

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2019. Т. 64, № 3

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2019. Т. 64, № 3

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, № 3.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

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

Подписано в печать 11.07.2019. Выход в свет 26.07.2019. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 80 экз. Заказ 166.
Цена номера: индивидуальная подписка – 11,81 руб., ведомственная подписка – 28,27 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. 3

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. Schwartau – 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. 3.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

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

Sent for press 11.07.2019. Output 26.07.2019. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 80 copies. Order 166.
Number price: individual subscription – 11,81 byn., departmental subscription – 28,27 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

Кондратов Е. В., Торчик В. И. Влияние возраста привоя, изолирующего материала и срока прививки на приживаемость представителей рода <i>Abies</i> Mill.....	263
Сафонова М. Е., Найдено И. А., Буко А. И. Физиолого-биохимические свойства штаммов бактерий <i>Lactococcus lactis</i> , выделенных из природных источников.....	268
Алехнович А. В. Обоснование годового вылова и промысловой меры, обеспечивающих оптимальный промысел длиннопалого рака <i>Pontastacus leptodactylus</i> в водоемах Беларуси.....	277
Вязов Е. В., Радюк М. С., Филипчик Е. А., Шалыго Н. В. PR-белки как маркеры устойчивости озимой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) к листовым патогенам.....	286
Евдокимова О. В., Чиндарева М. А., Валентович Л. Н. Характеристика плазмид бактерий <i>Bacillus pumilus</i> , изолированных на территории Беларуси.....	292
Ильина В. Н. Онтогенетическая структура и типы ценопопуляций копеечника крупноцветкового (<i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall.) в бассейне Средней Волги.....	302
Торчик В. И., Келько А. Ф., Холопук Г. А. Морфологические особенности декоративных форм можжевельника горизонтального (<i>Juniperus horizontalis</i> Moench.) в условиях Беларуси.....	311
Павловский Н. Б. Регенерационная способность разных сортов голубики высокорослой (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) при размножении зелеными черенками.....	319
Побойнев В. В., Хрусталёв В. В., Хрусталёва Т. А., Стожаров А. Н. Структурные переходы в смешанных классах белков.....	326
Чезлова О. Е., Волчек А. А. Выживаемость патогенных и условно-патогенных бактерий животноводческих стоков при различных способах их внесения на лугопастбищные травы.....	338
Рябцева Т. В., Макаревич Д. А., Ермола Е. М., Голубович В. П., Кирковский В. В. Молекулярное конструирование и виртуальный докинг олигопептидов для связывания и элиминирования из плазмы крови интерлейкина-6.....	350
Горбунов А. Б., Курлович Т. В., Снакина Т. И., Недовесова Т. А. Репродуктивная способность тетраплоидной брусники обыкновенной (<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.).....	359
Лозинская О. В., Мельнов С. Б., Сергеева Т. П., Кипень В. Н. Биоиндикационный подход к оценке экологического статуса территорий по морфологическим и цитогенетическим показателям растений.....	364

АГЛЯДЫ

Абашкин В. М., Галец-Буй И. В., Дмитрук О. Г., Брышевска М., Шербин Д. Г., Одабаши М., Ацет О., Онал Б., Оздемир Н. Гибридные металл-органические наночастицы и их применение в биотехнологии.....	374
---	-----

CONTENTS

Kandratau Y. V., Torchyk U. I. Influence of the scion age, insulating material and timing of grafting on grafts survival of <i>Abies</i> Mill. representatives	263
Safonova M. E., Naidenko I. A., Buko A. I. Physiological and biochemical characteristics of the <i>Lactococcus lactis</i> strains isolated from natural sources	268
Alekhovich A. V. Identification of the annual catch and fishing measures that ensure the optimal fishing of narrow-clawed crayfish <i>Pontastacus leptodactylus</i> in the waterbodies of Belarus	277
Viazau Y. V., Radyuk M. S., Filipchik E. A., Shalygo N. V. PR-proteins as markers of winter wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) resistance to leaf pathogens	286
Evdokimova O. V., Chindareva M. A., Valentovich L. N. Characteristic of plasmids of <i>Bacillus pumilus</i> isolated in Belarus	292
Ilyina V. N. Ontogenetic structure and types of cenopopulation of <i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall. in the middle Volga basin	302
Torchyk U. I., Kelko H. F., Kholopuk G. A. Morphological characteristics of creeping juniper cultivars (<i>Juniperus horizontalis</i> Moench.) when introduced in Belarus	311
Pavlovskiy N. B. Regeneration ability of different cultivars of the highbush blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) propagated by green stem cuttings	319
Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Stojarov A. N. Structural transitions in mixed classes of proteins	326
Chezlova O., Volchak A. Survival of fecal indicator bacteria in the grass phyllosphere when irrigated with livestock waste water	338
Ryabzeva T. V., Makarevich D. A., Ermola E. M., Golubovich V. P., Kirkovskiy V. V. Molecular design and virtual docking of oligopeptides for binding and elimination interleukin-6 from blood plasma	350
Gorbunov A. B., Kurlovich T. V., Snakina T. I., Nedovesova T. A. Reproductive ability of tetraploid cowberry (<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.)	359
Lozinskaya O. V., Melnov S. B., Sergeeva T. P., Kipen V. N. Bioindication approach to the ecological status of the territories by morphological and cytogenetic indicators of plants	364

REVIEWS

Abashkin V. M., Halets-Bui I. V., Dzmitruk V. G., Bryszewska M., Shcharbin D. G., Odabaşı M., Acet Ö., Önal B., Özdemir N. Hybride metall-organic nanoflowers and their applications in biotechnology	374
--	-----

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 630*232.328.5:630*17:582.475

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-263-267>

Поступила в редакцию 06.12.2018

Received 06.12.2018

Е. В. Кондратов, В. И. Торчик

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ПРИВОЯ, ИЗОЛИРУЮЩЕГО МАТЕРИАЛА И СРОКА ПРИВИВКИ НА ПРИЖИВАЕМОСТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ABIES* MILL.

Аннотация. Представлены результаты сравнительного исследования влияния возраста привоя, изолирующего материала и сроков прививки на приживаемость представителей рода *Abies* Mill. Установлено, что представители рода *Abies* Mill. обладают высокой регенерационной способностью, что позволяет использовать в качестве привоя 2–4-летние черенки. Оптимальным подвоем являются видовые растения пихты корейской и цельнолистной. Спящие почки, а также почки, закрытые изолирующим материалом, не следует удалять, так как в последующем они трогаются в рост и участвуют в формировании кроны привоя. Приживаемость прививок существенно повышается при использовании в качестве изолирующего материала фоторазрушаемой ленты Buddy Tape, а при прививке в условиях открытого грунта – при защите прививаемых растений притеночной сеткой.

Ключевые слова: *Abies* Mill., спонтанные соматические мутации, «ведьмина метла», прививка, приживаемость

Для цитирования: Кондратов, Е. В. Влияние возраста привоя, изолирующего материала и срока прививки на приживаемость представителей рода *Abies* Mill. / Е. В. Кондратов, В. И. Торчик // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 263–267. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-263-267>

Y. V. Kandratau, U. I. Torchyk

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

INFLUENCE OF THE SCION AGE, INSULATING MATERIAL AND TIMING OF GRAFTING ON GRAFTS SURVIVAL OF *ABIES* MILL. REPRESENTATIVES

Abstract. In the article are presented the results of a comparative study of the effect of the scion age, insulating material and timing of grafting on the survival of representatives of the genus *Abies* Mill. It is established that representatives of the genus *Abies* Mill. have a high regenerative capacity, which allows the use of 2–4 years cuttings as a scion. The optimal stocks are species of Korean fir and Manchurian fir plants. Sleeping buds, as well as the buds covered with insulating material, should not be removed, as they subsequently start to grow and form the scion crown. The use of photodegradable Buddy Tape as an insulating material significantly increases the survival rate of grafts, and when grafting in open ground conditions, protect grafted plants with a shade tissue.

Keywords: *Abies* Mill., spontaneous somatic mutation, “witches’ broom”, graft, survival rate

For citation: Kandratau Y. V., Torchyk U. I. Influence of the scion age, insulating material and timing of grafting on grafts survival of *Abies* Mill. representatives. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 263–267 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-263-267>

Введение. В практике декоративного садоводства прививка, или трансплантация, используется как для размножения существующих декоративных форм хвойных растений, так и для создания новых культиваров на основе спонтанных соматических мутаций. Причем привойный материал зачастую тонкий и небольшого размера, что значительно затрудняет процесс прививки общеизвестными методами, основанными на использовании в качестве привоя черенков, заготовленных из однолетних побегов [1, 2].

В этой связи актуальными являются исследования по изучению возможности использования в качестве привоя побегов более старшего возраста, что позволяет при обеспечении высокой приживаемости прививок сократить период выращивания стандартного посадочного материала привитых растений. Такой подход был апробирован сотрудниками Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина РАН при размножении декоративных форм лиственных пород: *Quercus robur*

‘Fastigiata’, *Tilia platyphyllos* ‘Laciniata’ и *Acer platanoides* ‘Globosum’. Использование в качестве привоя 2–3-летних ветвей и ФАВ для улучшения срастания прививочных компонентов позволило сократить период выращивания привитого растения ровно на столько лет, сколько лет имел привой в момент прививки [1].

Почти аналогичный метод ранее предложил Е. П. Проказин для размножения плюсовых деревьев сосны. Однако при использовании в качестве привоя 2–3-летних ветвей он рекомендовал удалять на них все боковые побеги. Помимо этого, по его мнению, нужно оставлять только 8–12 пучков хвои в верхней части, а сам срез начинать сразу под оставленной хвоей, захватывая лезвием 2–3 пучка, и проводить через сердцевину 1-, 2- или 3-летнего побега [3]. Однако недостатком такого метода является удаление с привоя всех побегов, которые впоследствии образуют крону. В результате привой приобретает форму, схожую с однолетним привоем, но содержит более старые участки побега.

Цель настоящей работы – изучение приживаемости прививок у представителей рода *Abies* Mill. в зависимости от используемого изолирующего материала, срока прививки и возраста привоя.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования были спонтанные соматические мутации типа «ведьмина метла» пихты корейской, пихты Фразера, пихты Вича, пихты сибирской, декоративная форма пихты корейской «Доктор Шкутко».

В качестве привоя использовали черенки с 2-, 3- и 4-летним приростом. Контролем служили прививки однолетними черенками. За 1–2 дня до прививки заготавливали прививочный материал в виде крупных 5–6-летних фрагментов кроны, которые затем плотно упаковывали в целлофановый пакет и хранили в холодильнике. Привои готовили непосредственно перед прививкой.

Подвоем служили 5-летние саженцы пихты корейской и цельнолистной с закрытой корневой системой. В зимнее время подвои до прививки помещали в отапливаемую теплицу, в которой поддерживалась круглосуточная температура 20–25 °С. Прививку проводили сердцевинной на камбий с началом набухания почек на подвоях, при этом температуру в теплице поддерживали на том же уровне. В августе прививку проводили как без притенки (табл. 1), так и под притенкой, используя затеняющую сетку со степенью затенения 55 % (табл. 2). Изолирующим материалом служили эластичная полиэтиленовая пленка, нарезанная на 1 см ширины полоски, и фоторазрушаемая прививочная лента Buddy Tape. Первую примерно через 30 дней со дня прививки ослабляли и удаляли весной следующего года.

Прижившимися считали прививки, которые дали полноценный прирост и сформировали почки.

Результаты и их обсуждение. Как видно из табл. 1, приживаемость прививок зависела как от типа изоляции, так и от возраста привоя. Так, приживаемость однолетних привоев, изоляция которых проводилась прививочной лентой Buddy Tape, была на 22,7 % выше, чем прививок, для изоляции которых использовали полиэтиленовую пленку (табл. 1).

В свою очередь приживаемость прививок, выполненных однолетними черенками, оказалась на 16,7 % ниже, чем у прививок с использованием в качестве привоя двухлетних побегов с сохранением на них системы ветвления, хвои и почек. Наблюдались также различия в приживаемости прививок, выполненных двухлетними черенками, но с использованием различных материалов для их изоляции. Приживаемость прививок с использованием в качестве изолирующего материала фоторазрушаемой прививочной ленты была выше на 12,1 %, чем при изоляции эластичной полиэтиленовой пленкой.

Т а б л и ц а 1. Влияние возраста привоя и изолирующего материала на приживаемость прививок пихты корейской «Доктор Шкутко»

Table 1. Influence of the graft age and the insulating material on the survival rate of grafts of Korean fir “Dr. Shkutko”

Привой	Подвой	Возраст привоя, лет	Изолирующий материал	Приживаемость, %
<i>Abies koreana</i> «Доктор Шкутко»	<i>Abies koreana</i>	1	Эластичная полиэтиленовая пленка	27,3 ± 3,2
		1	Фоторазрушаемая прививочная лента Buddy Tape	50 ± 6,9
		2	Эластичная полиэтиленовая пленка	54,6 ± 11,3
		2	Фоторазрушаемая прививочная лента Buddy Tape	66,7 ± 5,9

Более высокая приживаемость прививок как однолетними, так и двулетними побегами, при изоляции которых использовалась фоторазрушаемая прививочная лента Buddy Tape, обусловлена, по-видимому, высокой эластичностью последней, которая обеспечивает более плотную изоляцию места прививки на протяжении периода приживаемости и не вызывает необходимости ослаблять изоляцию, как при использовании полиэтиленовой пленки. В последнем случае возможно нарушение контакта между привоем и подвоем, что ведет к снижению приживаемости прививок.

Более высокая приживаемость прививок при использовании в качестве привоя двулетних черенков по сравнению с использованием однолетних, вероятно, обусловлена большим запасом в них питательных веществ, а также возможностью более точного совмещения тканей привоя и подвоя. В связи с этим были заложены опыты по изучению приживаемости прививок, выполненных с использованием привоя 1–4-летнего возраста. В качестве подвоя использовали видо-вые растения *Abies koreana* и *Abies holophylla* (табл. 2).

Таблица 2. Влияние срока прививки и возраста привоя на приживаемость прививок у представителей рода *Abies* Hill.

Table 2. Impact of vaccination time and age of graft on vaccination survival rate representatives of the genus *Abies* Hill.

Срок прививки	Подвой	Привой	Возраст привоя, лет	Приживаемость, %
Август	<i>Abies koreana</i>	<i>Abies koreana</i> «Доктор Шкутко»	1	95,9 ± 3,3
			2	100 ± 0
			3	100 ± 0
		<i>Abies fraseri</i> «ВМ»	1	100 ± 0
			2	100 ± 0
Февраль	<i>Abies holophylla</i>	<i>Abies koreana</i> «ВМ» «Доктор Шкутко»	1	91,3 ± 5,8
			2	100 ± 0
			3	83,3 ± 5,1
	<i>Abies koreana</i>	<i>Abies koreana</i> «Доктор Шкутко»	1	95,7 ± 2,9
			2	100 ± 0
		<i>Abies koreana</i> «ВМ»	1	50,8 ± 8,6
			2	71,4 ± 6,5
		<i>Abies sibirica</i> «ВМ»	1	100 ± 0
			2	100 ± 0
		<i>Abies veitchii</i> «ВМ»	1	100 ± 0
			2	100 ± 0
			3	100 ± 0
			4	100 ± 0
		<i>Abies fraseri</i> «ВМ»	1	90,0 ± 5,5
2	100 ± 0			

Анализ данных табл. 2 показал, что в большинстве вариантов приживаемость прививок, выполненных 2-, 3- и 4-летними привоями, выше, чем у привитых 1-летним привоем. Исключение составляет прививка пихты корейской «Доктор Шкутко» в феврале в условиях отапливаемой теплицы на подвой пихты цельнолистной. В этом варианте приживаемость растений, привитых трехлетним черенком, на 8 % ниже, чем однолетним, и на 16,7 % ниже, чем двулетним. Это обусловлено, по-видимому, некоторым влиянием тепличных условий при проведении прививки. В то же время прививка, выполненная 1–4-летними черенками «ведьминой метлы» пихты Вича на подвой пихты корейской, оказалась весьма успешной, что свидетельствует о хорошей совместимости привоя и подвоя, а также о высокой регенерационной способности черенков «ведьминой метлы» пихты Вича. Таким образом, использование в качестве привоя 2–4-летних побегов в большинстве случаев позволяет не только сократить сроки получения привитых саженцев пихты на 1–3 года (рис. 1), но и существенно упростить прививку, исключив использование тонких 1-летних черенков, которые часто не пригодны для прививки стандартными методами.



Рис. 1. Однолетние растения из «ведьминой метлы» пихты Вича, привитые однолетним (a), двухлетним (b), трехлетним (c) и четырехлетним (d) черенками

Fig. 1. Annual plants from the witch broom of the Wichi fir grafted on annual (a), two-year (b), three-year (c) and four-year (d) cuttings



Рис. 2. Спящие почки (a), образовавшие побеги после снятия изоляционного материала (b)

Fig. 2. Dormant buds (a), which formed shoots after removal of the insulating material (b)

Помимо этого, такой метод позволяет получать высокую приживаемость прививок в августе в открытом грунте и в феврале в условиях отапливаемой теплицы (см. табл. 2).

Оценка приживаемости в летний период в открытом грунте показывает, что использование притенки при прививке оказывает существенное влияние на приживаемость (табл. 2). Так, в первом варианте (без затеняющей сетки, см. табл. 1) приживаемость варьируется от 27,3 до 66,7 %, во втором – от 95,9 до 100 %.

Визуальный осмотр привитых весной предыдущего года растений, у которых в качестве привоя использовали все типы черенков, показал, что при прививке представителей рода *Abies* Mill. не следует удалять почки, которые во время прививки оказываются под обмоткой, как рекомендуют некоторые исследователи [3]. Эти почки в следующем году трогаются в рост и участвуют в формировании кроны (рис. 2).

Следует отметить, что более внимательное обследование привитых растений показало большое количество спящих нераспустившихся почек, не находящихся под обмоткой. На следующий год эти почки, как и почки, оказавшиеся под обмоткой, дают полноценный прирост, что также ведет к уплотнению кроны.

Заключение. Представители рода *Abies* Mill. отличаются высокой регенерационной способностью, что позволяет при размножении прививкой использовать в качестве привоя 2–4-летние черенки. Оптимальным подвоем при размножении «ведьминых метел» и декора-

тивных форм являются видовые растения пихты корейской и цельнолистной, обеспечивающие приживаемость свыше 70 %.

Установлено, что при проведении прививочной операции удаление спящих почек на привое, а также почек, закрытых изолирующим материалом, нецелесообразно ввиду их последующего роста и участия в формировании кроны нового растения. Использование в качестве изоляции прививок фоторазрушаемой ленты Buddy Tape существенно повышает приживаемость привитых растений. Положительное влияние на приживаемость в открытом грунте оказывает притенение.

Список использованных источников

1. Кристьяев, М. Т. Биологические основы прививки древесных растений / М. Т. Кристьяев, И. А. Бондорина, С. А. Протас. – М. : Т-во науч. изданий КМК, 2014. – 164 с.
2. Федоров, А. В. Фундаментальные основы использования прививки в роде *Pinus* в целях интродукции и сохранения биоразнообразия / А. В. Федоров, Д. А. Зорин. – Ижевск : Шелест, 2017. – 84 с.
3. Проказин, Е. П. Новый метод прививки хвойных для создания семенных участков / Е. П. Проказин // Лесное хоз-во. – 1960. – № 5. – С. 22–28.

References

1. Krist'ev M. T., Bondorina I. A., Protas S. A. *Biological basis of grafting woody plants*. Moscow, Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2014. 164 p. (in Russian).
2. Fedorov A. V., Zorin D. A. *Fundamentals of the use of vaccination in the genus Pinus for the purposes of introduction and preservation of biodiversity*. Izhevsk, Shelest Publ., 2017. 84 p. (in Russian).
3. Prokazin E. P. New method of grafting conifers to create seed plots. *Lesnoye khozyaistvo* [Forestry], 1960, no. 5, pp. 22–28 (in Russian).

Информация об авторах

Кондратов Евгений Валерьевич – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kondratov.20144@mail.ru

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

Information about the authors

Yauhen V. Kondratau – Junior researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kondratov.20144@mail.ru

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

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.22+579.67
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-268-276>

Поступила в редакцию 30.07.2018
Received 30.07.2018

М. Е. Сафонова, И. А. Найденко, А. И. Буко

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Аннотация. Изучены физиолого-биохимические свойства (активность роста и кислотообразования, протеолитическая активность, устойчивость к NaCl, антагонистическая активность) выделенных из природных источников Беларуси штаммов молочнокислых бактерий вида *Lactococcus lactis*, перспективных для использования в качестве заквасочных культур для ферментированных кисломолочных продуктов и сыров.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Lactococcus lactis*, физиолого-биохимические свойства, активность кислотообразования, ферментированные кисломолочные продукты

Для цитирования: Сафонова, М. Е. Физиолого-биохимические свойства штаммов бактерий *Lactococcus lactis*, выделенных из природных источников / М. Е. Сафонова, И. А. Найденко, А. И. Буко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 268–276. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-268-276>

M. E. Safonova, I. A. Naidenko, A. I. Buko

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

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE *LACTOCOCCUS LACTIS* STRAINS ISOLATED FROM NATURAL SOURCES

Abstract. The data have been presented on physiological and biochemical properties (growth, acidogenic, proteolytic and antagonistic activity, resistance to NaCl) of lactic acid bacterial strains of *Lactococcus lactis* isolated from Belarus natural sources. These strains are promising for use as starter cultures for fermented dairy products, cheese.

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, physiological and biochemical characteristics, acidogenic activity, fermented dairy products

For citation: Safonova M. E., Naidenko I. A., Buko A. I. Physiological and biochemical characteristics of the *Lactococcus lactis* strains isolated from natural sources. *Vesti Natsyunal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 268–276 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-268-276>

Введение. Представители вида *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) – грамположительные неподвижные неспорообразующие аэротолерантные гомоферментативные молочнокислые бактерии, относящиеся к семейству Streptococcaceae. В окружающей среде они распространены достаточно широко: встречаются на растительных субстратах, в желудочно-кишечном тракте животных, а также в молочных продуктах и на оборудовании и материалах, связанных с их производством. Клетки этих микроорганизмов овальные, размером $(0,5-1,2) \times (0,5-1,5)$ мкм, расположены одиночно, парами или в цепочках, по Граму окрашиваются положительно [1, 2].

Ввиду отсутствия данных о плохой переносимости и о нежелательных реакциях при длительном применении *L. lactis* этим микроорганизмам присвоен статус GRAS (Generally Regarded as Safe), что свидетельствует о международном признании безопасности лактококков и о возможности их неограниченного использования в пищевой и фармацевтической промышленности [2, 3].

Подвиды *L. lactis* – представители наиболее часто и широко применяемых в пищевой промышленности молочнокислых бактерий. Лактококки входят в большинство стартовых заквасок для производства сыров, используются при получении разнообразных молочных продуктов. Метаболические особенности штаммов *L. lactis* оказывают прямое и опосредованное влияние на

органолептические, питательные свойства и гигиеническое качество готовых продуктов. Для штаммов, входящих в состав заквасок, кроме кислотообразования важны такие свойства, как протеолитическая активность, антагонизм по отношению к патогенным и вызывающим порчу микроорганизмам, фагоустойчивость, ароматообразование, осмолотерантность и др. В связи с увеличением в последнее время спроса на продукты с функциональными свойствами и приданием здоровому питанию статуса одного из важнейших национальных приоритетов предъявляются дополнительные требования к используемым в процессе производства культурам молочнокислых бактерий [4, 5]. Богатыми источниками выделения природных штаммов лактококков, обладающих производственно ценными свойствами, являются молоко, а также простокваша и другие ферментированные продукты спонтанного брожения [6, 7].

