2019), Министерства здравоохранения Республики Беларусь (2018), НАН Беларуси (2005, 2006, 2014, 2015). Работы авторских коллективов под руководством Э. И. Коломиец вошли в ТОП-10 результатов деятельности ученых НАН Беларуси в области фундаментальных и прикладных исследований (2017), отмечены премией НАН Беларуси в области биологии, химии, медицины, аграрных наук и наук о Земле (2018).

Э. И. Коломиец пользуется заслуженным авторитетом среди научной общественности зарубежных стран. Является вице-президентом Восточнопалеарктической региональной секции Международной организации по биологической борьбе с вредными животными и растениями, членом Совета учредителей Евразийской технологической платформы «ЕвразияБио», Совета Федерации европейских микробиологических обществ. Под ее руководством реализуются международные научно-технические проекты с организациями Швеции, Латвии, Монголии, Польши, Сербии, Турции, Китая, Кубы. По результатам сотрудничества с провинцией Шаньдун (Китайская Народная Республика) Э. И. Коломиец награждена «Орденом Дружбы провинции Шаньдун» (2018).

Отделение биологических наук, коллектив сотрудников Института микробиологии НАН Беларуси, друзья и ученики сердечно поздравляют Эмилию Ивановну с юбилеем и желают крепкого здоровья, неиссякаемой энергии, творческого вдохновения, покорения новых научных вершин, семейного счастья и благополучия.

*А. В. Кильчевский, М. Е. Никифоров, А. Г. Лобанок, З. М. Алещенкова,  
Н. В. Сверчкова, Е. В. Болотник, А. В. Сидоренко,  
Т. В. Романовская, М. Н. Мандрик-Литвинкович*