Выделение и характеристика бактерий *L. lactis* является актуальной задачей, поскольку селекция новых штаммов дает возможность расширять ассортимент и выпускать новые виды продуктов с желаемыми органолептическими и функциональными характеристиками, а также при необходимости проводить ротацию заквасочных культур.

Цель работы – сравнение физиолого-биохимических (активность роста и кислотообразования, протеолитическая активность, устойчивость к NaCl, антагонистическая активность, утилизация сахаров) свойств новых штаммов бактерий *L. lactis*, выделенных из природных источников Беларуси.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили бактерии трех штаммов – *L. lactis* T8, *L. lactis* KM1, *L. lactis* 4/4с, выделенные из образцов спонтанно сквашенного непастеризованного коровьего и козьего молока и творога из индивидуальных хозяйств пригородов Минска [8].

Выделение, первичную идентификацию и изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий проводили общепринятыми методами [9, 10]. Чистые культуры молочнокислых бактерий поддерживали на модифицированной среде MRS с 1 % лактозы или глюкозы и 10 %-ном обезжиренном молоке [11].

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили методом полимеразной цепной реакции. В качестве матрицы использовали тотальную ДНК исследуемых бактерий. Выделение тотальной ДНК осуществляли при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва). Для визуализации результатов применяли электрофорез. Амплификацию 16S рРНК осуществляли с помощью праймеров 8f-seq (прямой праймер) и 1492r-Seq (обратный праймер). Для секвенирования амплифицированных последовательностей ампликоны лигировали в вектор рJET1.2, который затем со вставкой трансформировали в *E. coli* XL-1 Blue. После этого выделяли плазмидную ДНК и проверяли наличие вставки при помощи рестрикции вектора по сайту BglII. Полученные продукты разделяли при помощи электрофореза. Для секвенирования генов 16S рРНК исследуемых образцов использовали праймер рJET-F. При идентификации полученных секвенированных последовательностей 16S рРНК исследуемых микроорганизмов использовали данные GeneBank.

Для определения оптимальной температуры роста бактерии культивировали на среде MRS при 28, 37 и 43 °С. Оптическую плотность культуральной жидкости измеряли турбидиметрически на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 590 нм после 24 ч термостатирования.

Изучение динамики роста, а также активности кислотообразования выделенных бактерий проводили путем культивирования их в 10 %-ном стерильном обезжиренном молоке. В качестве посевного материала использовали 5 об.% 18-часовой культуры бактерий, выращенной на среде MRS. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом предельных разведений при высеве на слабоагаризованную питательную среду. Отбор проб для определения числа КОЕ, активной и титруемой кислотности производили каждые 3 ч в течение суток. Активную кислотность (рН) измеряли потенциометрически. Титруемую кислотность культуральной жидкости определяли титрометрическим методом. Результаты выражали в градусах Тернера (°Т).

Антагонистическую активность определяли методом лунок и совместного культивирования в жидких питательных средах [12].

Протеолитическую активность выделенных культур оценивали по методике Белозерского в модификации ВНИМИ, определяя накопление в молоке свободных аминокислот тирозина и триптофана с использованием реактива Фолина. Результат выражали в мкмоль тирозина/мл молока [13].

Определение активности протеолитических ферментов осуществляли с помощью модифицированного метода Ансона [14], используя в качестве субстрата 2 %-ный раствор казеината натрия в 0,2 М фосфатном буфере, pH 8,0. За единицу протеолитической активности принимали количество фермента, которое за 1 мин при 37 °С катализирует переход в неосаждаемое ТХУ состояние такого количества казеина, которое содержит 1 мкмоль тирозина; продукцию протеиназы выражали в условных ед/г сухой биомассы.

Все эксперименты выполнены в трехкратной повторности, приведены средние значения данных.

Результаты и их обсуждение. Бактерии *L. lactis* T8, *L. lactis* KM1 и *L. lactis* 4/4с выделены из образцов спонтанно сквашенного коровьего и козьего молока и творога. Полученные культуры имели типичные для лактококков признаки, при глубинном росте на жидкой питательной среде MRS накапливали кислые продукты метаболизма. Сферические или овальные клетки в цепочках различной длины положительно окрашивались по Граму, спор не образовывали. Тест на гидролиз аргинина с образованием аммиака положительный, образования газа из глюкозы не отмечалось. В результате молекулярно-генетического метода типирования исследуемые микроорганизмы были идентифицированы как *L. lactis*.

Основополагающими критериями для отбора перспективных для промышленного использования штаммов являются активный рост и накопление необходимых метаболитов. Изучение особенностей роста и кислотообразования выделенных лактококков позволило выявить штаммовые различия. Так, при исследовании влияния температуры на накопление биомассы бактериями *L. lactis* установлено, что для всех изучаемых культур температурный оптимум составляет 28 °С. Спустя 24 ч культивирования на среде MRS при оптимальной температуре самым активным по накоплению биомассы оказался штамм *L. lactis* 4/4с, а при повышении температуры культивирования до 37 и 43 °С у бактерий штамма *L. lactis* T8 накопление биомассы уменьшалось в 4,4 и 15,5 раза соответственно. Клетки штаммов *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1 при повышении температуры культивирования также накапливали меньше биомассы, однако различия были не такими выраженными (рис. 1).

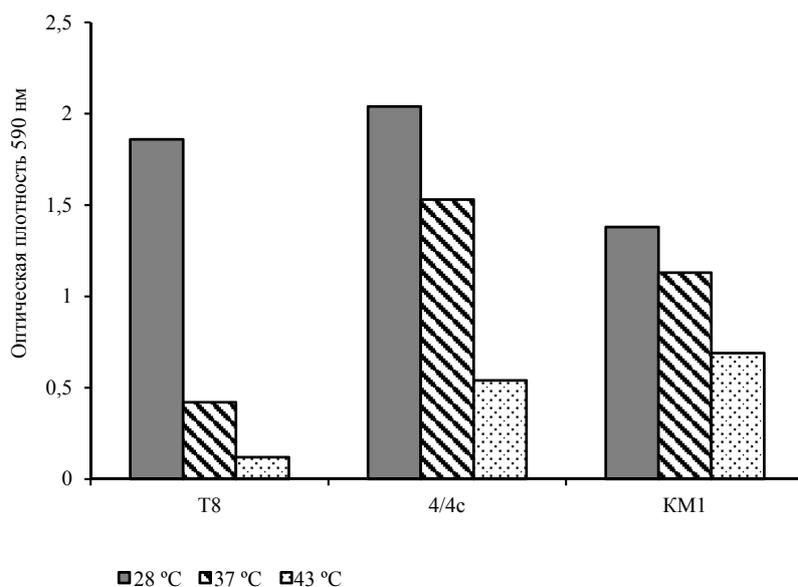


Рис. 1. Влияние температуры культивирования на накопление биомассы клетками штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1 на среде MRS

Fig. 1. Influence of the culture temperature on the biomass accumulation by strains of *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с and *L. lactis* KM1 on MRS medium

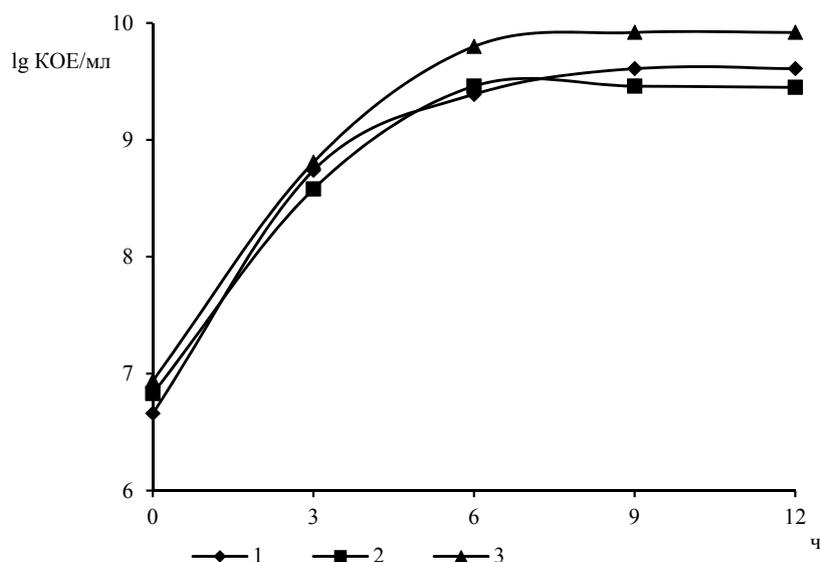


Рис. 2. Динамика роста бактерий *L. lactis* при культивировании в молоке:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Fig. 2. Dynamics of growth of *L. lactis* strains during milk cultivation:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Изучение динамики роста *L. lactis* T8, *L. lactis* KM1 и *L. lactis* 4/4c при культивировании в обезжиренном молоке показало, что у всех исследуемых штаммов активное увеличение количества жизнеспособных клеток происходит в первые 9 ч развития популяции бактерий и составляет $4,1 \cdot 10^9$, $2,9 \cdot 10^9$ и $8,3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно (рис. 2). Значение числа КОЕ/мл остается неизменным и спустя 24 ч культивирования, а через 72 ч снижается до $3,0 \cdot 10^8$, $2,8 \cdot 10^8$ и $1,8 \cdot 10^8$ (данные на рисунке не представлены). Как видно из рис. 2, кривые роста изучаемых культур почти совпадают. Значения константы скорости деления клеток (v) в период экспоненциального роста культур также близки: у *L. lactis* T8 – $1,52 \text{ ч}^{-1}$, у *L. lactis* KM1 – $1,46$, у *L. lactis* 4/4c – $1,57 \text{ ч}^{-1}$. Параметры экспоненциального роста исследуемых культур близки к соответствующим показателям штаммов лактококков, традиционно используемых в молочной промышленности [15, 16].

Активность кислотообразования является одной из важнейших характеристик заквасочных культур. Накопление органических кислот (преимущественно молочной) в результате брожения, осуществляемого молочнокислыми бактериями, приводит к снижению pH молока и образованию молочного сгустка. В процессе изготовления сыра вносимые заквасочные культуры создают оптимальные условия для действия сычужного фермента. Кроме того, молочная кислота предотвращает развитие нежелательных и вызывающих порчу микроорганизмов, а также влияет на характер и выраженность ферментативных превращений в ходе созревания, участвует в формировании вкуса и аромата готового продукта [17–21].

При изучении накопления кислых продуктов метаболизма в процессе роста исследуемых штаммов в обезжиренном молоке выяснилось, что активное снижение pH происходит в период логарифмической фазы роста всех культур и продолжается в стационарной фазе. Спустя 24 ч культивирования активная кислотность культуральной жидкости во всех вариантах снизилась до pH 4,2 (рис. 3).

Данные о кислотообразующей активности выделенных штаммов лактококков, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что все исследуемые культуры являются активными кислотообразователями – уже через 6 ч культивирования pH в обезжиренном молоке снижается на 1,34–1,65 ед. Согласно литературным сведениям, доля штаммов – активных кислотообразователей, выделяемых в разных регионах из молочных продуктов и сыров, колеблется от единичных случаев до 35–40 % [22–25].

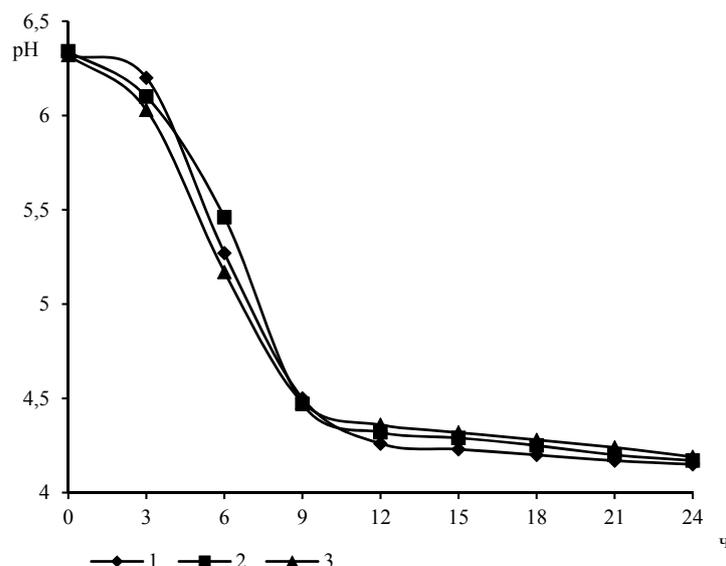


Рис. 3. Кислотообразование в процессе роста бактерий *L. lactis* в молоке:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Fig. 3. Acidification during growth of *L. lactis* strains in milk:
1 – *L. lactis* T8, 2 – *L. lactis* KM1, 3 – *L. lactis* 4/4c

Т а б л и ц а 1. Кислотообразующая активность бактерий *L. lactis*
при культивировании в обезжиренном молоке

Table 1. Acidogenic activity of *L. lactis* strains during cultivation in skim milk

Штамм	pH в зависимости от времени культивирования			
	0 ч	6 ч	24 ч	7 сут
<i>L. lactis</i> T8	6,39	4,76	4,28	4,19
<i>L. lactis</i> 4/4c	6,36	4,97	4,39	4,31
<i>L. lactis</i> KM1	6,09	4,63	4,14	4,09

Важной характеристикой штаммов, применяемых в составе заквасок для ферментированных молочных продуктов и сыров, является также протеолитическая активность. Гидролиз белков молока происходит под действием протеиназ и пептидаз молочнокислых бактерий и способствует накоплению в молоке продуктов реакции – пептидов и аминокислот, благодаря чему ферментированные молочные продукты приобретают большую питательную ценность, лучше усваиваются, уменьшается их аллергенность. Кроме того, аминокислоты являются предшественниками ароматобразующих соединений (спиртов, альдегидов, кислот, эфиров и серосодержащих соединений), которые играют существенную роль в формировании характерного вкуса и аромата ферментированных продуктов [18, 26].

Выявлены различия изучаемых штаммов лактококков в накоплении продуктов гидролиза казеина в обезжиренном молоке (рис. 4). Наиболее высокую активность показал штамм *L. lactis* T8: содержание свободных аминокислот (в пересчете на тирозин) в анализируемых образцах составило 0,74 мкмоль/мл через 24 ч и 1,08 мкмоль/мл через 168 ч.

Установлено, что продукция протеолитических ферментов у *L. lactis* T8 связана с экспоненциальной фазой роста культуры. Процессы роста и образования протеиназ совпадают во времени (рис. 5).

К технологически ценным свойствам заквасочных культур относятся солеустойчивость, антагонистическая активность в отношении патогенных и вызывающих порчу микроорганизмов. Установлено, что исследуемые штаммы лактококков хорошо росли при внесении 4 % NaCl в среду культивирования: накопление биомассы через 48 ч роста составило 65–70 % по сравнению с контролем (среда без внесения NaCl). Увеличение концентрации вносимой соли до 6,5 % при-

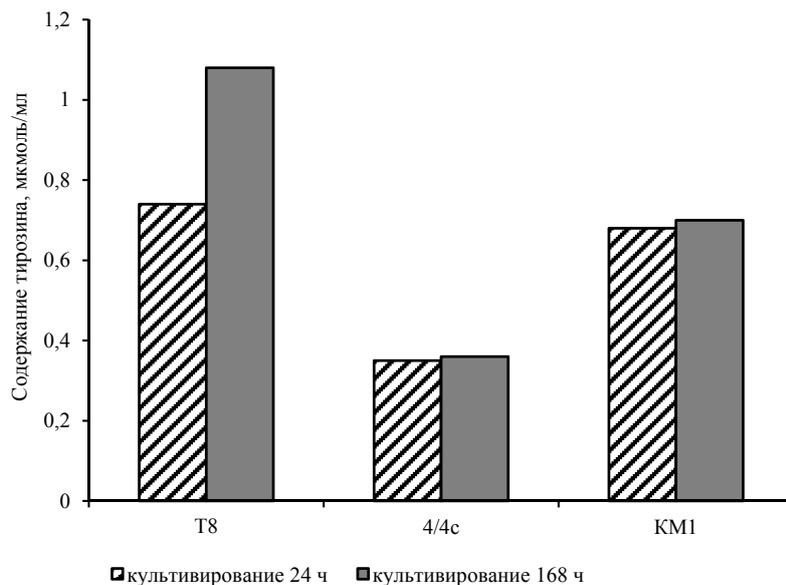


Рис. 4. Протеолитическая активность бактерий штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4c и *L. lactis* KM1 в молоке

Fig. 4. Proteolytic activity of strains of *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4c and *L. lactis* KM1 in milk

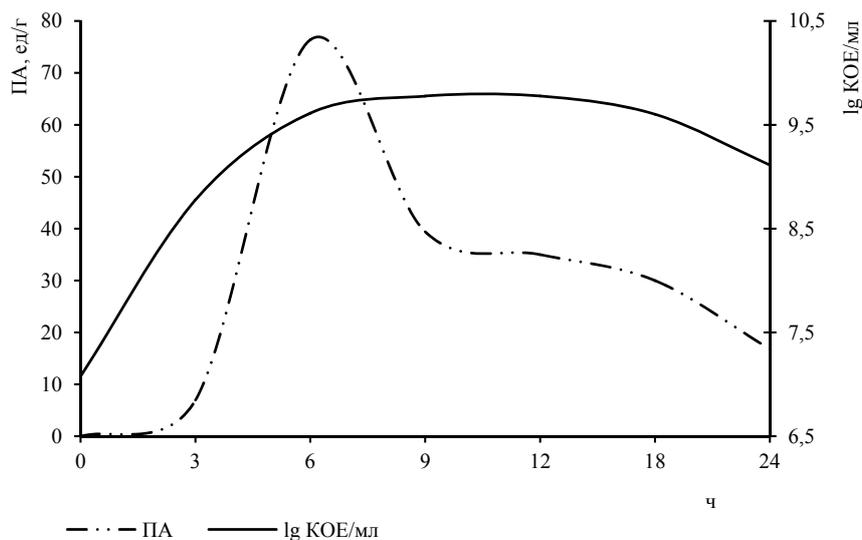


Рис. 5. Динамика роста и продукция протеолитических ферментов *L. lactis* T8 на среде MRS

Fig. 5. Dynamics of growth and production of proteolytic enzymes of *L. lactis* T8 on MRS medium

вело к угнетению роста (рост около 20 % от контроля) и подавлению ацидогенеза лактококков. Штаммы *L. lactis* T8 и *L. lactis* KM1 подавляли рост *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus*. Полученные данные согласуются с литературными сведениями о корреляции антагонистической активности молочнокислых бактерий с накоплением большого количества кислых продуктов метаболизма [27].

На качество некоторых молочных продуктов значительное влияние оказывает способность молочнокислых бактерий сбраживать не только лактозу, но и другие углеводы [28]. Выделенные штаммы лактококков различались по спектру утилизируемых углеводов. Все исследуемые культуры хорошо утилизировали глюкозу, лактозу, фруктозу, галактозу и мальтозу. Ни один из штаммов не утилизировал рафинозу и рамнозу. Сахарозу сбраживал только штамм *L. lactis* T8, а ксилоту – *L. lactis* 4/4c (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Утилизация углеводов бактериями штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1T a b l e 2. Utilization of carbohydrates by strains of *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с and *L. lactis* KM1

Углевод	<i>L. lactis</i> T8	<i>L. lactis</i> 4/4с	<i>L. lactis</i> KM1
Глюкоза	+++	+++	+++
Фруктоза	+++	+++	+++
Сахароза	+++	–	–
Лактоза	+++	+++	+++
Мальтоза	+++	+++	+
Галактоза	+++	+++	+++
Целобиоза	+	+++	–
Рафиноза	–	–	–
Ксилоза	–	+++	–
Рамноза	–	–	–

П р и м е ч а н и е. Утилизация: «+++» – хорошая, «+» – медленная, «–» – отсутствует.

Заключение. Изучение физиолого-биохимических свойств бактерий штаммов *L. lactis* T8, *L. lactis* 4/4с и *L. lactis* KM1, выделенных из образцов коровьего и козьего молока спонтанного брожения и творога, показало, что исследованные лактококки активно растут в молоке ($v = 1,46–1,57 \text{ ч}^{-1}$), осмоотолерантны (устойчивы к 4 %-ному NaCl), являются активными кислотообразователями (быстро снижают pH до значения менее 4,7), а также позволяют выявить антагонистически активные по отношению к *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* штаммы T8 и KM1. Полученные данные о свойствах выделенных лактококков важны при подборе штаммов в состав стартовых культур для ферментированных кисломолочных продуктов и сыров.

Список использованных источников

1. Bergey's Manual of systematic bacteriology / P. Vos [et al.]. – 2nd ed. – New York : Springer-Verlag, 2009. – 1422 p.
2. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: in 7 vol. / ed. : M. Dworkin (editor-in-chief) [et al.]. – 3rd ed. – New York : Springer-Verlag, 2006. – Vol. 4 : Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. – 1140 p.
3. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation / S. Wessels [et al.] // Trends Food Sci. Technol. – 2004. – Vol. 15, N 10. – P. 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>
4. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin / E. H. E. Ayad [et al.] // Int. Dairy J. – 1999. – Vol. 9, N 10. – P. 725–735. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(99\)00140-5](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(99)00140-5)
5. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481 / J. C. Piard [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58, N 1. – P. 279–284.
6. Microbes from raw milk for fermented dairy products / J. Wouters [et al.] // Int. Dairy J. – 2002. – Vol. 12, N 2–3. – P. 91–109. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00151-0)
7. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese / J. A. Centero [et al.] // J. Dairy Sci. – 2002. – Vol. 85, N 12. – P. 3164–3172. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74404-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74404-4)
8. Сафонова, М. Е. Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников / М. Е. Сафонова, И. А. Найденко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / ред. : Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2015. – Т. 7. – С. 69–80.
9. Квасников, Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников, О. А. Нестеренко. – М. : Наука, 1975. – 384 с.
10. Методы общей бактериологии : в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М. : Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
11. Man de, J. S. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. S. de Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23, N 1. – P. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
12. Егоров, Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М. : Высш. шк., 1965. – 211 с.
13. Грудзинская, Э. И. Выбор методики для определения протеолитической активности молочнокислых бактерий и заквасок / Э. Е. Грудзинская, А. К. Максимова // Тр. ВНИМИ. – 1974. – Вып. 33. – С. 58–64.
14. Anson, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin / M. L. Anson // J. Gen. Physiol. – 1938. – Vol. 22, N 1. – P. 79–83. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>

15. Flambard, B. Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk / B. Flambard, J. Richard, V. Juillard // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 6. – P. 2131–2135.
16. Helinck, S. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on the type of enzyme / S. Helinck, J. Richard, V. Juillard // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 6. – P. 2124–2130.
17. Buckenhuskes, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities / H. J. Buckenhuskes // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1993. – Vol. 12, N 1–3. – P. 253–272. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90067-j](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90067-j)
18. Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects / P. F. Fox [et al.] // *Advances in food and nutrition research.* – 1996. – Vol. 39. – P. 163–305. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60075-3](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60075-3)
19. Hansen, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future / E. B. Hansen // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002. – Vol. 78, N 1–2. – P. 119–131. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00238-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00238-6)
20. Leroy, F. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry / F. Leroy, L. De Vuyst // *Trends in Food Sci. Technol.* – 2004. – Vol. 15, N 2. – P. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
21. Identification and technological characterization of *Lactococcus* isolated from traditional Turkish cheeses / R. Cibik [et al.] // *Revue Med. Vet.* – 2010. – Vol. 161, N 11. – P. 509–514.
22. Technological characterization of lactococci isolated from traditional Chinese fermented milks / C. Ma [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2011. – Vol. 94, N 4. – P. 1691–1696. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3738>
23. Cultivable lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk and their proteolytic activity / M. Moulay [et al.] // *World J. Dairy Food Sci.* – 2006. – Vol. 1, N 1. – P. 12–18.
24. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study / P. Piraino [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.002>
25. Smit, G. Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese product / G. Smit, B. A. Smit, W. J. M. Engels // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29, N 3. – P. 591–610. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.002>
26. Caplice, E. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation / E. Caplice, G. F. Fitzgerald // *Int. J. Food Microbiol.* – 1999. – Vol. 50, N 1–2. – P. 131–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00082-3)
27. Lindgren, S. E. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations / S. E. Lindgren, W. J. Dobrogosz // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1990. – Vol. 7, N 1–2. – P. 149–163. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90703-s](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90703-s)
28. Онопрійко, А. В. Технологія молочних продуктів міні-виробництва / А. В. Онопрійко, А. Г. Храмов, В. А. Онопрійко. – Ростов-н/Д : Март, 2004. – 411 с.

References

1. Vos P., Garrity G., Gones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K.-H., Whitman W. *Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed.* New York, Springer-Verlag, 2009. 1422 p.
2. Dworkin M., Falkov S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria Vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3rd ed.* New York, Springer-Verlag, 2006, 1140 p.
3. Wessels S., Axelsson L., Hansen E., De Vuyst L., Laulund S., Lähteenmäki L., Lindgren S., Mollet B., Salminen S., von Wright A. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, vol. 15, no. 10, pp. 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>
4. Ayad E. H. E., Verheul A., de Jong C., Wouters J., Smith G. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*, 1999, vol. 9, no. 10, pp. 725–735. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(99\)00140-5](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(99)00140-5)
5. Piard J. C., Muriana P. M., Desmazeaud M. J., Klaenhammer T. R. Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, vol. 58, no. 1, pp. 279–284.
6. Wouters J. T. M., Ayad E. H. E., Hugenholtz J., Smit J. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 2002, vol. 12, no. 2–3, pp. 91–109. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00151-0)
7. Centro J. A., Tomillo F. J., Fernández-García E., Gaya P., Nunez M. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 2002, vol. 85, no. 12, pp. 3164–3172. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74404-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74404-4)
8. Safonova M. E., Naidenko I. A. Physiological and biochemical properties of lactic acid bacteria isolated from natural sources. *Mikrobye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects: a collection of scientific papers]. Minsk, 2015, vol. 7, pp. 69–80 (in Russian).
9. Kvasnikov E. I., Nesterenko O. A. *Lactic acid bacteria and ways of using them.* Moscow, Nauka Publ., 1975. 384 p. (in Russian).
10. Gerhardt P. (ed.). *Manual of methods for general microbiology. Vol. 1.* Moscow, Mir Publ., 1983. 536 p. (in Russian).
11. De Man J. S., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, vol. 2, no. 1, pp. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
12. Egorov N. S. *Microbes-antagonists and biological methods for determining antibiotic activity.* Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1965. 211 p. (in Russian).
13. Grudzinskaya E. E., Maksimova A. K. Selection of methods for determination of proteolytic activity of lactic acid bacteria and starter cultures. *Trudy Vserossiiskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta molochnoi promyshlennosti* [Proceedings of the All-Russian Research Institute of the Dairy Industry], 1974, iss. 33, pp. 58–64 (in Russian).

14. Anson M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 1938, vol. 22, no. 1, pp. 79–83. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
15. Flambard B., Richard J., Juillard V. Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 6, pp. 2131–2135.
16. Helinck S., Richard J., Juillard V. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on the type of enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 6, pp. 2124–2130.
17. Buckenhuskes H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, vol. 12, no. 1–3, pp. 253–272. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90067-j](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90067-j)
18. Fox P. F., O'Connor T. P., McSweeney P. L. H., Guinee T. P., O'Brien N. M. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1996, vol. 39, pp. 163–328. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60075-3](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60075-3)
19. Hansen E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 78, no. 1–2, pp. 119–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00238-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00238-6)
20. Leroy F., de Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, vol. 15, no. 2, pp. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
21. Cibik R., Cetinkaya F., Ersoy M., Yibar A. Identification and technological characterization of *Lactococcus* isolated from traditional Turkish cheeses. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2010, vol. 161, no. 11, pp. 509–514.
22. Ma C. L., Zhang L. W., Yi H. X., Du M., Han X., Zhang L. L., Feng Z., Zhang Y. C., Li Q. Technological characterization of lactococci isolated from traditional Chinese fermented milks. *Journal of Dairy Science*, 2011, vol. 94, no. 4, pp. 1691–1696. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3738>
23. Moulay M., Aggad H., Benmecherrane Z., Guessas B., Henni D. E., Kihal M. Cultivable lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 2006, vol. 1, no. 1, pp. 12–18.
24. Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., McSweeney P. L. H., Parente E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study. *International Dairy Journal*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.002>
25. Smit G., Smit B. A., Engels W. J. M. Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese product. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, vol. 29, no. 3, pp. 591–610. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2005.04.002>
26. Caplice E., Fitzgerald G. F. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, no. 1–2, pp. 131–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00082-3)
27. Lindgren S. E., Dobrogosz W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, vol. 7, no. 1–2, pp. 149–163. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90703-s](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90703-s)
28. Onopriiko A. V., Khramtsov A. G., Onopriiko V. A. *Technology of dairy products of small-scale factories*. Rostov on Don, Mart Publ., 2004. 411 p. (in Russian).

Информация об авторах

Сафонова Марина Евгеньевна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: m-safonova14@mail.ru

Найденко Инна Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь).

Буко Андрей Иосифович – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Marina E. Safonova – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: m-safonova14@mail.ru

Inna A. Naidenko – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

Andrey I. Buko – Junior researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 595.384/16:639.28(476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-277-285>

Поступила в редакцию 14.02.2019

Received 14.02.2019

А. В. Алехнович

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

**ОБОСНОВАНИЕ ГОДОВОГО ВЫЛОВА И ПРОМЫСЛОВОЙ МЕРЫ,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ОПТИМАЛЬНЫЙ ПРОМЫСЕЛ ДЛИННОПАЛОГО РАКА
PONTASTACUS LEPTODACTYLUS В ВОДОЕМАХ БЕЛАРУСИ**

Аннотация. Установлено, что для популяций длиннопалого рака мелководных озер и водохранилищ на юге Беларуси коэффициент Р/В (отношение продукции к биомассе) составляет 0,53, а для популяций глубоководных озер Витебской и Минской областей – 0,37 (средние значения близки к 0,5). Показатель смертности особей облавливаемой части популяции длиннопалого рака, начиная с возраста 3 года и более, колеблется в пределах от 45 до 68 % для каждого возрастного класса в течение года, что составляет примерно 50 % от уровня общей (промысловой и естественной) смертности особей каждого возрастного класса. На основании этих данных рекомендована доля ежегодного вылова раков – 45 % от промысловой части популяции. Принятая в правилах лова раков промысловая мера, равная 10,5 см и более, гарантирует участие самок длиннопалого рака в 1–2 периодах размножения. Промысловая мера соответствует средним значениям между максимальной скоростью роста особи, которая достигается у раков 5-летнего возраста, и суммарной наибольшей биомассой, которая отмечается у раков в возрасте 3 года.

Ключевые слова: длиннопалый рак *Pontastacus leptodactylus*, лимиты вылова, промысловая мера

Для цитирования: Алехнович, А. В. Обоснование годового вылова и промысловой меры, обеспечивающих оптимальный промысел длиннопалого рака *Pontastacus leptodactylus* в водоемах Беларуси / А. В. Алехнович // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 277–285. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-277-285>

A. V. Alekhnovich

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

**IDENTIFICATION OF THE ANNUAL CATCH AND FISHING MEASURES THAT ENSURE
THE OPTIMAL FISHING OF NARROW-CLAWED CRAYFISH *PONTASTACUS LEPTODACTYLUS*
IN THE WATERBODIES OF BELARUS**

Abstract. An annual catch of 45 % of the commercial stock is recommended on the basis of productivity and mortality of mature individuals. Commercial stock is made up of individuals with a total length of ≥ 10.5 cm (from the tip of the rostrum to the end of the telson, TL). Female individuals of narrow-clawed crayfish participate in 1–2 reproduction periods before they reach the commercial stock value of 10.5 cm. Crayfish individuals of 12 cm TL at the age of 5 years have the maximum observed growth rate. At the age of 3 years, crayfish individuals have the maximum observed cohort biomass (a group of even-aged individuals).

Keywords: narrow-clawed crayfish, commercial stock, growth rate

For citation: Alekhnovich A. V. Identification of the annual catch and fishing measures that ensure the optimal fishing of narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* in the waterbodies of Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 277–285 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-277-285>

Введение. Речные раки всегда считались деликатесом, пользующимся высоким спросом у населения. Однако после распространения на европейском континенте в конце XIX в. инфекционного заболевания рачьей чумы численность раков в Европе стала стремительно снижаться. В XX в. к лимитирующим численность раков факторам добавились такие, как загрязнение окружающей среды, деградация мест обитания, интенсивный вылов. Все это привело к сокращению численности раков за последние 150 лет на 95 % [1]. Сегодня спрос на продукцию речного рака превышает предложение, в связи с чем цена на нее довольно высока.

Промысел раков в Беларуси базируется на одном виде – длиннопалом раке *Potastacus leptodactylus*. В настоящее время в связи с изменением правил лова раков промысел начинает восстанавливаться. Так, в 2017 г. вылов раков составил 6,5 т, в 2018 г. – 5,8 т [2].

Вылов раков в объеме несколько тонн в год для Беларуси не является пределом, поэтому есть все основания ожидать дальнейшего его увеличения. Раки – ценный объект промысла, поэтому их вылов должен быть рациональным, обеспечивающим долговременность, эффективность и восполняемость рачьих ресурсов.

Рациональный промысел предполагает оценку запасов, установление лимитов вылова, определение разрешенных сроков лова, способов и орудий лова, установление минимальной промысловой длины разрешенных к вылову раков и решение других задач применительно к конкретным местообитаниям и популяциям.

Основой же рационального промысла является научно обоснованная оценка лимитов вылова (общего допустимого улова). Лимит вылова определяется как доля от промыслового запаса раков. Последний оценивается как часть особей в популяции, длина которых больше либо равна промысловой мере. Промысловая мера – минимальная длина раков, при достижении которой разрешается их вылов.

Цель работы – обосновать принятую промысловую меру и допустимые лимиты вылова раков из водоемов Беларуси.

Объекты и методы исследования. Индивидуальная скорость роста у раков чрезвычайно вариабельна. Поэтому для анализа общих закономерностей использовали данные по групповому росту линейных размеров особей [3], которые впоследствии можно перевести в единицы массы.

Соотношение между линейными размерами (L , см) и массой особи (W , г) представим в виде уравнения $W = aL^b$, где a и b – коэффициенты.

Для популяций длиннопалого рака водоемов Беларуси зависимость массы от длины имеет следующий вид: $W = 0,0227L^{3,1176}$ для самцов, $W = 0,0278L^{2,9758}$ для самок [4].

Для водоемов Беларуси рост длиннопалого рака описан уравнением Берталанфи: $L_t = 18,05(1 - e^{-0,2162t})$, где t – возраст, лет [3].

С учетом зависимости массы от длины особи перепишем уравнение Берталанфи в единицах массы.

Уравнения роста массы будут иметь следующий вид:

$$W_t = 187,594(1 - e^{-0,2162t}) \text{ для самцов,} \quad (1)$$

$$W_t = 152,430(1 - e^{-0,2162t}) \text{ для самок.} \quad (2)$$

Используя производную [5] уравнений (1) и (2), определим среднюю скорость роста массы.

Годовую скорость роста (dW/dt) можно описать с помощью следующих уравнений:

$$dW/dt = 187,594 \cdot 3,1176 (1 - e^{-0,2162t})^{2,1176} \cdot 0,2162 e^{-0,2162t} \text{ для самцов,}$$

$$dW/dt = 152,430 \cdot 2,9758 (1 - e^{-0,2162t})^{1,9758} \cdot 0,2162 e^{-0,2162t} \text{ для самок.}$$

Длину и возраст достижения половой зрелости самок определяли путем регистрации в популяции минимальной длины яйценосных самок. Для оценки возраста проводили анализ гистограмм частотно-размерного состава популяций речных раков, используя вероятностно-статистические методы [5].

Основой данной работы являлся анализ опубликованных материалов по закономерностям роста, размножения, динамике численности длиннопалого рака [6].

Измерение раков производили от острия рострума до конца тельсона.

Результаты исследования. Объем годовой продукции определяет лимит вылова. Очевидно, что последний не может быть больше первого.

Нами рассчитаны величины продукции популяций длиннопалого рака из мелководного оз. Олтуш, глубоководного оз. Волчин и Светлогорского водохранилища.

Скорость продуцирования, рассчитываемая по коэффициенту Р/В (отношение продукции к биомассе), в мелководном озере и водохранилище характеризуется очень близкими величинами:

для самцов они варьируются от 0,54 до 0,58, для самок – от 0,47 до 0,52. С учетом генеративной продукции самок коэффициент P/V увеличивается до 0,65. Однако полученные данные показали, что продуктивность популяции раков глубоководного стратифицированного оз. Волчин гораздо ниже, чем в высокопродуктивных мелководных озерах юга Беларуси. Коэффициент P/V соматического роста у самцов оз. Волчин составил 0,43, у самок – 0,31. Для самок учет генеративной продукции позволил увеличить коэффициент P/V до 0,39.

Значения коэффициентов P/V популяций длиннопалого рака в мелководном озере и водохранилище на юге страны оказались сопоставимы – примерно 0,53 [6]. Это дает основание принять коэффициент P/V для популяций раков водоемов Брестской и Гомельской областей равным 0,53. Для глубоководных озер Витебской и Минской областей соответствующий коэффициент P/V примем равным 0,37, как и для оз. Волчин.

В целом, коэффициент P/V у облавливаемой части популяции длиннопалого рака в наших водоемах изменяется от 0,37 до 0,58 (среднее значение – $0,50 \pm 0,08$).

Возможную квоту вылова можно определить и путем оценки смертности особей. Для этих целей необходимо проследить изменение численности отдельных возрастных групп раков в течение их жизненного цикла. Проведенные нами на протяжении 5 лет исследования по динамике численности раков в возрасте 3–6 лет на оз. Соминское позволили определить общую годовую смертность особей половозрелой части популяции.

Оцененная нами общая годовая смертность промысловой части популяции длиннопалого рака складывается из естественной и промысловой смертности и описывается уравнением $Z = M + F$, где Z – общая годовая смертность, M – естественная смертность, F – промысловая смертность [7].

Для самцов в возрасте от 3 до 6 лет средние значения общей мгновенной смертности равны $0,699 \pm 0,265 \text{ год}^{-1}$, для самок (без учета отрицательных значений) – $0,579 \pm 0,252 \text{ год}^{-1}$. Соответственно, средняя годовая выживаемость самцов в возрасте 3–6 лет составляет 49,7 %, самок – 56,0 %. Различия в значениях мгновенной смертности между самцами и самками не достоверны ($t = 0,692$, $p = 0,503$). Общая мгновенная смертность для облавливаемой части популяции длиннопалого рака оз. Соминское равна $0,672 \pm 0,257 \text{ год}^{-1}$, что соответствует выживаемости за год, равной 51,1 % [7].

Таким образом, доля продукции, создаваемый популяцией длиннопалого рака за год, составляет 50 % от биомассы облавливаемой части популяции, при этом ежегодно, начиная с 3-летнего возраста, каждый возрастной класс как самцов, так и самок теряет половину особей. На основании этих данных становится возможной оценка годовых лимитов вылова.

Среди ограничений, регулирующих промысел, кроме лимитов вылова важным является установление промысловой меры. Она может определяться на основе оценки индивидуальной скорости роста особей, динамики биомассы и возраста достижения половой зрелости.

Возраст достижения половой зрелости. В водоемах Беларуси минимальная длина половозрелых самок длиннопалого рака изменяется в зависимости от мест их обитания и составляет 7,2–9,2 см от общей длины (TL) (в среднем – $8,2 \pm 0,6$ см). В действующих правилах лова раков минимальный размер вылавливаемых особей длиннопалого рака составляет 10,5 см от TL. Следовательно, установленный в правилах минимальный промысловый размер гарантирует участие половозрелых самок до начала промыслового изъятия в 1–2 периодах размножения.

При определении минимальной промысловой меры следует учитывать как особенности индивидуального роста раков, так и увеличение биомассы всей одновозрастной группы, а также скорость роста и показатель смертности особей, что позволяет подойти к промысловой мере с позиций получения максимального улова.

Индивидуальная скорость роста. Если в основу промысловой меры положить максимальную скорость роста особей, то до тех пор, пока годовой прирост особей увеличится, целесообразно оставлять их в популяции, а начинать вылов следует при достижении ими размеров, при которых отмечается снижение годового прироста. В таблице приведены размерно-возрастная структура и средние значения годовой скорости роста массы тела в популяциях длиннопалого

рака, полученные с помощью дифференцирования уравнения группового роста. Зависимость массы тела от длины особей у длиннопалого рака для самцов и самок описывается разными уравнениями, поэтому годовая скорость роста оценена отдельно для самцов и самок.

Средние значения годовых индивидуальных приростов массы как у самцов, так и у самок увеличиваются при достижении особями 5-летнего возраста и при их длине, равной 12 см (см. таблицу).

**Размерно-возрастная структура и средние значения годовой скорости роста массы тела
в популяциях длиннопалого рака водных объектов Беларуси**

**Size-age structure and average values of annual body mass growth rate
of narrow-clawed crayfish populations in water bodies of Belarus**

Показатель	Возраст, лет					
	2	3	4	5	6	7
Средняя длина особей, см	7,00 ± 0,71	8,85 ± 0,59	10,53 ± 0,09	12,03 ± 0,51	13,09 ± 0,67	14,28 ± 1,05
Прирост массы тела, г·год ⁻¹ :						
самцы	8,94	13,80	16,73	17,84	17,58	16,44
самки	8,04	11,89	14,02	14,67	14,26	13,21

Динамика биомассы одновозрастных особей. Биомасса промысловой части популяции формируется за счет роста особей и их убыли в результате смертности. Проведенные расчеты показывают, что максимальная биомасса особей отмечается в возрасте 3 года, а затем постепенно снижается. С учетом динамики биомассы одновозрастных особей промысел следует начинать с 3-летнего возраста, когда средняя длина раков составляет 9 см.

Таким образом, если в основу определения минимальной промысловой меры положить максимальную скорость роста особи, вылов раков следует начинать, когда они достигают 5-летнего возраста и их длина составляет 12 см. Если опираться на максимальную биомассу одновозрастных особей, то начинать вылов следует с 3-летнего возраста раков, а промысловая мера должна составлять 9 см.

Исходя из промысловой меры, вылов раков разрешен с 4-летнего возраста. Следовательно, промысел раков начинается, когда индивидуальная скорость роста особи еще не достигла максимальных значений, а биомасса одновозрастных особей уже стала снижаться.

Обсуждение. Для устойчивого промысла необходим рациональный, т. е. максимально возможный по объему, вылов, который, однако, позволяет сохранять численность популяции на стабильном уровне.

Величина продукции дает представление о возможных объемах изъятия. Однако вылов может быть равен продукции раков за вычетом продукции элиминированных особей.

Известно [8–10], что в ответ на изменение интенсивности промысла у холодноводных видов раков Северной Америки отмечаются очень небольшие изменения скорости роста и плодовитости. Экспериментальные исследования по моделированию различных условий существования раков, проводимые на небольших озерах Канады, показывают, что в случае устойчивого и неизменного сохранения условий обитания раков допустимо изъятие до 50 % взрослых особей без риска нарушить баланс между ростом, пополнением и запасами раков. В устойчивых популяциях (там, где численность особей не подвержена резким колебаниям) возможен вылов раков без учета ограничений по полу и размерам особей.

Таким образом, согласно литературным данным, из половозрелой части популяции речных раков канадских водоемов можно изымать до 50 %, не опасаясь истощения запасов. Отметим, что популяция *Orconectes virilis* может выдержать промысловую нагрузку, равную 60 %, если изымать особей в возрасте от 1 года и более [11]. Этот необычно высокий процент изъятия не ведет к общему снижению продукции популяции благодаря значительному снижению внутривидовой конкуренции между сеголетками и особями старше 1 года [12].

В Турции в водохранилище Кебан промысловые запасы раков (особей длиной более 10 см) сопоставимы с объемами вылова. Так, в разрешаемый сезон вылавливается 60 % от промысловой части популяции, что считается сбалансированной нагрузкой, позволяющей вести рациональный промысел [13].

В русскоязычной литературе сложилось устойчивое представление, что при рациональной эксплуатации изъятие должно составлять порядка 25 % [14, 15], или 20–40 % от промыслового запаса [16]. Для днестровской популяции длиннопалого рака допустимый вылов находится в пределах 20–40 % от количества особей длиной больше 10 см [17]. Превышение этого вылова на 25 % в 1964 г. привело к перелову. Однако в оз. Котлабух вылов в объеме 60 % не нарушает структуру популяции промысловых раков [17]. Отметим, что авторы данных работ не приводят каких-либо доказательств и расчетов, подтверждающих правильность рекомендуемых объемов вылова.

Таким образом, рекомендованная, согласно литературным данным, величина вылова речных раков может составлять от 25 до 60 % от промысловой части популяций, а для американских речных раков – 50 % [8–10]. Для длиннопалого рака рекомендуемый средний вылов – 25 % от промысловой части популяции [14–16].

Для длиннопалого рака наших водоемов вылов 50 % от промысловой части популяции близок к объему его продукции, в которую входит и биомасса элиминированных особей, поэтому такой объем изъятия биомассы теоретически может вести к перелову. Изъятие, равное 50 % от промысловой части популяции, можно рассматривать как верхний предел, к которому следует стремиться, не достигая, однако, этой величины.

Другой подход основан на оценке уровня смертности особей промысловой части популяции. Оценка промысловой смертности предполагает наличие данных о естественной смертности особей. Однако применительно к рачьим популяциям сведений о естественной смертности половозрелых особей практически нет. Так, в работе по моделированию динамики численности популяции широкопалого рака норвежского оз. Стеинфиорд годовая естественная смертность промысловой части популяции принята равной 5 % [18]. В то же время Н. Я. Черкашина [16] отмечает, что в стабильной экологической ситуации естественная смертность половозрелых особей составляет 2,5 %. Принимая во внимание эти данные, оценим естественную смертность в 5 %. В таком случае промысловая смертность популяции длиннопалого рака составит 45 % от промысловой части популяции. Промысловая и естественная смертность – величины достаточно взаимосвязанные, и с увеличением промысловой смертности естественная должна снижаться, поскольку часть раков будет выловлена до того, как они погибнут от естественных причин. Следовательно, если в основу расчетов положить данные о смертности особей облавливаемой части популяции, можно рекомендовать вылов в объеме 45 % от численности промысловой части популяции.

Таким образом, максимально возможный вылов из ракопродуктивных популяций длиннопалого рака водоемов Беларуси стремится к 50 % от промысловой части популяции. Этот результат получен путем использования двух независимых подходов: по оценке продукции и динамики численности облавливаемой части популяции.

Предложенные способы расчетов общего допустимого улова по оценке продукции и определению общей смертности показывают сопоставимые результаты и для многочисленных популяций юга страны позволяют рекомендовать годовой вылов в объеме не менее 45 % от промысловой части популяции. Такую степень эксплуатации ракопродуктивных популяций можно считать оптимальной, позволяющей получать максимальный и в то же время устойчивый улов.

В доступной нам научной литературе мы не нашли общих подходов к определению минимальных размеров разрешаемых к вылову раков. Однако подчеркивается, что минимальная промысловая мера – общий принцип управления популяциями широкопалого рака [19]. В Норвегии минимальная промысловая длина составляет 95 мм, что гарантирует участие самок широкопалого рака в размножении хотя бы 1 раз [1]. Однако моделирование динамики численности раков на основе анализа длительного ряда наблюдений (29 лет) показывает, что вне зависимости от

минимальной промысловой меры (будь она 95 или 135 мм) конечная численность популяции практически одинаковая [20]. Даже если снять все ограничения на вылов самцов и отказаться от промысловой меры, то численность популяции не будет снижаться, т. е. будет вполне сопоставима с той, которая была бы в популяции при регуляции минимальных размеров [20].

Предложение использовать промысловую меру представляется разумным и логически оправданным. Однако многолетние экспериментальные исследования, проведенные на небольшом финском озере, показывают, что вне зависимости от промысловой меры ($TL = 9$ см или $TL = 10$ см) в экспериментальных популяциях раков снижаются средние размеры особей, уменьшается доля крупных коммерчески ценных особей, снижается репродуктивный потенциал (доля половозрелых особей в общей выборке) [21]. Результаты данного эксперимента дают основание утверждать, что наличие различных промысловых мер с течением времени (7 лет) приводит к схожим ответам популяции на различную стратегию вылова раков. Все это свидетельствует о сложности и неоднозначности ответной реакции популяции на промысел и, возможно, о наличии не учитываемых нами важных факторов, регулирующих рост, размножение и смертность особей. Как уже указывалось, ряд авторов утверждают, что любая промысловая мера ведет к измельчанию раков в популяции. Отметим, что постоянное изъятие быстрорастущих крупных особей в результате промысла можно рассматривать как эффективный искусственный отбор, который ведет к снижению скорости роста особей в популяции. Исследования, проведенные на рыбах, подтверждают гипотезу о генетических изменениях роста в популяции в ответ на размерно-селективное изъятие особей [22]. Это обстоятельство указывает на необходимость управления режимом эксплуатации с учетом эволюционных последствий длительного промыслового воздействия и условий обитания популяций.

Несмотря на ряд критических замечаний относительно установления промысловой меры, следует согласиться с тем, что минимальная промысловая мера должна гарантировать участие самки в размножении по крайней мере 1 раз. Это позволит популяции поддерживать численность на относительно стабильном уровне, несмотря на высокий промысловый пресс [23].

Если самки длиннопалого рака в условиях Беларуси до начала промыслового изъятия смогут участвовать в 1–2 периодах размножения, то промысловая мера установлена верно. В отношении получения максимального годового прироста наши исследования показывают, что биомасса когорты (особей одного возраста) наибольшая в возрасте 3 лет, а максимальная индивидуальная скорость роста особи отмечается в возрасте 5 лет. В первом случае промысловая мера должна составлять 9 см, во втором – 12 см. Промысловая мера, прописанная в правилах лова раков, составляет 10,5 см (т. е. находится в интервале между 9 и 12 см) и отчасти учитывает оценочный подход по определению как максимального прироста биомассы, так и максимального индивидуального роста особи.

Отметим, что в основу наших расчетов скорости роста положено общее для всех популяций длиннопалого рака Беларуси уравнение роста Берталанфи, но, если воспользоваться уравнениями роста для отдельных популяций, выводы по обоснованию промысловой меры могут быть несколько иными. Так, в оз. Соминское наибольшая скорость роста характерна для 4-летних особей длиной 10,5 см [24].

В правилах лова раков промысловая мера должна быть унифицирована и применяться если не для всех, то для большинства водоемов страны. В целом принятая промысловая мера ($\geq 10,5$ см) правильно отражает возраст и размеры раков, разрешенных к вылову. К этому возрасту раки успевают поучаствовать в 1–2 периодах размножения и в целом характеризуются максимальной скоростью роста.

Заключение. Для популяций длиннопалого рака мелководных озер и водохранилищ на юге страны коэффициент R/W составил 0,53, для популяций глубоководных озер Витебской и Минской областей – 0,37 (средние значения близки к 0,5). Показатель смертности особей облавливаемой части популяции длиннопалого рака, начиная с 3-летнего возраста и более, колебался в пределах от 45 до 68 % для каждого возрастного класса в течение года, что составило примерно 50 % от уровня общей (промысловой и естественной) смертности особей каждого возрастного класса

в течение года. Общий допустимый вылов оценивали по объему продукции и показателю общей смертности промысловой части популяции (результаты сопоставимы).

Для популяций длиннопалого рака водоемов Беларуси годовой вылов можно рекомендовать в объеме 45 % от промысловой части популяции. Такую степень эксплуатации ракопродуктивных популяций следует считать оптимальной, поскольку она позволяет получать максимальный и в то же время устойчивый улов.

Скорость роста особи, определенная по обобщенному для всех популяций Беларуси уравнению группового роста Бергаланфи, увеличивается до возраста 5 лет. В этом возрасте длина раков составляет 12 см. Биомасса одновозрастных особей, рассчитанная по скорости роста и показателю смертности особей, максимальна в возрасте 3 года. В этом возрасте длина раков составляет 9 см. В правилах вылова раков принята промысловая мера, равная 10,5 см, которая характерна для раков 4-летнего возраста. Установленная промысловая мера предполагает участие раков в 1–2 периодах размножения и соответствует средним значениям между максимальной скоростью роста особи и суммарной наибольшей биомассой одновозрастных особей.

Список использованных источников

1. Skurdal, J. Management strategies, yield and population development of the noble crayfish *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden / J. Skurdal, E. Garnas, T. Taugbøl // Bull. Fr. Pêche Piscic. – 2002. – Vol. 367. – P. 845–860. <https://doi.org/10.1051/kmae:2002072>
2. Государственный кадастр животного мира [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://belfauna.by>. – Дата доступа : 01.07.2016.
3. Алехнович, А. В. Особенности группового роста особей в популяциях длиннопалого рака *Astacus leptodactylus* / А. В. Алехнович // Гидробиол. журн. – 2015. – Т. 51, № 5. – С. 3–16.
4. Алехнович, А. В. Изменение живой массы длиннопалого рака в зависимости от длины тела / А. В. Алехнович, Д. В. Молотков // Природ. ресурсы. – 2016. – № 2. – С. 52–56.
5. Алимов, А. Ф. Введение в продукционную гидробиологию / А. Ф. Алимов. – Л. : Гидрометеиздат, 1989. – 150 с.
6. Алехнович, А. В. Речные раки Беларуси в современных условиях: распространение, динамика численности, продукционно-промысловый потенциал / А. В. Алехнович. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 303 с.
7. Алехнович, А. В. Оценка выживаемости промысловой части популяции длиннопалого рака *Astacus leptodactylus* (Esch.) / А. В. Алехнович // Докл. НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 5. – С. 82–86.
8. Momot, W. T. Annual production and production biomass ratios of the crayfish *Orconectes virilis* in two northern Ontario lakes / W. T. Momot // Trans. Am. Fish. Soc. – 1978. – Vol. 107, N 6. – P. 776–784. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1978\)107<776:apabro>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1978)107<776:apabro>2.0.co;2)
9. Momot, W. T. *Orconectes* in North America and elsewhere / W. T. Momot // Freshwater crayfish: biology, management and exploitation / ed. : D. M. Holdich, R. S. Lowery. – London, 1988. – P. 262–282.
10. Momot, W. T. Potential for exploitation of freshwater crayfish in coolwater systems: management guidelines and issues / W. T. Momot // Fisheries. – 1991. – Vol. 16, N 5. – P. 14–21. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1991\)016<0014:pfeofc>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1991)016<0014:pfeofc>2.0.co;2)
11. Momot, W. T. The role of exploitation in altering the processes regulation crayfish populations / W. T. Momot // Freshwater Crayfish. – 1993. – Vol. 9, N 1. – P. 101–117.
12. Holdich, D. M. A review of possible method for controlling alien crayfish populations / D. M. Holdich, R. Gydemo, W. D. Rogers // Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation? / ed. : F. Gherardi, D. M. Holdich. – Rotterdam, 1999. – P. 245–270.
13. Yüksel, F. Leslie population estimation for turkish crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch., 1823) in the Keban Dam Lake, Turkey / F. Yüksel, F. Demiroglu, F. Gündüz // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. – 2013. – Vol. 13, N 5. – P. 835–839. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13_5_07
14. Румянцев, В. Д. Речные раки Волго-Каспия : (Биология и промысел) / В. Д. Румянцев. – М. : Пищ. пром-сть, 1974. – 86 с.
15. Цукерзис, Я. М. Речные раки / Я. М. Цукерзис. – Вильнюс : Мокслас, 1989. – 140 с.
16. Черкашина, Н. Я. Динамика популяций раков родов *Pontastacus* и *Caspastacus* (Crustacea, Decapoda, Astacidae) и пути их увеличения / Н. Я. Черкашина. – М. : ФГУИП Нацрыбресурс, 2002. – 257 с.
17. Фауна Украины : в 40 т. / редкол. : В. А. Топачевский (пред.) [и др.]. – Киев : Наук. думка, 1981. – Т. 26. Высшие раки. Вып. 3. Речные раки / С. Я. Бродский. – 210 с.
18. Modelling crayfish population dynamics using catch data: a size-structured model / D. Sadykova [et al.] // Ecol. Modelling. – 2009. – Vol. 220, N 20. – P. 2727–2733. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2009.07.002>
19. Skurdal, J. *Astacus* / J. Skurdal, T. Taugbøl // Biology of freshwater crayfish / ed. D. M. Holdich. – Oxford, 2002. – P. 467–510.

20. Saving the largest makes a difference: exploring effects of harvest regulations by model simulations for noble crayfish, *Astacus astacus* / D. Sadykova [et al.] // Fisheries Management and Ecology, 2011. – Vol. 18, N 4. – P. 307–313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2011.00784.x>

21. The effects of minimum regulations and exploitation on population dynamics on noble crayfish (*Astacus astacus* (Linnaeus)) in a Small Lake in Central Finland: a seven year study / J. Tulonen [et al.] // Freshwater Crayfish. – 2008. – Vol. 16. – P. 7–14.

22. Swain, D. P. Evolutionary response to size-selective mortality in an exploited fish population / D. P. Swain, A. F. Sinclair, J. M. Hanson // Proc. Royal Soc. B. Biol. Sci. – 2007. – Vol. 274, N 1613. – P. 1015–1022. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0275>

23. Long term study of exploitation, yield and stock structure of noble crayfish *Astacus astacus* in Lake Steinfjorden, S. E. Norway / J. Skurdal [et al.] // Freshwater Crayfish. – 1993. – Vol. 9. – P. 118–133.

24. Алехнович, А. В. Сравнительный анализ роста длиннопалого рака белорусского оз. Соминское и армянского оз. Севан / А. В. Алехнович, Э. Х. Гукасян // Докл. НАН Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 3. – С. 105–107.

References

1. Skurdal J., Garnas E., Taugbøl T. Management strategies, yield and population development of the noble crayfish *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 2002, vol. 367, pp. 845–860. <https://doi.org/10.1051/kmae:2002072>

2. State Cadastre of the Animal World [Electronic resource]. Available at: <http://belfauna.by> (accessed 07.01.2016) (in Russian).

3. Alekhnovych A. V. Peculiarities of group growth of specimens in populations of the narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus*. *Hydrobiological Journal*, 2015, vol. 52, no. 1, pp. 3–16. <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v52.i1.10>

4. Alekhnovich A. V., Molotkov D. V. Changes in the live weight of narrow-clawed crayfish depending on the length of the body. *Prirodnnye resursy* [Natural resources], 2016, no. 2, pp. 52–56 (in Russian).

5. Alimov A. F. *Introduction to productive hydrobiology*. Leningrad, Gidrometeoizdat Publ., 1989. 150 p. (in Russian).

6. Alekhnovich A. V. *The river crayfishes of Belarus nowadays: distribution, population dynamics and production-trade potential*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2016. 303 p. (in Russian).

7. Alekhnovich A. V. Estimation of the survival rate of the commercial part of narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus* (Esch.) population. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2012, vol. 56, no. 5, pp. 82–86 (in Russian).

8. Momot W. T. Annual production and production biomass ratios of the crayfish *Orconectes virilis* in two northern Ontario lakes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1978, vol. 107, no. 6, pp. 776–784. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1978\)107<776:apabro>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1978)107<776:apabro>2.0.co;2)

9. Momot W. T. *Orconectes* in North America and elsewhere. *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. London, 1988, pp. 262–282.

10. Momot W. T. Potential for exploitation of freshwater crayfish in coolwater systems: management guidelines and issues. *Fisheries*, 1991, vol. 16, no. 5, pp. 14–21. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1991\)016<0014:pfeofc>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1991)016<0014:pfeofc>2.0.co;2)

11. Momot W. T. The role of exploitation in altering the processes regulation crayfish populations. *Freshwater Crayfish*, 1993, vol. 9, no. 1, pp. 101–117.

12. Holdich D. M., Gydemo R., Rogers W. D. A review of possible method for controlling alien crayfish populations. *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* Rotterdam, 1999, pp. 245–270.

13. Yüksel F., Demiroglu F., Gündüz F. Leslie population estimation for turkish crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch., 1823) in the Keban Dam Lake, Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, vol. 13, no. 5, pp. 835–839. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13_5_07

14. Romyantsev V. D. *River crayfish of the Volga-Caspian Sea: (biology and fishing)*. Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1974. 86 p. (in Russian).

15. Tsukerzis Ya. M. *River crayfish*. Vilnius, Mokslas Publ., 1989. 140 p. (in Russian).

16. Cherkashina N. Ya. *Dynamics of crayfish populations of the genera Pontastacus and Caspastacus (Crustacea, Decapoda, Astacidae) and ways to increase them*. Moscow, Publisher of the Federal State Unitary Enterprise “National Fish Resources”, 2002. 257 p. (in Russian).

17. Brodskii S. Ya. *Fauna of Ukraine. Higher crayfish. River crayfish. Vol. 26. Iss. 3*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1981, 209 p. (in Russian).

18. Sadykova D., Skurdal J., Sadykov A., Taugbol T., Hessen D. O. Modelling crayfish population dynamics using catch data: a size-structured model. *Ecological Modelling*, 2009, vol. 220, no. 20, pp. 2727–2733. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2009.07.002>

19. Skurdal J., Taugbøl T. *Astacus. Biology of Freshwater Crayfish*. Oxford, 2002, pp. 467–510.

20. Sadykova D., Skurdal J., Hessen D. O., Schweder T. Saving the largest makes a difference: exploring effects of harvest regulations by model simulations for noble crayfish, *Astacus astacus*. *Fisheries Management and Ecology*, 2011, vol. 18, no. 4, pp. 307–313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2011.00784.x>

21. Tulonen J., Erkamo E., Jussila J., Mannonen A. The effects of minimum regulations and exploitation on population dynamics on noble crayfish (*Astacus astacus* (Linnaeus)) in a small lake in Central Finland: a seven year study. *Freshwater Crayfish*, 2008, vol. 16, pp. 7–14.

22. Swain D. P., Sinclair A. F., Hanson J. M. Evolutionary response to size-selective mortality in an exploited fish population. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences*, 2007, vol. 274, no. 1613, pp. 1015–1022. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0275>

23. Skurdal J., Qvenild T., Taugbol T., Gamas E. Long term study of exploitation, yield and stock structure of noble crayfish *Astacus astacus* in Lake Steinfjorden, S. E. Norway. *Freshwater Crayfish*, 1993, vol. 9, pp. 118–133.

24. Alekhovich A. V., Gukasyan E. Kh. Comparative analysis of narrow-clawed crayfish growth in Belarusian Lake Sominskoe and Armenian Lake Sevan. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 3, pp. 105–107 (in Russian).

Информация об авторе

Алехнович Анатолий Васильевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Alekhovichav@gmail.com

Information about the author

Anatoly V. Alekhovich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Alekhovichav@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 581.2+577.21
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-286-291>

Поступила в редакцию 17.04.2019
Received 17.04.2019

Е. В. Вязов, М. С. Радюк, Е. А. Филипчик, Н. В. Шалыго

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

PR-БЕЛКИ КАК МАРКЕРЫ УСТОЙЧИВОСТИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) К ЛИСТОВЫМ ПАТОГЕНАМ

Аннотация. С использованием ПЦР-анализа в режиме реального времени изучена конститутивная экспрессия генов PR-белков, кодирующих тауматин-подобный белок (*TLP*), пероксидазу класса III (*TaPero*), хитиназу (*Chitin*), глюканазу (*Glucan*), ингибитор протеаз (*PrInh*), оксалатоксидазу (*OxOxid*) и липид-переносящий белок (*Ltp*) в коллекционных сортах озимой пшеницы. Показано, что растения сортов с повышенной комплексной устойчивостью к листовым патогенам имеют более высокий конститутивный уровень экспрессии генов *Chitin* и *PrInh* (в особенности генов *TLP*, *TaPero* и *Glucan*) по сравнению с неустойчивыми сортами. Предлагается использовать конститутивные уровни экспрессии генов *TLP*, *TaPero* и *Glucan* для отбора сортообразцов озимой пшеницы с повышенной устойчивостью к комплексу листовых болезней.

Ключевые слова: озимая пшеница, PR-белки, конститутивный уровень экспрессии, листовые патогены, комплексная устойчивость

Для цитирования: PR-белки как маркеры устойчивости озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к листовым патогенам / Е. В. Вязов [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 286–291. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-286-291>

Y. V. Viazau, M. S. Radyuk, E. A. Filipchik, N. V. Shalygo

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

PR-PROTEINS AS MARKERS OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) RESISTANCE TO LEAF PATHOGENS

Abstract. Using real-time PCR analysis, the constitutive expression of PR-protein genes encoding thaumatin-like protein (*TLP*), peroxidase III (*TaPero*), chitinase (*Chitin*), glucanase (*Glucan*), protease inhibitor (*PrInh*), oxalate oxidase (*OxOxid*) and lipid transfer protein (*Ltp*) was studied in collection varieties of winter wheat. It has been shown that plants of varieties with increased resistance to a complex of leaf pathogens have higher constitutive expression levels of *Chitin* and *PrInh* genes, and, to a greater extent, of *TLP*, *TaPero* and *Glucan* genes, compared with non-resistant varieties. It is proposed to use constitutive levels of expression of *TLP*, *TaPero* and *Glucan* genes for the selection of winter wheat varietal samples with increased resistance to the complex of leaf diseases.

Keywords: winter wheat, PR-proteins, expression level, leaf pathogens, complex resistance

For citation: Viazau Y. V., Radyuk M. S., Filipchik E. A., Shalygo N. V. PR-proteins as markers of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance to leaf pathogens. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 286–291 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-286-291>

Введение. В климатических условиях Беларуси наиболее актуальными листовыми болезнями озимой пшеницы являются мучнистая роса, септориоз листьев и снежная плесень. Известно, что в ответ на грибковую инфекцию в растениях увеличивается экспрессия генов, кодирующих связанные с патогенезом белки – pathogenesis-related proteins (PR-белки) [1]. К настоящему времени насчитывают 18 семейств PR-белков, различающихся по структуре и функциям [1]. Многие из них обнаружены в листьях озимой пшеницы и формируют ее устойчивость к патогенам. В частности, это тауматин-подобные белки [2, 3], пероксидаза класса III [4], хитиназы [5, 6], β -1,3 глюканаза [5, 7], ингибиторы протеиназ [8], оксалатоксидаза или гермин [9], а также липид-переносящий белок [10].

Показано, что устойчивость озимой пшеницы к мучнистой росе в значительной степени определяется экспрессией генов – тауматин-подобного белка [3], оксалатоксидазы [11] и пероксидазы класса III [12]. В пользу этого свидетельствуют также полученные нами данные, представленные

в работах [13, 14]. Устойчивость озимой пшеницы к септориозу, согласно литературным сведениям, формируется PR-белками – хитиназой, глюканазой [6, 7] и ингибиторами протеиназ [15], что также согласуется с полученными нами результатами [14]. Установлено, что развитие снежной плесени в растениях озимой пшеницы подавляется с участием тауматин-подобного белка [2], хитиназы и β -1,3-глюканазы [2, 16].

Цель настоящей работы – сопоставительный анализ конститутивных уровней экспрессии генов PR-белков (*TLP*, *TaPero*, *Chitin*, *Glucan*, *PrInh*, *OxOxid* и *Ltp*) для выявления генотипов озимой пшеницы с повышенной устойчивостью к комплексу листовых болезней.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования были листья зеленых проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) коллекционных сортов (Элегия, Августина, Легенда, Короганка, Acratos, Cubus, Skagen, Мера, Лютесценс 1062), предоставленные РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию». Проростки выращивали при температуре 22 °С в режиме 10 ч темноты и 14 ч света, используя люминесцентные лампы Philips TL-D 36W/765, 130 мкМ·м⁻²·с⁻¹. Для определения уровня экспрессии генов, кодирующих PR-белки, из листьев проростков озимой пшеницы выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzolTM (Applied Biosystems, Германия) по протоколу фирмы. Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции. Реакцию проводили по стандартному протоколу фирмы с помощью набора реагентов RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific, Литва). Расчет и дизайн праймеров для PR-белков проводили самостоятельно в программе Vector NTI, используя базу данных Nucleotide (NCBI). Праймеры для гена-нормализатора *18SrRNA* (18S субъединицы рибосомальной РНК) взяты из литературного источника [17]. Олигонуклеотидные праймеры (табл. 1) синтезировали в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Условия амплификации для праймеров подбирали экспериментально (табл. 2).

Т а б л и ц а 1. Нуклеотидная последовательность прямых (F) и обратных (R) праймеров и размер специфичных им продуктов амплификации

Table 1. The nucleotide sequence of forward (F) and reverse (R) primers and the size of their specific amplification products

PR-белок	Ген	Последовательность 5'-3'	Размер продукта, п. н.
Хитиназа	<i>Chitin</i>	F-TAAGACGGCGTTGTGGTTCT R-GCCACCGTTGATGATGTTG	152
β -1-3 глюканаза	<i>Glucan</i>	F-TGCTTCCATGTTTGCCGTTG R-GTTGATGCCCTTGACCTGT	151
Тауматин-подобный белок	<i>TLP</i>	F-GCACCCAGGACTTCTACGAC R-GGGCAGAAGGTGATCTGGTA	190
Пероксидаза III	<i>TaPero</i>	F-CGTCTGTTTTGCTGTCTGGC R-GAGGGCTACAACGGAGTCAC	170
Ингибитор протеаз	<i>PrInh</i>	F-GCTGAACCTGGTCAAGGCG R-TGAGGATGACGCTGAGGTTG	170
Оксалаток-сидаза	<i>OxOxid</i>	F-CAGCGTCATCCTCAACCACT R-CCCCTCTCGACCACTAATC	156
Липид-переносящий белок	<i>Ltp</i>	F-AGATGGCTCGCACTGCAGC R-CGATCAGTGGATCTTAGAGC	343
18S рибосом. РНК	<i>18SrRNA</i>	F-ATGATAACTCGACGGATCGC R-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT	149

ПЦР проводили в режиме реального времени с использованием термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим реакционным модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь ПЦР содержала 5,0 мкл SsoAdvancedTM Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США), 10 пмоль праймеров, 0,7 мкл кДНК и воду, свободную от нуклеаз. Суммарный объем – 10 мкл. Реакцию проводили согласно протоколу: предварительная денатурация – при 98 °С 30 с; плавление – при 98 °С 15 с; отжиг – при 55–65 °С (30–45 циклов).

Таблица 2. Условия ПЦР с праймерами для генов PR-белков и гена-нормализатора *18SrRNA*Table 2. Conditions for PCR with primers for PR proteins genes and the *18SrRNA* normalizer gene

Ген	Температура отжига праймеров, °С	К-во циклов ПЦР	Концентрация праймеров, пмоль
<i>TLP</i>	62,0	40	10
<i>TaPero</i>	56,0	40	10
<i>Chitin</i>	56,5	40	10
<i>Glucan</i>	59,7	40	10
<i>PrInh</i>	56,0	45	10
<i>OxOxid</i>	57,0	45	10
<i>Ltp</i>	61,0	40	20
<i>18SrRNA</i>	55,0	30	5

Уровни экспрессии генов PR-белков нормализовали по экспрессии гена-нормализатора *18SrRNA*. В качестве стандарта (1,0) брали экспрессию генов PR-белков в проростках сорта Элегия.

В работе представлены данные не менее трех независимых опытов со статистической обработкой результатов, заключающейся в расчете среднего арифметического и стандартной ошибки среднего.

Результаты и их обсуждение. В проростках коллекционных сортов озимой пшеницы с различной комплексной устойчивостью к патогенам и различной устойчивостью к отдельным листовым болезням проведен анализ конститутивных уровней экспрессии генов *TLP*, *TaPero*, *Ltp*, *PrInh*, *OxOxid*, *Chitin* и *Glucan* PR-белков. Проведенный анализ показал, что изученные сорта (табл. 3, 4) существенно различаются по конститутивным уровням экспрессии указанных выше генов. Так, у сортов Августина и Легенда, устойчивых к комплексу листовых болезней, наблюдался повышенный конститутивный уровень экспрессии одного из двух генов – либо гена *PrInh*, либо гена *TLP* (в 4 и 6 раз соответственно по сравнению со стандартом).

Таблица 3. Устойчивость растений коллекционных сортов озимой пшеницы к патогенам

Table 3. Resistance of plants of collection varieties of winter wheat to pathogens

Сорт	Происхождение	Устойчивость к патогенам
Элегия	Беларусь	Устойчива к комплексу листовых болезней
Августина	Беларусь	Устойчива к комплексу листовых болезней
Легенда	Беларусь	Устойчива к комплексу листовых болезней
Acratos	Германия	Необычно высокая устойчивость к комплексу листовых и колосовых болезней
Cubus	Германия	Необычно высокая устойчивость к комплексу листовых и колосовых болезней
Короганка	Россия, Белгородская обл.	Устойчива к бурой ржавчине и мучнистой росе
Skagen	Германия	Высокая устойчивость к мучнистой росе и желтой ржавчине
Мера	Россия, г. Владимир	По данным оригинатора, устойчива к листовой и стеблевой ржавчине (в условиях г. Владимира). В наших условиях выше среднего поражается мучнистой росой и септориозом листьев
Лютесценс 1062	Россия, г. Владимир	По данным оригинатора, устойчива к листовой и стеблевой ржавчине (в условиях г. Владимира). В наших условиях выше среднего поражается мучнистой росой и септориозом листьев

У проростков с необычно высокой устойчивостью к листовым и колосовым болезням, зарегистрирован повышенный конститутивный уровень экспрессии 4 генов – *TLP*, *TaPero*, *Chitin* и *Glucan* (сорт Acratos; в 176, 48, 6 и 41 раз соответственно), либо 3 генов – *TLP*, *PrInh* и *Glucan* (сорт Cubus; в 5, 4 и 18 раз соответственно) по сравнению со стандартом. Проростки сорта Короганка, устойчивого к мучнистой росе и бурой ржавчине, характеризовались высоким конститутивным уровнем экспрессии двух генов – *TLP* и *TaPero* (превышение над стандартом составило 39 и 10 раз соответственно). У сорта Skagen с высокой устойчивостью к мучнистой росе и желтой ржавчине выявлен также высокий конститутивный уровень экспрессии генов *TLP* и *TaPero*, превышающий стандарт в 31 и 16 раз соответственно.

Т а б л и ц а 4. Конститутивные уровни экспрессии генов *TLP*, *TaPero*, *Chitin*, *Glucan*, *PrInh*, *OxOxid* и *Ltp* в 7-дневных проростках устойчивых (2–7) и неустойчивых (8, 9) к комплексу листовых болезней коллекционных сортов озимой пшеницы

Table 4. Constitutive expression levels of *TLP*, *TaPero*, *Chitin*, *Glucan*, *PrInh*, *OxOxid* and *Ltp* genes in 7-day-old seedlings of collection varieties of winter wheat resistant (2–7) and not resistant (8, 9) to a complex of leaf diseases

№ п/п	Сорт	Уровень экспрессии генов, отн. ед.						
		<i>TLP</i>	<i>TaPero</i>	<i>Chitin</i>	<i>Glucan</i>	<i>PrInh</i>	<i>OxOxid</i>	<i>Ltp</i>
1	Элегия	1,00 ± 0,24	1,00 ± 1,66	1,00 ± 0,14	1,00 ± 0,48	1,00 ± 0,46	1,00 ± 0,50	1,00 ± 0,04
2	Августина	1,66 ± 0,48	2,14 ± 2,08	1,77 ± 1,12	0,36 ± 0,00	3,64 ± 1,60	0,72 ± 0,25	1,72 ± 0,22
3	Легенда	6,16 ± 0,45	2,12 ± 0,31	1,23 ± 0,05	0,81 ± 0,33	2,23 ± 0,61	0,66 ± 0,27	2,63 ± 0,40
4	Короганка	38,88 ± 3,72	10,25 ± 1,06	3,39 ± 0,60	12,92 ± 1,54	3,41 ± 0,07	1,82 ± 0,14	2,04 ± 0,05
5	Acratos	176,3 ± 52,4	48,09 ± 1,76	5,57 ± 0,01	41,34 ± 1,73	1,43 ± 0,49	0,94 ± 0,56	0,61 ± 0,03
6	Cubus	4,98 ± 2,60	2,09 ± 0,00	2,41 ± 0,06	17,46 ± 2,48	4,33 ± 1,48	0,80 ± 0,04	0,29 ± 0,09
7	Skagen	30,58 ± 9,92	15,73 ± 0,23	4,59 ± 0,62	31,87 ± 1,40	3,37 ± 0,60	0,98 ± 0,00	0,27 ± 0,08
8	Мера	1,69 ± 0,35	1,36 ± 0,29	1,41 ± 0,47	0,35 ± 0,00	1,67 ± 0,46	0,25 ± 0,21	0,73 ± 0,18
9	Лютеценс 1062	2,32 ± 0,55	5,78 ± 1,80	2,54 ± 0,00	2,21 ± 0,93	2,30 ± 1,41	0,78 ± 0,37	0,67 ± 0,06

Примечание. За 1,00 принят уровень экспрессии генов в проростках сорта Элегия.

Иная картина экспрессии генов PR-белков наблюдалась в проростках сортов Мера и Лютеценс 1062, которые в наших условиях выше среднего поражаются мучнистой росой и септориозом листьев, т. е. эти сорта можно рассматривать как неустойчивые/менее устойчивые к комплексу листовых болезней. Анализ показал, что конститутивные уровни экспрессии генов *OxOxid*, *Ltp* и *Glucan* в проростках сорта Мера оказались ниже стандарта, а конститутивные уровни других генов (*TLP*, *TaPero*, *PrInh* и *Chitin*) превышали стандарт не более чем в 1,7 раза. У сорта Лютеценс 1062 конститутивные уровни экспрессии генов *TLP*, *PrInh*, *Chitin* и *Glucan* были выше стандарта в 2,2–2,5 раза, гена *TaPero* – в 6 раз, а генов *OxOxid*, *Ltp* – ниже стандарта (в 1,3 и 1,5 раза соответственно).

Выводы. Полученные результаты указывают на то, что из 7 изученных генов важную роль в формировании комплексной устойчивости растений озимой пшеницы к листовым патогенам играют гены *TLP*, *TaPero*, *PrInh*, *Chitin* и *Glucan*. Существенно повышенный конститутивный уровень экспрессии хотя бы одного из этих генов может придавать растениям устойчивость к комплексу листовых патогенов (по крайней мере, к мучнистой росе, бурой и желтой ржавчине – данные по сортам Короганка, Skagen). Растения с очень высокими (в 17–176 раз выше контроля) конститутивными уровнями экспрессии хотя бы одного из генов (*TLP*, *TaPero* или *Glucan*) чрезвычайно устойчивы к листовым болезням. Предлагается использовать конститутивные уровни экспрессии генов *TLP*, *TaPero* и *Glucan* в селекционном процессе для отбора сортообразцов озимой пшеницы с повышенной устойчивостью к комплексу листовых болезней.

Благодарности. Работа финансирована в рамках Государственной программы Республики Беларусь «Научно-емкие технологии и техника» (мероприятие 26, 2016–2020 гг.).

Acknowledgements. This work was supported by the State Program of the Republic of Belarus “Science-intensive technologies and equipment”, grant 26 (2016–2020).

Список использованных источников

1. Van Loon, L. C. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants / L. C. van Loon, M. Rep, C. M. Pieterse // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 2006. – Vol. 44, N 1. – P. 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
2. Abscisic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale* / C. Kuwabara [et al.] // *Physiologia Plantarum.* – 2002. – Vol. 115, N 1. – P. 101–110. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150112.x>
3. Transformation of wheat thaumatin-like protein gene and analysis of reactions to powdery mildew and fusarium head blight in transgenic plants / L.-P. Xing [et al.] // *Acta Agronomica Sinica.* – 2008. – Vol. 34, N 3. – P. 349–354. [https://doi.org/10.1016/s1875-2780\(08\)60014-0](https://doi.org/10.1016/s1875-2780(08)60014-0)

4. Simonetti, E. Chromosomal location of four genes encoding Class III peroxidases in wheat / E. Simonetti, E. Alba, A. Delibes // *FYTON. Int. J. Exp. Bot.* – 2012. – Vol. 81. – P. 139–142.
5. Disease development and PR-protein activity in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings treated with plant extracts prior to leaf rust (*Puccinia triticina*) infection. / M. E. Cawood [et al.] // *Crop Protection.* – 2010. – Vol. 29, N 11. – P. 1311–1319. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.06.017>
6. Structural and functional analysis of chitinase gene family in wheat (*Triticum aestivum*) / A. K. Mishra [et al.] // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2015. – Vol. 52, N 2. – P. 169–178.
7. Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat / N. P. Shetty [et al.] // *J. Experim. Bot.* – 2009. – Vol. 60, N 15. – P. 4287–4300. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp269>
8. Валуева, Т. А. Роль ингибиторов протеаз в защите растений / Т. А. Валуева, В. В. Мосолов // *Успехи биол. химии.* – 2002. – Т. 42. – С. 193–216.
9. Schweizer, P. Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance / P. Schweizer, A. Christoffel, R. Dudler // *Plant J.* – 1999. – Vol. 20, N 5. – P. 541–552. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00624.x>
10. Assessment of lipid transfer protein (LTP1) gene in wheat *Powdery mildew* resistance / A.-L. Li [et al.] // *Agricult. Sci. China.* – 2006. – Vol. 5, N 4. – P. 241–249. [https://doi.org/10.1016/s1671-2927\(06\)60045-x](https://doi.org/10.1016/s1671-2927(06)60045-x)
11. Hurkman, W. J. Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection / W. J. Hurkman, Ch. K. Tanaka // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 111, N 3. – P. 735–739. <https://doi.org/10.1104/pp.111.3.735>
12. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns / G. Liu [et al.] // *Mol. Plant-Microbe Interactions.* – 2005. – Vol. 18, N 7. – P. 730–741. <https://doi.org/10.1094/mpmi-18-0730>
13. Тауматин-подобный белок и оксалактоксидаза как маркеры устойчивости озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к мучнистой росе (*Erysiphe graminis*) / М. С. Радюк [и др.] // *Докл. НАН Беларуси.* – 2017. – Т. 61, № 6. – С. 73–79.
14. Особенности экспрессии генов PR-белков в проростках озимой пшеницы с различной устойчивостью к патогенам / М. С. Радюк [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф. ; 13й съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков : тез. докл., Минск, 27–29 июня 2018 г. / редкол. : И. Д. Волоотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – С. 36.
15. Search for molecular markers of wheat resistance to fungal pathogens / L. G. Yarullina [et al.] // *Agricult. Sci.* – 2014. – Vol. 5, N 8. – P. 722–729. <https://doi.org/10.4236/as.2014.58076>
16. Ergon, A. I. Interactions between cold hardening and *Microdochium nivale* infection on expression of pathogenesis-related genes in winter wheat / Å. I. Ergon, S. S. Klemsdal, A. M. Tronsmo // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1998. – Vol. 53, N 5–6. – P. 301–310. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0182>
17. Expression analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) during salinity stress / H. Walia [et al.] // *Functional Integrative Genomics.* – 2006. – Vol. 6, N 2. – P. 143–156. <https://doi.org/10.1007/s10142-005-0013-0>

References

1. Van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, vol. 44, no. 1, pp. 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
2. Kuwabara C., Takezawa D., Shimada T., Hamada T., Fujikawa S., Arakawa K. Abscisic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiologia Plantarum*, 2002, vol. 115, no. 1, pp. 101–110. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150112.x>
3. Xing L.-P., Wang H.-Z., Jiang Z.-N., Ni J.-L., Cao A.-Z., Yu L., Chen P.-D. Transformation of wheat thaumatin-like protein gene and analysis of reactions to powdery mildew and fusarium head blight in transgenic plants. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, vol. 34, no. 3, pp. 349–354. [https://doi.org/10.1016/s1875-2780\(08\)60014-0](https://doi.org/10.1016/s1875-2780(08)60014-0)
4. Simonetti E., Alba E., Delibes A. Chromosomal location of four genes encoding Class III peroxidases in wheat. *FYTON. International Journal of Experimental Botany*, 2012, vol. 81, pp. 139–142.
5. Cawood M. E., Pretorius J. C., van der Westhuizen A. J., Pretorius Z. A. Disease development and PR-protein activity in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings treated with plant extracts prior to leaf rust (*Puccinia triticina*) infection. *Crop Protection*, 2010, vol. 29, no. 11, pp. 1311–1319. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.06.017>
6. Mishra A. K., Pandey B., Tyagi C., Chakraborty O., Kumar A., Jain A. K. Structural and functional analysis of chitinase gene family in wheat (*Triticum aestivum*). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2015, vol. 52, no. 2, pp. 169–178.
7. Shetty N. P., Jensen J. D., Knudsen A., Finnie C., Geshi N., Blennow A., Collinge D. B., Jørgensen H. L. Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2009, vol. 60, no. 15, pp. 4287–4300. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp269>
8. Valueva T. A., Mosolov V. V. Role of protease inhibitors in plant protection. *Uspekhi biologicheskoi khimii* [Advances in biological chemistry], 2002, vol. 42, pp. 193–216 (in Russian).
9. Schweizer P., Christoffel A., Dudler R. Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant Journal*, 1999, vol. 20, no. 5, pp. 541–552. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00624.x>
10. Li A.-L., Meng C.-S., Zhou R.-H., Ma Z.-Y., Jia J.-Z. Assessment of lipid transfer protein (LTP1) gene in wheat *Powdery mildew* resistance. *Agricultural Sciences in China*, 2006, vol. 5, no. 4, pp. 241–249. [https://doi.org/10.1016/s1671-2927\(06\)60045-x](https://doi.org/10.1016/s1671-2927(06)60045-x)

11. Hurkman W. J., Tanaka Ch. K. Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. *Plant Physiology*, 1996, vol. 111, no. 3, pp. 735–739. <https://doi.org/10.1104/pp.111.3.735>
12. Liu G., Sheng X., Greenshields D. L., Ogieglo A., Kaminskyj S., Selvaraj G., Wei Y. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, vol. 18, no. 7, pp. 730–741. <https://doi.org/10.1094/mpmi-18-0730>
13. Radyuk M. S., Viazau Y. V., Dremuk I. A., Shalygo N. V. Taumathin-like protein and oxalate oxidase as markers of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance to powdery mildew (*Erysiphe graminis*). *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 6, pp. 73–79 (in Russian).
14. Radyuk M. S., Viazau Y. V., Filipchik E. A., Shalygo N. V. Peculiarities of gene expression of PR-proteins in winter wheat seedlings with different resistance to pathogens. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funkcionirovaniya biosistem: mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya; Trinadtsatyi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov: tezisy dokladov (Belarus', Minsk, 27–29 iyunya 2018 goda)* [Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems: international scientific conference; The thirteenth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists: abstracts of reports (Belarus, Minsk, June 27–29, 2018)]. Minsk, 2017. p. 36 (in Russian).
15. Yarullina L. G., Veselova S. V., Ibragimov R. I., Shpirnaya I. A., Kasimova R. I., Akhatova A. R., Tsvetkov V. O., Maksimov I. V. Search for molecular markers of wheat resistance to fungal pathogens. *Agricultural Sciences*, 2014, vol. 5, no. 8, pp. 722–729. <https://doi.org/10.4236/as.2014.58076>
16. Ergon Å. I., Klemsdal S. S., Tronsmo A. M. Interactions between cold hardening and *Microdochium nivale* infection on expression of pathogenesis-related genes in winter wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1998, vol. 53, no. 5–6, pp. 301–310. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0182>
17. Walia H., Wilson C., Wahid A., Condamine P., Cui X., Close T. J. Expression analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) during salinity stress. *Functional and Integrative Genomics*, 2006, vol. 6, no. 2, pp. 143–156. <https://doi.org/10.1007/s10142-005-0013-0>

Информация об авторах

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

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

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

Information about the authors

Yauhen V. Viazau – 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: viazau@yahoo.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

Elena A. Filipchik – 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: lenafil050494@mail.ru

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

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 579.22
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-292-301>

Поступила в редакцию 16.10.2018
 Received 16.10.2018

О. В. Евдокимова¹, М. А. Чиндарева², Л. Н. Валентович^{1,2}

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИД БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Аннотация. В клетках природных бактерий *Bacillus pumilus* выявлены плазмиды размером от 6,2 до 8,5 т. п. н., копирующиеся в соответствии с механизмом «катящегося кольца» (RCR-типа) семейства pC194. Показано, что данные внехромосомные элементы достаточно широко распространены среди бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси (19 штаммов из 41 исследованного содержат RCR-плазмиды), и характеризуются генетическим полиморфизмом. Наиболее часто встречаются внехромосомные генетические элементы размером 7,7 т. п. н., идентичные плазмиде pBp15.1S из энтомопатогенного штамма *B. pumilus* 15.1. Остальные 6 вариантов плазмид отличаются друг от друга и от известных внехромосомных генетических элементов бактерий рода *Bacillus*. В клетках исследованных бактерий не выявлено репликонов, подобных pLS20.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, плазмиды, RCR-тип репликации, тета-тип репликации

Для цитирования: Евдокимова, О. В. Характеристика плазмид бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси / О. В. Евдокимова, М. А. Чиндарева, Л. Н. Валентович // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 292–301. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-292-301>

O. V. Evdokimova¹, M. A. Chindareva², L. N. Valentovich^{1,2}

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

CHARACTERISTIC OF PLASMIDS OF *BACILLUS PUMILUS* ISOLATED IN BELARUS

Abstract. In current study plasmids (size from 6.2 to 8.5 kb) copied with the “rolling circle” mechanism (RCR type) of the pC194 family have been identified in environmental bacteria *Bacillus pumilus*. It is shown that these extrachromosomal elements are widely distributed in *B. pumilus* bacteria circulating on the territory of Belarus (19 strains from 41 contain RCR-plasmids) and they are characterized by genetic polymorphism. The most common extrachromosomal genetic elements (7.7 kb size) are identical to the plasmid pBp15.1S from the entomopathogenic strain *B. pumilus* 15.1. The remaining 6 type of plasmids differ from each other and from the known extrachromosomal genetic elements of genus *Bacillus*. In the investigated bacteria no replicons similar to pLS20 were detected.

Keywords: *Bacillus pumilus*, plasmids, rolling circle replication, theta mechanism of replication

For citation: Evdokimova O. V., Chindareva M. A., Valentovich L. N. Characteristic of plasmids of *Bacillus pumilus* isolated in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 292–301 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-292-301>

Введение. Широко распространенные грамположительные бактерии *Bacillus pumilus* представляют довольно разнофункциональную группу микроорганизмов, включающую биотехнологически перспективные штаммы [1–4]. В то же время некоторые штаммы этого вида являются патогенами для животных и растений [5–8]. Такое разнообразие свойств бактерий обусловлено особенностями их генетической организации, изучение которой предполагает комплексное исследование всех наследственных структур, в том числе и внехромосомных генетических элементов. Именно плазмиды, наряду с бактериофагами и транспозонами участвуя в горизонтальном переносе генов, обеспечивают быстрое изменение свойств бактерий, позволяя им существовать в разных условиях внешней среды. Несмотря на значимость в жизнедеятельности микробных клеток, данные генетические структуры у бактерий *B. pumilus* практически не изучены. В литературе и в банках данных нуклеотидных последовательностей приводится информация о 19 плаزمидах, содержащихся в клетках указанных микроорганизмов (табл. 1). Для изученных плазмид

показано, что они могут копироваться в соответствии с механизмом тета-типа (плазмиды размером более 40 т. п. н.) либо «катыщегося кольца» (плазмиды размером до 10 т. п. н.) и содержат генетические детерминанты, определяющие отдельные этапы метаболизма и клеточного цикла [9, 10].

Систематический анализ природных бактерий *B. pumilus* на присутствие плазмид представляется важным этапом в изучении особенностей генетической организации данных функционально разнообразных микроорганизмов.

Т а б л и ц а 1. Плазмиды бактерий *B. pumilus*

Table 1. Plasmids of *B. pumilus* bacteria

Плаزمида	Штамм	Размер, п. н.	Ссылка	Код доступа в ГенБанке, год депонирования
pPL7065	<i>B. pumilus</i> ATCC 7065	7607	[11, 12]	AY230134.1, 2003
pMB1, pMB2	<i>B. pumilus</i> ATCC 12140	–	[13]	–
pPL10	<i>B. pumilus</i> L10; мутант, полученный из <i>B. pumilus</i> ATCC 12140	7028	[14]	AF036712, 1997
pSH1452	<i>B. pumilus</i> SH1452; солеустойчивый штамм	6081	[15]	U53767.1, 1996
pMMH1	<i>B. pumilus</i> MJM1; продуцент полиглутаминовой кислоты, изолированный из почвы	5812	Не опубликовано	AY522951.1, 2003
pPZZ84	<i>B. pumilus</i> ZZ84, выделенный из образца щелочной почвы	6817	[16]	GU144016, 2009
pBP6000	<i>B. pumilus</i> 201005130501	5664	Не опубликовано	KC683537.1, 2013
pGR8	<i>B. pumilus</i> GR-8; патоген, вызывающий гниль корневищ имбиря	6935	[17]	CP009109.1, 2014
pBp15.1S	<i>B. pumilus</i> 15.1; этнопатогенный штамм	7785	[10]	KM348008.1, 2014
pPDSLzg-1	<i>B. pumilus</i> PDSLzg-1; деградирующий углеводород штамм, выделенный из нефтеносных песков	11 801	[18]	CP016785, 2016
pCB01	<i>B. pumilus</i> CB01, изолированный из фекалий американского ворона	7295	Не опубликовано	LYXP01000016.1, 2016
pC2-2	<i>B. pumilus</i> C2-2 (MCCC 1A08151); штамм из придонных отложений Атлантического океана	5899	Не опубликовано	MF503687.1, 2017
pGLB197	<i>B. pumilus</i> GLB197; эндофитный штамм, изолированный из здоровых листьев виноградной лозы	7061	Не опубликовано	CP018575.1, 2017
pGM3FR	<i>B. pumilus</i> GM3FR; эндофит, выделенный из тканей растений овсяницы красной	6565	[19]	MKZN01000029, 2017
p576	<i>B. pumilus</i> NRS576	43 434	[9, 20, 21]	–
pMGD296	<i>B. pumilus</i> 296.51; штамм, изолированный из сена	~42 000	[22]	–
pMGD302	<i>B. pumilus</i> 302.41; штамм, изолированный из сена	~60 000	[23]	–
pSHB9	<i>B. pumilus</i> SH-B9; штамм, изолированный из ризосферы сахарной свеклы	91 229	Не опубликовано	CP011023.1, 2016

Цель настоящей работы – изучение распространения определенных типов плазмид в клетках природных бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлся 41 штамм природных бактерий *B. pumilus*, выделенных из различных источников на территории Беларуси: T1, T2, 19.6, 32.7, 32.8, 33.4, 33.5, 36, 36.2, 37.7, 38.2, 39.2, 39.3, 40.2, 41.2, 44.2, 51.2, 61.2, 61.3, 11-1-1, 17-2, 21-3, 33-3, 65-4, 43-3-1, 63-1-3, 6-5-2, 63-2-2, 71-4-1, 1MRL, F6, БИМ В-171, БИМ В-211, БИМ В-369, БИМ В-373, БИМ В-394, БИМ В-401, P10, P107, P109, P110 [24]. Таксономический статус исследуемых бактерий подтвержден с помощью видоспецифичной ПЦР [25]. В работе также использовали коллекционные штаммы *B. subtilis* 168 [26], 19 [27], LS20 [28] и *B. safensis* U17-1 (ГенБанк: CP015611). Фрагменты ДНК клонировали в составе вектора pJET1.2 (Thermo Scientific, Литва) в бактериях *Escherichia coli* XL1-Blue [29].

Для культивирования бактерий использовали жидкую и агаризованную среду LB (LENNOX) (Conda, Испания), бактерии выращивали в течение 16–18 ч при температуре 28 °С (*E. coli* при температуре 37 °С).

Для выделения тотальной ДНК использовали набор реактивов «Нуклеосорб С» (ОДО «Праймтех», Беларусь). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [30]. В обоих случаях суспензии клеток предварительно обрабатывали лизоцимом в концентрации 2 мг/мл. Рестриксию и лигирование ДНК осуществляли согласно рекомендациям фирмы – производителя ферментов (ThermoScientific, Литва). Электропорацию бактерий *E. coli* XL1-Blue проводили согласно инструкциям, изложенным в руководстве к электропоратору MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad Laboratories, США). Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера [31] с помощью набора реактивов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience GmbH, Германия) и меченных флуоресцентной меткой Cy5.5 праймеров pJET-F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') и pJET-R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') (ОДО «Праймтех», Беларусь). Продукты секвенирующей реакции детектировали с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer (Li-COR Biosciences, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью компьютерных программ eSeq V.3.1.10 (Li-COR Biosciences, США), BLASTN 2.2.1 (NCBI сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и базы данных ГенБанк (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Для проведения ПЦР использовали реактивы производства (ОДО «Праймтех», Беларусь). Реакционная смесь (20 мкл) содержала 50 нг ДНК матрицы, 400 мкМ каждого праймера, 200 мМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, 0,5 ед. *Taq*-полимеразы и буфер «АМ».

Аmplification *rep*-областей плазмид RCR-типа размером порядка 240 п. н. проводили с использованием сконструированных праймеров pBP-*rep*-F (5'-CGCAACAGGTA AAAAGCGGGA-3') и pBP-*rep*-R (5'-GACCTTCGCCACGCACACAT-3') производства ОДО «Праймтех» (Беларусь) при режимах: 95 °С – 3 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с; 59 °С – 30 с; 72 °С – 30 с (35 циклов); 72 °С – 4 мин (1 цикл).

Аmplification *rep*-областей плазмид подобных pLS20 размером порядка 347 п. н. проводили с использованием сконструированных праймеров pLS20F (5'-CTGCCGTTAAGGGGTGTAA-3') и pLS20R (5'-AGACGTCTGAGGTTTCCAG-3') производства ОДО «Праймтех» (Беларусь) при режимах: 95 °С – 3 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с; 47 °С – 30 с; 72 °С – 30 с (35 циклов); 72 °С – 4 мин (1 цикл).

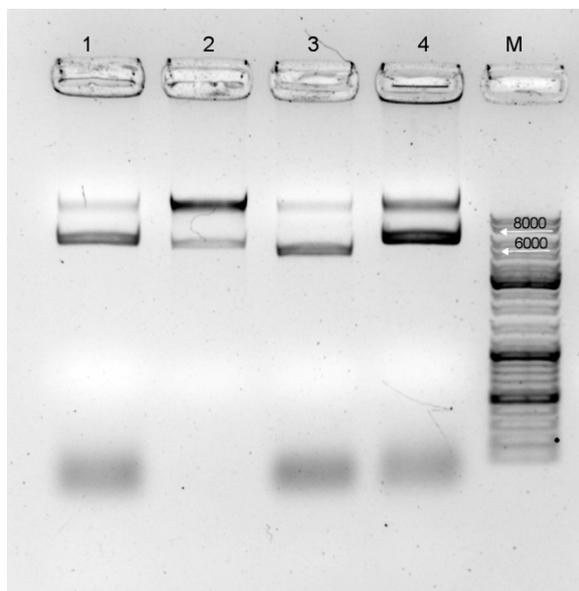


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидной ДНК штаммов *B. pumilus*. Дорожки соответствуют штаммам: 1 – T2; 2 – БИМ В-171; 3 – 33-3; 4 – 63-2-2; М – GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Fig. 1. Plasmids DNA electrophoregram of *B. pumilus*. Strains: 1 – T2; 2 – BIM В-171; 3 – 33-3; 4 – 63-2-2; М – GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Полученные продукты визуализировали с помощью электрофореза в 0,8 %-ном агарозном геле с использованием системы цифровой документации видеоизображения ChemiDoc MP (BioRad, США). Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве референсной ДНК использовали маркеры ДНК GeneRuler 1 kb DNA Ladder и GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoScientific, Литва).

Результаты и их обсуждение. При изучении структурно-функциональной организации геномов бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных из различных источников на территории Беларуси, нами установлено, что часть анализируемых штаммов содержат как минимум одну плазмиду [24]. При этом внехромосомные генетические элементы различались электрофоретической подвижностью в агарозном геле и имели размер не более 10 т. п. н. (рис. 1).

Известно, что плазмиды грамположительных бактерий такого размера копируются, как правило, в соответствии с механизмом «катыщегося кольца» (плазмиды RCR-типа) и относятся к одному из пяти семейств (pT181, pC194, pE194/pMV158, pSN2 и pJJ110/pJVJ). Внехромосомные генетические элементы одной классификационной группы характеризуются высокой степенью идентичности *rep*-областей и сходными механизмами наследования в клетке-хозяине [32].

Для установления классификационной принадлежности выявленных плазмид определяли сходство их нуклеотидных последовательностей с известными внехромосомными элементами бактерий рода *Bacillus*. Для этого в составе вектора pJET1.2 были клонированы HindII-фрагменты четырех различающихся по размеру плазмид, выделенных из штаммов *B. pumilus* T2, БИМ В-171, 33-3 и 63-2-2 (соответственно pBP-T2, pBP-B171, pBP-33-3, pBP-6322), и определены их нуклеотидные последовательности. Сиквенс-анализ встроенных участков ДНК позволил установить их сходство с плазмидами RCR-типа бактерий *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. safensis*. При этом самая высокая степень сходства (98 % идентичности) была выявлена для фрагмента размером 838 п. н. плазмиды pBP-B171 с целым рядом плазмид *B. pumilus* (pBp15.1S, pGR8, pPDSLzg-1, pC2-2, pPL7065) и плазмидой pPOD2000 бактерий *B. subtilis*. Нуклеотидные последовательности плазмид pBP-T2 и pBP-33-3 были сходны с теми же плазмидами, но в более низкой степени (идентичность составила от 84 до 95 %). Фрагмент размером 823 п. н. плазмиды pBP-6322 проявлял сходство с другими плазмидами бактерий *B. safensis* (pBA64) и *B. pumilus* (pBP6000 и pGLB197) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Результаты сравнения последовательностей фрагментов плазмидной ДНК *B. pumilus* с нуклеотидными последовательностями базы данных ГенБанк

Table 2. The results of comparing the sequences of DNA fragments of *B. pumilus* plasmid with the nucleotide sequences of database GenBank

Фрагмент плазмидной ДНК, размер	Сходные последовательности в ГенБанке	Степень покрытия, %	Идентичность, %	Код доступа в ГенБанке
pBP-T2, 755 п. н.	pGR8, <i>B. pumilus</i>	100	93	CP009109.1
	pDW5-4, <i>B. zhangzhouensis</i>	85	93	MF503689.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	100	89	KM348008.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	100	84	CP016785.1
	pPL10, <i>B. pumilus</i>	99	84	AF036712.1
pBP-B171, 838 п. н.	pPOD2000, <i>B. subtilis</i>	85	84	U55043.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	100	98	KM348008.1
	pGR8, <i>B. pumilus</i>	100	98	CP009109.1
	pPOD2000, <i>B. subtilis</i>	100	98	U55043.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	99	98	CP016785.1
pBP-33-3, 840 п. н.	pC2-2, <i>B. pumilus</i>	99	98	MF503687.1
	pPL7065, <i>B. pumilus</i>	99	97	AY230134.1
	pGR8, <i>B. pumilus</i>	100	94	CP009109.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	100	90	KM348008.1
	pDW5-4, <i>B. zhangzhouensis</i>	85	93	MF503689.1
pBP-6322, 813 п. н.	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	100	85	CP016785.1
	pPL10, <i>B. pumilus</i>	98	84	AF036712.1
	pPZZ84, <i>B. pumilus</i>	76	87	GU144016.1
	pBA64, <i>B. safensis</i>	83	95	JX134061.1
	pBP6000, <i>B. pumilus</i>	83	79	KC683537.1
pGLB197, <i>B. pumilus</i>	pGLB197, <i>B. pumilus</i>	83	79	CP018575.1

Примечание. Для фрагментов плазмидной ДНК pBP-T2, pBP-B171, pBP-33-3 представлен неполный список сходных последовательностей из ГенБанка.

В работе [10] по изучению плазмиды pBp15.1S, изолированной из этнопатогенного штамма *B. pumilus* 15.1, представлен детальный генетический анализ нуклеотидной последовательности ДНК. В результате гибридизации выявлены одноцепочечные интермедиаты, образующиеся в процессе копирования, что является характерной особенностью плазмид RCR-типа. Установлена идентичность сайтов *dso* (сайт инициации репликации ведущей нити ДНК), *ssso* (сайт инициации

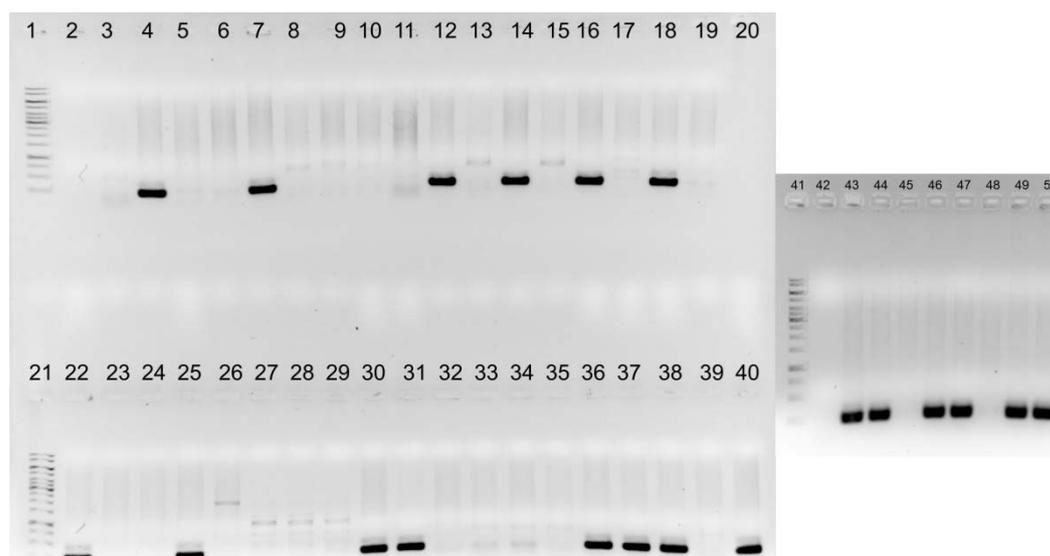


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров pBP-*rep*-F и pBP-*rep*-R и ДНК бактерий рода *Bacillus*. Дорожки 1, 21, 41 соответствуют маркеру ДНК GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 2, 20, 42 – отрицательный контроль (без ДНК матрицы); в качестве матрицы для ПЦР использована тотальная ДНК штаммов: 3 – *B. subtilis* 19 (отрицательный контроль); 17 – *B. safensis* U17-1 (отрицательный контроль); *B. pumilus*: 4 – 63-1-1; 5 – F6; 6 – 41.2; 7 – 44.2; 8 – 51.2; 9 – 61.2; 10 – 61.3; 11 – 36; 12 – 19.6; 13 – 32.8; 14 – 32.7; 15 – 33.5; 16 – 33.4; 18 – 33-3; 19 – 21-3; 22 – 1MRL; 23 – 17-2; 24 – T1; 25 – T2; 26 – P10; 27 – P107; 28 – P109; 29 – P110; 30 – 6-5-2; 31 – 71-4-1; 32 – 65-4; 33 – 38.2; 34 – 39.2; 35 – 39.3; 36 – 36.2; 37 – 37.7; 38 – 40.2; 39 – 11-1-1; 40, 43 – 63-2-2; 44 – БИМ В-394; 45 – БИМ В-369; 46 – БИМ В-171; 47 – БИМ В-373; 48 – БИМ В-211; 49 – 43-3-1; 50 – БИМ В-401

Fig. 2. Electrophoregram of PCR products received with the primers pBP-*rep*-F and pBP-*rep*-R and DNA of genus *Bacillus*. Strains: 1, 21, 41 – GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 2, 20, 42 – negative control (no DNA matrix); DNA matrix is total bacterial DNA from strains: 3 – *B. subtilis* 19 (negative control); 17 – *B. safensis* U17-1 (negative control); *B. pumilus*: 4 – 63-1-1; 5 – F6; 6 – 41.2; 7 – 44.2; 8 – 51.2; 9 – 61.2; 10 – 61.3; 11 – 36; 12 – 19.6; 13 – 32.8; 14 – 32.7; 15 – 33.5; 16 – 33.4; 18 – 33-3; 19 – 21-3; 22 – 1MRL; 23 – 17-2; 24 – T1; 25 – T2; 26 – P10; 27 – P107; 28 – P109; 29 – P110; 30 – 6-5-2; 31 – 71-4-1; 32 – 65-4; 33 – 38.2; 34 – 39.2; 35 – 39.3; 36 – 36.2; 37 – 37.7; 38 – 40.2; 39 – 11-1-1; 40, 43 – 63-2-2; 44 – BIM В-394; 45 – BIM В-369; 46 – BIM В-171; 47 – BIM В-373; 48 – BIM В-211; 49 – 43-3-1; 50 – BIM В-401

репликации запаздывающей нити ДНК) и консервативных участков *rep*-гена с таковыми типовой плазмиды рТА1040 семейства рС194 [10]. Следовательно, плазмиды в клетках исследуемых бактерий могут принадлежать к этому же семейству.

Для подтверждения выдвинутого предположения были сконструированы праймеры (pBP-*rep*-F и pBP-*rep*-R), обеспечивающие амплификацию *rep*-областей плазмид семейства рС194. В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали тотальную ДНК, выделенную из клеток 41 штамма природных бактерий *B. pumilus*. В качестве дополнительных отрицательных контролей использовали тотальную ДНК *B. subtilis* 19 и *B. safensis* U17-1, для которых определены нуклеотидные последовательности генома и подтверждено отсутствие плазмид семейства рС194. В результате ПЦР были получены ампликоны искомого размера при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток 19 штаммов (63-1-1, 44.2, 19.6, 32.7, 33.4, 33-3, 1MRL, T2, 6-5-2, 71-4-1, 36.2, 37.7, 40.2, 63-2-2, БИМ В-394, БИМ В-171, БИМ В-373, 43-3-1 и БИМ В-401) (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о широком распространении плазмид RCR-типа семейства рС194 в клетках природных бактерий *B. pumilus* (более 45 % штаммов содержат данные плазмиды).

Ранее на основании рестрикционного и сиквенс-анализа было показано, что плазмиды семейства рС194 характеризуются гетерогенностью и могут быть условно разделены на 7 подгрупп [33, 34]. Согласно размеру, количеству и расположению сайтов рестрикции, выделяют подгруппы рТА1015, рТА1020, рТА1030, рТА1040, рТА1050, рТА1060 (названия подгрупп соответствуют названию типовых плазмид бактерий *B. subtilis*) и подгруппу рFTV14, представленную плазмидой бактерий *B. amyloliquefaciens* S294 [35].

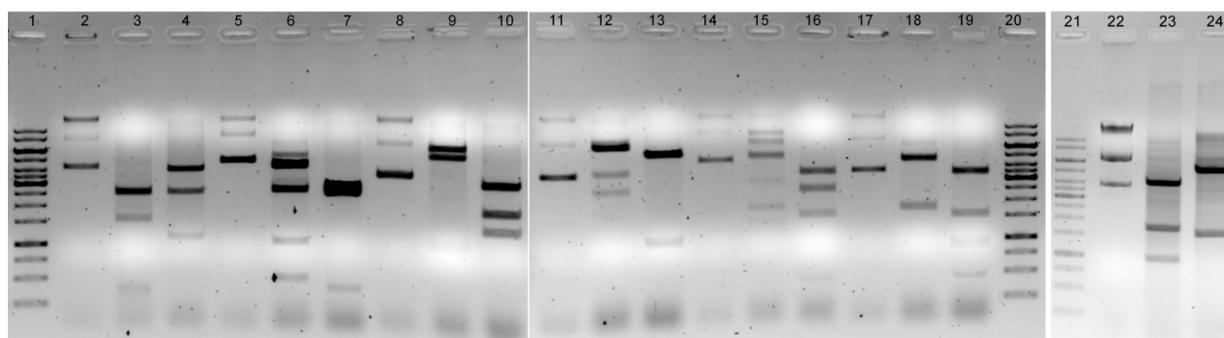


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов рестрикции плазмид природных бактерий *B. pumilus*. Дорожки 1, 20, 21 соответствуют маркеру молекулярного веса ДНК 1 kb DNA Ladder; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 22 – соответственно исходные плазмиды pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171; 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 23 – соответственно плазмиды pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, порезанные HindIII; 4, 7, 10, 13, 16, 19, 24 – соответственно плазмиды pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, порезанные EcoRI

Fig. 3. Electrophoregram of restriction fragments of *B. pumilus* bacteria native plasmids. Strains: 1, 20, 21 – 1 kb DNA Ladder; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 22 – plasmids pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, respectively; 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 23 – plasmids cut with HindIII pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, respectively; 4, 7, 10, 13, 16, 19, 24 – plasmids cut with EcoRI pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, respectively

На основании сходства рестрикционных профилей (использовали рестриктазы HindIII и EcoRI) все исследованные плазмиды природных бактерий *B. pumilus* также были разделены на 7 подгрупп (рис. 3, табл. 3). При этом наиболее распространенный тип плазмид (11 из 19) по размеру и расположению сайтов рестрикции для ферментов HindIII и EcoRI полностью соответствовал плазмиде pVp15.1S бактерий *B. pumilus* 15.1 [10]. Других совпадений с известными плазмидами не выявлено.

Т а б л и ц а 3. Результаты рестрикционного анализа плазмид природных бактерий *B. pumilus*

Table 3. Results of restriction analysis of *B. pumilus* bacteria native plasmids

Плазмиды	Размер плазмиды, п. н.	Рестриктаза	К-во сайтов рестрикции	Размер фрагментов рестрикции, п. н.
pBP-19.6, pBP-32.7, pBP-33.4, pBP-36.2, pBP-37.7, pBP-40.2, pBP-44.2, pBP-4331, pBP-6313, pBP-652, pBP-7414	7700	HindIII	5 (6)	2600, 2500, 1600, 400, 350 (250)
		EcoRI	3	4000, 2600, 1100
pBP-6322	8500	HindIII	4	4300, 2700, 1000, 500
		EcoRI	4 (5)	2800, 2700, 2500, 400 (100)
pBP-B394	6500	HindIII	2	5500, 1000
		EcoRI	3	3200, 1900, 1400
pBP-1MRL	6200	HindIII	2	3600, 2600
		EcoRI	2	5200, 1000
pBP-T2	7950	HindIII	4	4800, 1800, 1100, 250
		EcoRI	4	3500, 2500, 1500, 450
pBP-33-3	6400	HindIII	2	4600, 1800
		EcoRI	4	3500, 1500, 900, 490
pBP-B171, pBP-B373, pBP-B401	7100	HindIII	3	4300, 1800, 1000
		EcoRI	2	5500, 1600

Примечание. Размер фрагментов рассчитывали на основании электрофоретической подвижности в сравнении с фрагментами маркера молекулярного веса; размер плазмид определяли путем сложения длин фрагментов.

Полученные данные позволяют заключить, что все исследованные плазмиды природных бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси, относятся к одному семейству, но при этом характеризуются генетическим полиморфизмом.

Помимо плазмид небольшого размера (до 10 т. п. н.) для бактерий *B. pumilus* характерно присутствие крупных плазмид. В частности, в клетках бактерий *B. pumilus* NRS576 содержится

плазмида p576 размером 43,3 т. п. н., функциональный анализ которой позволил выявить последовательность (1000 п. н.), необходимую для ее копирования. Для охарактеризованной *rep*-области выявлено сходство с аналогичной последовательностью плазмиды pLS20 бактерий *B. subtilis* [9]. В пределах данной области на наиболее идентичных участках нуклеотидных последовательностей p576 и pLS20 была подобрана пара праймеров pLS20F/R, фланкирующих фрагмент размером 347 п. н. Проведенный ПЦР-анализ с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток 41 природного штамма *B. pumilus*, не позволил выявить ампликоны искомого размера (целевой продукт ПЦР был обнаружен только с матрицей, выделенной из штамма *B. subtilis*, содержащего плазмиду pLS20, данные не представлены). Полученный результат позволяет с высокой достоверностью утверждать, что плазмиды, подобные pLS20, не содержатся в клетках исследованных бактерий.

Заключение. Таким образом, в клетках природных бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси, довольно широко распространены плазмиды RCR-типа семейства pC194. Все исследованные плазмиды природных бактерий *B. pumilus* являются филогенетически родственными, но при этом характеризуются генетической гетерогенностью. Наиболее часто встречаются внехромосомные генетические элементы размером 7,7 т. п. н., идентичные плазмиде pBp15.1S из энтомопатогенного штамма *B. pumilus* 15.1. Плазмиды с тета-типом репликации, подобные pLS20, не содержатся в клетках исследованных бактерий.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б19-110).

Авторы выражают благодарность профессору М. А. Титок, доценту В. Е. Мямину, ассистентам биологического факультета БГУ Е. И. Комар (кафедра микробиологии) и Ю. Н. Горовику (кафедра молекулярной биологии), а также старшему научному сотруднику В. Н. Акимову (ИБФМ РАН, Пушкино) за предоставленные штаммы бактерий.

Acknowledgements. The study was carried out with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (B19-110).

The authors are grateful to Professor M. A. Titok, Assistant Professor V. Ye. Miamin, Assistants of the Biological Faculty of the BSU E. E. Komar (Department of Microbiology) and Yu. N. Gorovik (Department of Molecular Biology), as well as Senior researcher V. N. Akimov (IBPM RAS, Pushchino) for providing bacterial strains.

Список использованных источников

1. Asha Poorna, C. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling / C. Asha Poorna, P. Prema // *Biores. Technol.* – 2007. – Vol. 98, N 3. – P. 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.033>
2. Kaushal, M. *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum* / M. Kaushal, A. Kumar, R. Kaushal // *3 Biotech.* – 2017. – Vol. 7, N 2. – Art. 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0732-7>
3. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings / L. E. de-Bashan [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 69, N 3. – P. 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.014>
4. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use / L. H. Duc [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, N 4. – P. 2161–2171. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004>
5. Galal, A. A. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants / A. A. Galal, A. A. El-Bana, J. Janse // *Egypt J. Phytopathol.* – 2006. – Vol. 34, N 1. – P. 17–19.
6. Bentur, H. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report / H. N. Bentur, A. M. Dalzell, F. A. Riordan // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* – 2007. – Vol. 6. – Art. 12. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-12>
7. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain / M. I. Font [et al.] // *Plant Pathol.* – 2010. – Vol. 59, N 2. – P. 400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x>
8. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants / M. Kimouli [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 61, N 4. – P. 596–599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033175-0>
9. Complete nucleotide sequence and determination of the replication region of the sporulation inhibiting plasmid p576 from *Bacillus pumilus* NRS576 / P. K. Singh [et al.] // *Res. Microbiol.* – 2010. – Vol. 161, N 9. – P. 772–782. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.07.007>
10. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1 / D. C. Garcia-Ramon [et al.] // *Plasmid.* – 2015. – Vol. 82. – P. 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.09.001>
11. Lovett, P. S. Cryptic plasmid in *Bacillus pumilus* ATCC 7065 / P. S. Lovett, B. D. Burdick // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1973. – Vol. 54, N 1. – P. 365–370. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(73\)90931-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(73)90931-5)

12. Host function specified by *Bacillus pumilus* plasmid pPL7065 / P. S. Lovett [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1977. – Vol. 12, N 3. – P. 435–437. <https://doi.org/10.1128/aac.12.3.435>
13. Lovett, P. S. Plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* / P. S. Lovett, M. G. Bramucci // *J. Bacteriol.* – 1975. – Vol. 124, N 1. – P. 484–490.
14. Lovett, P. S. *Bacillus pumilus* plasmid pPL10: properties and insertion into *Bacillus subtilis* 168 by transformation / P. S. Lovett, E. J. Duvall, K. M. Keggin // *J. Bacteriol.* – 1976. – Vol. 127, N 2. – P. 817–828.
15. Hasnain, S. Two related rolling circle replication plasmids from salt-tolerant bacteria / S. Hasnain, C. M. Thomas // *Plasmid.* – 1996. – Vol. 36, N 3. – P. 191–199. <https://doi.org/10.1006/plas.1996.0046>
16. Characterization of a cryptic plasmid pPZZ84 from *Bacillus pumilus* / Z.-H. Zhang [et al.] // *Plasmid.* – 2010. – Vol. 64, N 3. – P. 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.06.006>
17. Yuan, Y. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy / Y. Yuan, M. Gao // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – Art. 10259. <https://doi.org/10.1038/srep10259>
18. Complete genome sequence of *Bacillus pumilus* PDSLzg-1, a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from oil-contaminated soil in China / K. Hao [et al.] // *Genome Announc.* – 2016. – Vol. 4, N 5. – Pii e01079–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01079-16>
19. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain GM3FR, an endophyte isolated from aerial plant tissues of *Festuca rubra* L. / J. Hollensteiner [et al.] // *Genome Announc.* – 2017. – Vol. 5, N 13. – Pii e00085–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00085-17>
20. Lovett, P. S. Plasmid in *Bacillus pumilus* and the enhanced sporulation of plasmid-negative variants / P. S. Lovett // *J. Bacteriol.* – 1973. – Vol. 115, N 1. – P. 291–298.
21. Lovett, P. S. Evidence for a nonrandom base sequence in a *Bacillus pumilus* plasmid: EcoR1 endonuclease digestion of pPL576 / P. S. Lovett, M. G. Bramucci // *J. Bacteriol.* – 1975. – Vol. 123, N 1. – P. 377–379.
22. Use of a plasmid DNA probe to monitor populations of *Bacillus pumilus* inoculant strains in hay / C. A. Hendrick [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – Vol. 57, N 3. – P. 686–693.
23. Insertion of Tn916 into *Bacillus pumilus* plasmid pMGD302 and evidence for plasmid transfer by conjugation / C. A. Hendrick [et al.] // *Plasmid.* – 1991. – Vol. 26, N 1. – P. 1–9. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(91\)90031-q](https://doi.org/10.1016/0147-619x(91)90031-q)
24. Евдокимова, О. В. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси / О. В. Евдокимова, В. Е. Мямин, Л. Н. Валентович // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология.* – 2018. – № 1. – С. 38–49.
25. Евдокимова, О. В. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦП / О. В. Евдокимова, В. Е. Мямин, Л. Н. Валентович // *Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол. : А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]*. – Минск, 2016. – Т. 21. – С. 53–63.
26. Anagnostopoulos, C. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* / C. Anagnostopoulos, J. Spizizen // *J. Bacteriol.* – 1961. – Vol. 81, N 5. – P. 741–746.
27. Крупная плазида из почвенного штамма *Bacillus subtilis*, осуществляющая конъюгативную мобилизацию с высокой частотой / О. В. Лотарева [и др.] // *Докл. Акад. наук.* – 2001. – Т. 379, № 1. – С. 130–131.
28. Tanaka, T. Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis* (natto) / T. Tanaka, T. Koshikawa // *J. Bacteriol.* – 1977. – Vol. 131, N 2. – P. 699–701.
29. Bullock, W. O. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with beta-galactosidase selection / W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short // *BioTechniques.* – 1987. – Vol. 5, N 3. – P. 376–379.
30. Voskuil, M. I. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis* / M. I. Voskuil, G. H. Chambliss // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59, N 4. – P. 1138–1142.
31. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74, N 12. – P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
32. Титок, М. А. Плазмиды грамположительных бактерий / М. А. Титок. – Минск : Изд-во БГУ, 2004. – 120 с.
33. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria / W. J. Meijer [et al.] // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1998. – Vol. 21, N 4. – P. 337–368. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(98\)00003-5](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(98)00003-5)
34. New cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and restriction analysis of other plasmids found by general screening / T. Uozumi [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1980. – Vol. 142, N 1. – P. 315–318.
35. Distribution of heterogeneous and homologous plasmids in *Bacillus* spp. / K. Yoshimura [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1983. – Vol. 45, N 6. – P. 1733–1740.

References

1. Asha Poorna C., Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresource Technology*, 2006, vol. 98, no. 3, pp. 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.033>
2. Kaushal M., Kumar A., Kaushal R. *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. *3 Biotech*, 2017, vol. 7, no. 2, art. 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0732-7>
3. De-Bashan L. E., Hernandez J.-P., Bashan Y., Maier R. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, vol. 69, no. 3, pp. 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.014>

4. Duc L. H., Hong H. A., Barbosa T. M., Henriques A. O., Cutting S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, no. 4, pp. 2161–2171. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004>
5. Galal A. A., El-Bana A. A., Janse J. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 2006, vol. 34, no. 1, pp. 17–19.
6. Bentur H. N., Dalzell A. M., Riordan F. A. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2007, vol. 6, art. 12. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-12>
7. Font M. I., Bassimba D. M., Cebrián M. C., Molina L. M., Jordá C. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. *Plant Pathology*, 2010, vol. 59, no. 2, pp. 400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x>
8. Kimouli M., Vrioni G., Papadopoulou M., Koumaki V., Petropoulou D., Gounaris A., Friedrich A. W., Tsakris A. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, vol. 61, no. 4, pp. 596–599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033175-0>
9. Singh P. K., Ballesterro-Beltrán S., Ramachandran M., Meijer W. J. J. Complete nucleotide sequence and determination of the replication region of the sporulation inhibiting plasmid p576 from *Bacillus pumilus* NRS576. *Research in Microbiology*, 2010, vol. 161, no. 9, pp. 772–782. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.07.007>
10. Garcia-Ramon D. C., Luque-Navas M. J., Luque-Navas C. A., del Val C., Osuna A., Vilchez S. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1. *Plasmid*, 2015, vol. 82, pp. 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.09.001>
11. Lovett P. S., Burdick B. D. Cryptic plasmid in *Bacillus pumilus* ATCC 7065. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1973, vol. 54, no. 1, pp. 365–370. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(73\)90931-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(73)90931-5)
12. Lovett P. S., Duvall E. J., Bramucci M. G., Taylor R. Host function specified by *Bacillus pumilus* plasmid pPL7065. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1977, vol. 12, no. 3, pp. 435–437. <https://doi.org/10.1128/aac.12.3.435>
13. Lovett P. S., Bramucci M. G. Plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus*. *Journal of Bacteriology*, 1975, vol. 124, no. 1, pp. 484–490.
14. Lovett P. S., Duvall E. J., Keggins K. M. *Bacillus pumilus* plasmid pPL10: properties and insertion into *Bacillus subtilis* 168 by transformation. *Journal of Bacteriology*, 1976, vol. 127, no. 2, pp. 817–828.
15. Hasnain S., Thomas C. M. Two related rolling circle replication plasmids from salt-tolerant bacteria. *Plasmid*, 1996, vol. 36, no. 3, pp. 191–199. <https://doi.org/10.1006/plas.1996.0046>
16. Zhang Z.-H., Tian W., Liu D.-Y., Liu Y.-C., Shen Q.-R., Shen B. Characterization of a cryptic plasmid pPZZ84 from *Bacillus pumilus*. *Plasmid*, 2010, vol. 64, no. 3, pp. 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.06.006>
17. Yuan Y., Gao M. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5, art. 10259. <https://doi.org/10.1038/srep10259>
18. Hao K., Li H., Li F., Guo P. Complete genome sequence of *Bacillus pumilus* PDSLzg-1, a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from oil-contaminated soil in China. *Genome Announcements*, 2016, vol. 4, no. 5, pii e01079–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01079-16>
19. Hollensteiner J., Poehlein A., Daniel R., Liesegang H., Vidal S., Wemheuer F. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain GM3FR, an endophyte isolated from aerial plant tissues of *Festuca rubra* L. *Genome Announcements*, 2017, vol. 5, no. 13, pii e00085–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00085-17>
20. Lovett P. S. Plasmid in *Bacillus pumilus* and the enhanced sporulation of plasmid-negative variants. *Journal of Bacteriology*, 1973, vol. 115, no. 1, pp. 291–298.
21. Lovett P. S., Bramucci M. G. Evidence for a nonrandom base sequence in a *Bacillus pumilus* plasmid: EcoRI endonuclease digestion of pPL576. *Journal of Bacteriology*, 1975, vol. 123, no. 1, pp. 377–379.
22. Hendrick C. A., Smiley B. K., Shelley T. H., Tomes N. J. Use of a plasmid DNA probe to monitor populations of *Bacillus pumilus* inoculant strains in hay. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, vol. 57, no. 3, pp. 686–693.
23. Hendrick C. A., Johnson L. K., Tomes N. J., Smiley B. K., Price J. P. Insertion of Tn916 into *Bacillus pumilus* plasmid pMGD302 and evidence for plasmid transfer by conjugation. *Plasmid*, 1991, vol. 26, no. 1, pp. 1–9. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(91\)90031-q](https://doi.org/10.1016/0147-619x(91)90031-q)
24. Evdokimova O. V., Myamin V. E., Valentovich L. N. Biochemical and molecular genetic characteristics of *Bacillus pumilus* bacteria isolated in Belarus. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* [Journal of Belarusian State University. Biology], 2018, no. 1, p. 38–49 (in Russian).
25. Evdokimova O. V., Myamin V. E., Valentovich L. N. Identification of *Bacillus pumilus* bacteria by using species-specific PCR assay. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: a collection of scientific papers]. Minsk, 2016, vol. 21, pp. 53–63 (in Russian).
26. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1961, vol. 81, no. 5, pp. 741–746.
27. Lotareva O. V., Poluektova E. U., Titok M. A., Prozorov A. A. Large plasmid from soil strain *Bacillus subtilis*, performing conjugative mobilization with high frequency. *Doklady Biological Sciences*, 2001, vol. 379, no. 1–6, pp. 334–335. <https://doi.org/10.1023/A:1011696012313>
28. Tanaka T., Koshikawa T. Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis* (natto). *Journal of Bacteriology*, 1977, vol. 131, no. 2, pp. 699–701.
29. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 1987, vol. 5, no. 3, pp. 376–379.

30. Voskuil M. I., Chambliss G. H. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, vol. 59, no. 4, pp. 1138–1142.
31. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
32. Titok M. A. *Plasmids of gram-positive bacteria*. Minsk, Publishing House of the Belarusian State University, 2004. 130 p. (in Russian).
33. Meijer W. J., Wisman G. B., Terpstra P., Thorsted P. B., Thomas C. M., Holsappel S., Venema G., Bron S. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, vol. 21, no. 4, pp. 337–368. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(98\)00003-5](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(98)00003-5)
34. Uozumi T., Ozaki A., Beppu T., Arima K. New cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and restriction analysis of other plasmids found by general screening. *Journal of Bacteriology*, 1980, vol. 142, no. 1, pp. 315–318.
35. Yoshimura K., Yamamoto O., Seki T., Oshima Y. Distribution of heterogeneous and homologous plasmids in *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, vol. 45, no. 6, pp. 1733–1740.

Информация об авторах

Евдокимова Олеся Владимировна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: evdokimovalesia@gmail.com

Чиндарева Мария Александровна – студентка. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: maryja.che@gmail.com

Валентович Леонид Николаевич – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь), Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Olesia V. Evdokimova – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: evdokimovalesia@gmail.com

Maryja A. Chindareva – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: maryja.che@gmail.com

Leonid N. Valentovich – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus), Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 581.9(476)
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-302-310>

Поступила в редакцию 21.11.2018
Received 21.11.2018

В. Н. Ильина

Самарский государственный социально-педагогический университет, Самара, Российская Федерация

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ТИПЫ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ КОПЕЕЧНИКА КРУПНОЦВЕТКОВОГО (*HEDYSARUM GRANDIFLORUM* PALL.) В БАСЕЙНЕ СРЕДНЕЙ ВОЛГИ

Аннотация. Не вызывает сомнений необходимость изучения современного состояния ценоотических популяций редких видов растений в природе для сохранения флористического и фитоценоотического разнообразия на региональном и мировом уровнях. Цель нашего исследования – изучение современного состояния ценоотических популяций редкого в бассейне Средней Волги *Hedysarum grandiflorum* Pall. Для характеристики онтогенетической структуры ценопопуляций применяли общепринятые демографические показатели: индекс восстановления, индекс замещения, индекс старения. Оценка популяций проведена по критерию «дельта-омега».

Выделены основные пути онтогенеза видов – нормальный, ускоренный и замедленный, отмечены перерывы в развитии особей, их омоложение и проявление квазисенильности. Большинство особей *H. grandiflorum* развиваются в нормальном и ускоренном темпе. Основным показателем для определения современного состояния популяций и их локусов является онтогенетическая структура. В качестве примера приведены сведения по онтогенетическому составу некоторых ценопопуляций *H. grandiflorum* на Чубовской Красной горке (Высокое Самарское Заволжье, Россия). Для популяций характерно преобладание генеративных особей. Из зарегистрированных ценопопуляций 11 характеризуется как зрелые, 9 – переходные, 2 – зрелые, 1 – молодая. Для пространственной структуры особей копеечника крупноцветкового свойственна агрегированность.

Для вида свойственны относительно узкий диапазон эколого-фитоценоотических условий произрастания, большей частью патиентный тип жизненной стратегии. К числу лимитирующих развитие популяций экологических факторов следует отнести такие, как положение их на границе ареала, неконтролируемый выпас скота на участках, чрезмерную рекреацию территорий и степные пожары, карьерные разработки известняковых и меловых склонов, возникновение стихийных свалок бытового и строительного мусора, прокладку грунтовых дорог и строительство.

Ключевые слова: *Hedysarum grandiflorum* Pall., Fabaceae, ценопопуляция, тип популяций, онтогенетическая структура, базовый онтогенетический спектр, Красная книга, Самарская область, Волжский бассейн

Для цитирования: Ильина, В. Н. Онтогенетическая структура и типы ценопопуляций копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) в бассейне Средней Волги / В. Н. Ильина // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 302–310. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-302-310>

V. N. Ilyina

Samara State University of Social Sciences and Education, Samara, Russian Federation

ONTOGENETIC STRUCTURE AND TYPES OF CENOPOPULATION OF *HEDYSARUM GRANDIFLORUM* PALL. IN THE MIDDLE VOLGA BASIN

Abstract. The need to study the current state of cenotic populations of rare plant species in nature is not in doubt for the conservation of floristic and phytocenotic diversity at the regional and world levels. The purpose of our study is to study the current state of the cenotic populations of Rare in the Middle Volga basin *Hedysarum grandiflorum* Pall. To characterize the ontogenetic structure of the cenopopulations, generally accepted demographic indicators were used: the recovery index (the ratio of growth to the generative fraction is calculated), the replacement index (the ratio of growth and the sum of generative and post-regenerative fractions), and the aging index (post-generative to the adult part of the cenotic populations). The population estimation was carried out by the criterion “delta-omega”.

A relatively narrow range of ecological and phytocenotic growth conditions is characteristic of the species, for the most part a patient type of life strategy. Among the limiting factors for the development of populations of environmental factors are their location at the border of the area, uncontrolled grazing in areas, excessive recreation of territories and steppe fires (natural origin and pala) in phytocenoses with the participation of a penny, career development of limestone and Cretaceous slopes, and construction debris, the appearance of dirt roads and the construction of various objects in the points of growth of the model species.

The main ways of ontogenesis of the species are identified – normal, accelerated and delayed, breaks in the development of individuals, their rejuvenation and the manifestation of quasisenility were noted. The majority of *H. grandiflorum* develop

at a normal and accelerated rate. The main indicator for determining the current state of populations and their loci is the ontogenetic structure. As an example, information on the ontogenetic composition of some cenopopulations of *H. grandiflorum* at the Chubovskaya Krasnaya Gorka (High Samara Zavolzhye, Russia) is given. Populations are characterized by the predominance of generative individuals. Of the registered cenopopulations, 11 is characterized as mature, 9 – transitional, 2 – ripening, 1 – young. Aggregation is characteristic of the spatial structure of *H. grandiflorum*.

Keywords: *Hedysarum grandiflorum* Pall., Fabaceae, cenopopulation, type of populations, ontogenetic structure, basic ontogenetic spectrum, Red Data Book, Samara Region, Volga basin

For citation: Ilyina V. N. Ontogenetic structure and types of cenopopulation of *Hedysarum grandiflorum* Pall. in the Middle Volga basin. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 302–310 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-302-310>

Введение. Изучение природных популяций растений уже длительное время является неотъемлемой частью экологического мониторинга растительного покрова и оценки состояния биологических макросистем [1–7]. В качестве объектов исследования авторами чаще всего избираются эндемичные, редкие, уязвимые виды растений. Научная и практическая значимость таких работ не вызывает сомнений. Данные многоаспектного мониторинга популяций растений в природе, а также при интродукции, в том числе оригинальный материал по онтоморфогенезу, экологической пластичности, пространственно-онтогенетической структуре и динамике популяций, их жизненной стратегии, позволяют оценить состояние природных комплексов, рассмотреть возможные пути сукцессионных изменений фитоценозов с участием модельных видов растений и дать рекомендации по дальнейшей охране редких растений, растительных сообществ и объектов природного наследия. В Самарской области (Россия) изучение биологии и экологии видов на популяционном и ценотическом уровне организации осуществляется более 20 лет [8–13]. Исследователями за эти годы собран богатый фактический материал, раскрывающий особенности биологии и экологии редких видов растений региона.

Среди большого числа интересных в научном и практическом плане растений в регионе – копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall., Fabaceae). Это травянистый стержнекорневой каудексный многолетник высотой 15–35 см. Листья непарноперистые, с обеих сторон серебристо-волосистые. Листочки в числе 2–5 пар продолговатые или эллиптические. Крупные цветки собраны в густые кисти. Венчики длиной до 2–2,5 см, беловато-желтые. Цветет в мае–июне. Размножение семенное.

В Самарской области *H. grandiflorum* Pall. включен в региональную Красную книгу с категорией 5 – восстанавливающийся вид [14]. Встречается в Восточной Европе, в том числе на Украине и в Казахстане. В регионе произрастает на северной границе ареала. Включен в Красную книгу РФ (категория 3в) [15]. Находится под охраной в Республике Татарстан (категория 3) [16], Оренбургской (категория 1) [17], Саратовской (категория 3) [18] и Ульяновской (категория 2) областях [19]. Включен в первое издание Красной книги Самарской области (категория 5/Г – условно редкий вид со стабильной численностью) [20].

Ксерофит. Гелиофит. Кальцефил. Произрастает *H. grandiflorum* в каменистых степях, по кустарниковым опушкам на склонах известняковой, меловой, доломитовой, мергелистой литологии. Как правило, приурочен к выходам пород верхнепермской системы. По данным автора, популяции в большинстве случаев зрелые нормальные полночленные с одновершинным спектром с максимумом на зрелых генеративных особях (43 %) [8, 10–13]. На территории Самарской и сопредельных областей зарегистрированы неустойчивые (95 %) и перспективные (5 %) популяции *H. grandiflorum*.

Для вида свойственны относительно узкий диапазон эколого-фитоценотических условий произрастания, большей частью патиентный тип жизненной стратегии. В числе лимитирующих развитие популяций экологических факторов следует назвать положение их на границе ареала, неконтролируемый выпас скота на участках, чрезмерную рекреацию территорий и степные пожары (естественного происхождения и палы) в фитоценозах с участием копеечника, карьерные разработки известняковых и меловых склонов, возникновение стихийных свалок бытового и строительного мусора, прокладку грунтовых дорог и строительство различных объектов в пунктах произрастания модельного вида.

Цель данного исследования – изучение современного состояния ценогенетических популяций редкого в бассейне Средней Волги копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.).

В задачи работы входило определение онтогенетического состава природных популяций, выявление базового онтогенетического спектра и основных демографических характеристик популяций, выявление типа исследованных ценопопуляций (ЦП) модельного вида с использованием критерия возрастности-эффективности («дельта-омега»).

Материалы и методы исследования. Нами изучена структура более 1000 природных ЦП *H. grandiflorum* в период 2000–2018 гг. Территория исследований охватывает бассейн Средней Волги в правобережье Самарской и Ульяновской областей (включая Самарскую Луку) и в левобережье Самарской, Оренбургской, Ульяновской областей (бассейны рек Самара, Сок, Урал).

В ходе работ применяли традиционные популяционно-онтогенетические методы [1–8]. Для изучения демографической структуры и плотности ЦП в каждой из них на трансекте закладывали 10–100 пробных площадок размером 1 м². Порядок заложения (линейный или шахматный) зависел от площади конкретной популяции. В случае малочисленности популяций учет особей производили в реальном контуре фитоценоза. Определяли основные популяционные характеристики, такие как общая плотность особей и онтогенетический состав.

При определении возрастной структуры ЦП, согласно стандартным критериям [1–5, 21, 22], учитывали следующие возрастные (онтогенетические) состояния: проростки (*p*), ювенильные (*j*), имматурные (*im*), виргинильные (*v*), молодые генеративные (*g*₁), средневозрастные генеративные (*g*₂), старые генеративные (*g*₃), субсенильные (*ss*), сенильные (*s*).

Для характеристики онтогенетической структуры ЦП применяли общепринятые демографические показатели: индекс восстановления (рассчитывается как соотношение подростка и генеративной фракции), индекс замещения (соотношение подростка и суммы генеративных и постгенеративных фракций), индекс старения (соотношение постгенеративной и взрослой части особей в ЦП). Оценка популяций проведена по критерию «дельта-омега» [23].

Для оценки фитоценогенетической приуроченности ЦП выполняли геоботаническое описание сообщества на площадках 25–100 м² ленточной или квадратной формы с использованием традиционных геоботанических методов [24].

Результаты и их обсуждение. Оценка состояния популяций растений и определение динамических тенденций возможны с использованием предварительного описания стадий большого жизненного цикла модельных видов. Первый этап нашего исследования заключался в выявлении состояний онтогенеза копеечника крупноцветкового. В большом жизненном цикле вида в условиях Средней Волги отмечено 10 онтогенетических состояний (семена, проростки, ювенильное, имматурное, виргинильное; молодое, зрелое и старое генеративные; субсенильное и сенильное). Продолжительность полного онтогенеза определялась как сумма длительности всех состояний, пройденных особями. Для *H. grandiflorum* она составляет 10–38, а возможно, и более лет.

Выделены основные пути онтогенеза видов – нормальный, ускоренный и замедленный, отмечены перерывы в развитии особей, их омоложение и проявление квазисенильности. Большинство особей *H. grandiflorum* развиваются в нормальном и ускоренном темпе. Течение онтогенеза замедляется при большой плотности растений. Установлено, что вторичный покой не наступает на ранних стадиях развития, а возможен только после достижения особями виргинильного состояния. Переход имматурных растений сразу в зрелые генеративные, минуя виргинильное состояние, не наблюдался. Субсенильные особи никогда не «омолаживаются» до молодой и зрелой онтогенетических стадий, а лишь способны на короткое время переходить в зрелое генеративное или в подобное виргинильному состояние.

Основным показателем для определения современного состояния популяций и их локусов является онтогенетическая структура. В качестве примера приведем данные по онтогенетическому составу некоторых ЦП *H. grandiflorum* на Чубовской Красной горке (входит в состав памятника природы регионального значения «Чубовская степь» на территории Кинельского района Самарской области) (табл. 1).

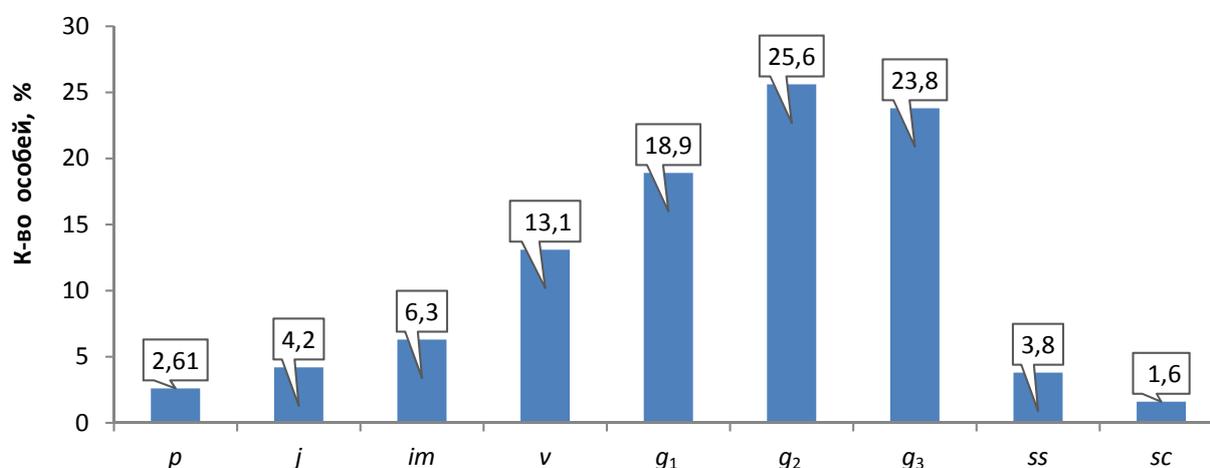
Таблица 1. Онтогенетическая структура ценопопуляций *H. grandiflorum*

Table 1. Ontogenetic structure of cenopopulations of *H. grandiflorum*

Характеристика сообщества	Онтогенетическая группа особей ценопопуляций, %								
	<i>p</i>	<i>j</i>	<i>im</i>	<i>v</i>	<i>g</i> ₁	<i>g</i> ₂	<i>g</i> ₃	<i>ss</i>	<i>s</i>
Петрофитная степь, верхняя часть ЮЗ склона, 5–7°, ковылково-копеечниковое сообщ., ОПП – 25–27 %	7,8	6,4	5,7	10,2	16,8	17,9	25,3	2,4	7,5
	3,3	12,6	13,8	10,4	11,3	20,7	21,4	3,7	2,8
	6,0	6,7	3,6	12,5	28,6	28,2	7,1	5,1	2,2
	10,3	8,8	3,4	14,8	17,9	23,8	17	2,3	1,7
Петрофитная степь, верхняя часть Ю склона, 8–9°, ковылково-солонечниковое сообщ., ОПП – 20–22 %	4,2	5,3	8,6	3,3	26,4	30,7	17,4	2,2	1,9
	2,5	2,5	2,8	18,5	20,2	22,9	28,3	1,8	0,5
	6,2	6,1	8,0	6,8	12,5	26,5	33,9	0	0
	0	0	9,6	26,6	10,2	30,6	16,4	6,6	0
Петрофитная степь, бровка Ю склона, 2°, ковылково-пыльчковое сообщ., ОПП – 20–22 %	0	0	5,9	12,6	24,3	25	26,7	1,4	4,1
	0	0	0	10,1	16,4	32,8	31,6	5,6	3,5
	0	9,8	4,4	10,6	15,9	22,8	30,7	5,8	0
	5	6,4	2,9	10,8	36,8	16,9	19,4	1,8	0
Петрофитная степь, бровка В склона, 2–4°, ковылково-разнотравное сообщ., ОПП – 30 %	2,9	6,8	13,5	11,1	8,9	22,7	28,9	3,4	1,8
	0	0	5,3	14,7	20,7	22,6	32,7	4	0
	0	0,2	10,4	12,2	15,1	29,8	26,1	6,2	0
	0	0	4,8	7,4	15,7	33,7	33,5	4,9	0
Петрофитная степь, бровка В склона, 10–12°, ковылково-копеечниковое сообщ., ОПП – 10–12 %	0	0	6,4	15,3	22,7	33,1	15,6	6,9	0
	0	5,9	4,6	28,4	13,2	18,9	20,6	8,4	0
	0	0,9	6,9	13,3	24,5	14,8	39,6	0	0
	2,7	5,2	7,4	22,1	30,5	20,6	10,7	0,8	0
Среднее значение	0	0	3,9	12,8	24,6	29,9	26,6	2,2	0
	2,6	4,2	6,3	13,1	18,9	25,6	23,8	3,8	1,6

Примечание. ОПП – общее проективное покрытие почвы травостоем.

Базовым для изученного вида является онтогенетический спектр ЦП с максимумом на зрелом генеративном состоянии (в Чубовской степи – 25,6 %) (см. табл. 1, рисунок). Это определяется длительностью состояния и накоплением генеративных особей в сообществах, обычно составляющих «ядро» популяции. Вторую позицию в ЦП занимают старые генеративные растения – 23,8 %, на третьем месте обычно находятся молодые генеративные особи – 18,9 %.



Базовый онтогенетический спектр *H. grandiflorum*

The basal ontogenetic spectrum of *H. grandiflorum*

Таблица 2. Основные демографические показатели и тип ценопопуляций *H. grandiflorum*Table 2. Main demographic indicators and type of cenopopulations of *H. grandiflorum*

№ ЦП	Демографический показатель								Тип ЦП
	$p-v$, %	g_1-g_3 , %	$ss-s$, %	I_3	I_b	I_{ct}	Δ	ω	
1	30,1	60	9,9	0,43	0,50	0,11	0,43	0,59	Переходная
2	40,1	53,4	6,5	0,67	0,75	0,07	0,37	0,56	Переходная
3	28,8	63,9	7,3	0,40	0,45	0,08	0,35	0,65	Переходная
4	37,3	58,7	4	0,59	0,64	0,04	0,35	0,60	Зреющая
5	42	52,5	5,5	0,72	0,80	0,06	0,32	0,57	Молодая
6	21,4	74,5	4,1	0,27	0,29	0,04	0,40	0,70	Зрелая
7	26,3	71,4	2,3	0,36	0,37	0,02	0,42	0,70	Зрелая
8	27,1	72,9	0	0,37	0,37	0	0,43	0,68	Переходная
9	36,2	57,2	6,6	0,57	0,63	0,07	0,39	0,67	Переходная
10	12,7	76,9	10,4	0,15	0,17	0,12	0,49	0,76	Зрелая
11	18,5	76	5,5	0,23	0,24	0,06	0,46	0,73	Зрелая
12	10,1	80,8	9,1	0,11	0,13	0,10	0,54	0,78	Зрелая
13	24,8	69,4	5,8	0,33	0,36	0,06	0,45	0,68	Переходная
14	25,1	73,1	1,8	0,34	0,34	0,02	0,36	0,67	Переходная
15	34,3	60,5	5,2	0,52	0,57	0,05	0,42	0,62	Переходная
16	20	76	4	0,25	0,26	0,04	0,46	0,73	Зрелая
17	22,8	71	6,2	0,30	0,32	0,07	0,45	0,72	Зрелая
18	12,2	82,9	4,9	0,14	0,15	0,05	0,51	0,78	Зрелая
19	21,7	71,4	6,9	0,28	0,30	0,07	0,42	0,74	Зрелая
20	38,9	52,7	8,4	0,64	0,74	0,09	0,39	0,62	Переходная
21	21,1	78,9	0	0,27	0,27	0	0,45	0,72	Зрелая
22	37,4	61,8	0,8	0,60	0,61	0,01	0,30	0,64	Зреющая
23	71,2	81,1	2,2	0,20	0,21	0,01	0,45	0,77	Зрелая
Среднее значение	28,70	68,57	5,10	0,36	0,38	0,05	0,42	0,68	

Возобновление природных популяций *H. grandiflorum* осуществляется в большей степени за счет семян в возрасте до 1–2 лет. Несмотря на невысокие показатели реальной семенной продуктивности и средние показатели индексов восстановления ($I_b = 0,38$), замещения особей ($I_3 = 0,36$) и индекса старения популяций ($I_{ct} = 0,05$), часто копечник крупноцветковых занимает субдоминирующее или даже доминирующее положение в фитоценозах (ЦП № 1–5: петрофитная степь, верхняя часть ЮЗ склона, 5–7°, ковылково-копеечниковое сообщество, общее проективное покрытие почвы травостоем – 25–27 %; ЦП № 16–20: петрофитная степь, бровка В склона, 2–4°, ковылково-разнотравное сообщество, ОПП – 30 %; ЦП № 21–23: петрофитная степь, верхняя часть В склона, 10–12°, ковылково-копеечниковое сообщество, ОПП – 10–12 %).

С помощью критерия «дельта-омега» [23] выявлено, что на Чубовской Красной горке 11 зарегистрированных ЦП характеризуется как зрелые, 9 – переходные, 2 – зреющие, 1 – молодая. В целом эти данные согласуются с полученными в Волго-Уральском регионе [13, 25–29].

Определение виталитетного состояния особей проводили на основе анализа высоты экземпляров, количества побегов, числа цветоносов, диаметра каудекса, длины листьев, размеров листочков, количества цветков в соцветии и некоторых других признаков. После проведения статистической обработки полученных данных выделено три класса виталитета. Установлено, что в ЦП *H. grandiflorum* преобладают особи второго (среднего) уровня жизненности.

Пространственная структура ЦП характеризуется агрегированным типом размещения особей, со скоплениями виргинильных растений вокруг генеративных. Выделено три уровня агрегированности; мелкие агрегации входят в состав более крупных, образуя центры скопления. Удалось выявить «всплески» и «провалы» числа особей в популяциях на единицу площади. Благоприятным следует считать нахождение на 1 м² 6–7 взрослых особей *H. grandiflorum*. В малочисленных популяциях размеры скоплений невелики по сравнению с расстоянием между этими

скоплениями. В промежутках между агрегациями зафиксированы единичные особи, в других случаях скопления расположены дискретно и отдельных особей между ними нет.

Оптимальные местообитания копеечника характеризуются разреженным травостоем с активным покрытием почвы не более 10–35 %. В этом случае виды могут стабильно удерживать территорию, проявляя высокую конкурентную способность и виолентные черты. В угнетенных ЦП *H. grandiflorum* отмечен пациентный тип жизненной стратегии.

H. grandiflorum обладает вторичным типом жизненной стратегии, является конкурентоспособным стресс-толерантом по системе эколого-ценотических стратегий Д. Грайма [30].

На стационарных площадках средняя плотность особей в расчете на 1 м² составляет 3,55 экземпляра различного возраста. По онтогенетическим фракциям наблюдается следующее распределение: с достаточно высокой плотностью располагаются виргинильные и зрелые генеративные растения, со средней произрастают имматурные, молодые и старые генеративные экземпляры, низкая плотность характерна при размещении субсенильных особей и проростков (по данным на конец июля). В начале сезона при массовом появлении проростков плотность последних может достигать 20–40 особей на 1 м², однако в дальнейшем наблюдается их элиминация.

Для пространственной структуры особей копеечника крупноцветкового свойственна агрегированность. В среднем в скопления входит около 60–70 % особей от общей численности в популяции. Средняя величина скоплений экземпляров составляет 30–60 см в диаметре, хотя наиболее крупные агрегации достигают 2 м в длину и 1,5 м в ширину (иногда и более, вплоть до почти равномерного размещения).

Что касается распределения по фракциям внутри скоплений, то в них преобладают растения в зрелом генеративном состоянии, остальные фракции хоть и уступают, но незначительно. Таким образом, основные онтогенетические группы представлены равномерно. Это свидетельствует о стабильности популяций в регионе в ряде пунктов. Однако для этих популяций свойственны и некоторые различия в структуре, что говорит также о лабильности онтогенетических спектров и пространственной организации.

Около 30–40 % особей не входят в состав скоплений, но играют значимую роль в сложении популяции и фитоценоза в целом. Чаще всего вне скоплений произрастают виргинильные и зрелые генеративные растения. Оценивая промежутки между скоплениями, следует отметить, что более или менее равномерно в популяциях размещаются зрелые генеративные и виргинильные особи.

По мере роста и взросления особей в ЦП обычно их число изреживается. Так, вокруг зрелых генеративных растений (с учетом фитогенных полей) в среднем произрастает 1,5–2 особи любого возраста, в некоторых популяциях – до 6.

Заключение. Выделены основные пути онтогенеза видов – нормальный, ускоренный и замедленный, отмечены перерывы в развитии особей, их омоложение и проявление квазисенильности. Большинство особей *H. grandiflorum* развиваются в нормальном и ускоренном темпе.

Изученные в условиях Высокого Самарского Заволжья (на отрогах Бугульмино-Белебеевской возвышенности) ценотические популяции *H. grandiflorum* в основном характеризуются как зрелые (48 %) и переходные к зрелому типу (39 %). Они отмечены в составе сообществ петрофитных степей (верхняя часть ЮЗ склона, 5–7°, ковылково-копеечниковое сообщество, ОПП – 25–27 %; верхняя часть Ю склона, 8–9°, ковылково-солонечниковое сообщество, ОПП – 20–22 %; бровка Ю склона, 2°, ковылково-полынковое сообщество, ОПП – 20–22 %; бровка В склона, 2–4°, ковылково-разнотравное сообщество, ОПП – 30 %; верхняя часть В склона, 10–12°, ковылково-копеечниковое сообщество, ОПП – 10–12 %) и испытывают антропогенную нагрузку при рекреации, выпасе крупного рогатого скота, степных палат. Пространственная структура ЦП характеризуется агрегированным типом размещения особей.

Для копеечника свойственна стенобионтность относительно эколого-фитоценотических условий произрастания и пациентный тип жизненной стратегии. Лимитируют развитие популяций расположение на границе ареала, неконтролируемый выпас скота, значительная рекреация и степные пожары, карьерные разработки известняка и мела, а также стихийные свалки бытового и строительного мусора, прокладка грунтовых дорог и строительство.

Список использованных источников

1. Работнов, Т. А. Биологические наблюдения на субальпийских лугах Северного Кавказа / Т. А. Работнов // Бот. журн. – 1945. – Т. 30, № 4. – С. 167–176.
2. Работнов, Т. А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах / Т. А. Работнов // Тр. Бот. ин-та АН СССР. Сер. 3, Геоботаника. – 1950. – Вып. 6. – С. 77–204.
3. Работнов, Т. А. К методике наблюдения над травянистыми растениями на постоянных площадках / Т. А. Работнов // Бот. журн. – 1951. – Т. 36, № 6. – С. 643–646.
4. Ценопопуляции растений : Основные понятия и структура / Л. И. Воронцова [и др.] ; отв. ред. Т. И. Серебрякова. – М. : Наука, 1976. – 216 с.
5. Ценопопуляции растений. Развитие и взаимоотношения / А. Г. Богданова [и др.] ; отв. ред. Т. И. Серебрякова. – М. : Наука, 1977. – 134 с.
6. Ценопопуляции растений : (Очерки популяционной биологии) / Л. Б. Заугольнова [и др.] ; отв. ред. Т. И. Серебрякова, Т. Г. Соколова. – М. : Наука, 1988. – 181 с.
7. Жукова, Л. А. Многообразие путей онтогенеза в популяциях растений / Л. А. Жукова // Экология. – 2001. – № 3. – С. 169–176.
8. Ильина, В. Н. Онтогенетические спектры ценопопуляций некоторых кальцефитов Самарской Луки / В. Н. Ильина // Экологические, морфофизиологические особенности и современные методы исследования живых систем : сб. материалов / Казан. гос. пед. ун-т [и др.]. – Казань, 2003. – С. 17–20.
9. Ильина, В. Н. О роли квазисенильных особей в популяциях кальцефильных видов растений в степях бассейна Средней Волги / В. Н. Ильина // Принципы и способы сохранения биоразнообразия : материалы III Всерос. науч. конф., 27 янв. – 1 февр. 2008 г., г. Йошкар-Ола / Мар. гос. ун-т ; отв. ред. Л. А. Жукова. – Йошкар-Ола ; Пушкино, 2008. – С. 335–336.
10. Ильина, В. Н. Структура и динамика популяций некоторых кальцефитов Средней Волги / В. Н. Ильина // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: материалы V Междунар. науч. конф., 9–13 дек. 2013 г., г. Йошкар-Ола : в 2 ч. / Мар. гос. ун-т ; отв. ред. : О. Л. Воскресенская, Л. А. Жукова. – Йошкар-Ола, 2013. – Ч. 1. – С. 266–268.
11. Ильина, В. Н. Определение природоохранного статуса редких видов растений Красной книги Самарской области (второе издание) на основе особенностей их онтогенеза и популяционной структуры / В. Н. Ильина // Фиторазнообразие Восточной Европы. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 98–113.
12. Ильина, В. Н. Изменения базовых онтогенетических спектров популяций некоторых редких видов растений Самарской области при антропогенной нагрузке на местообитания / В. Н. Ильина // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2015. – Т. 24, № 3. – С. 144–170.
13. 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.
14. Ильина, В. Н. Копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall) / В. Н. Ильина, С. В. Саксонов, Г. Н. Родионова // Красная книга Самарской области. – Тольятти, 2007. – Т. 1 : Редкие виды растений, лишайников и грибов / под ред. Г. С. Розенберга, С. В. Саксонова. – С. 128.
15. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / редкол. : Ю. П. Трутнев [и др.]. – М. : Т-во науч. изд. КМК, 2008. – 855 с.
16. Красная книга Республики Татарстан (животные, растения, грибы) / гл. ред. А. А. Назиров. – Казань : Изд-во «Идеал-Пресс», 2016. – 760 с.
17. О внесении изменений в постановление Правительства Оренбургской области от 26 января 2012 г., № 67-п : постановление Правительства Оренбургской области, 16 апр. 2014 г., № 229-п [Электронный ресурс] // КОДЕКС. Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации. – Режим доступа : <http://docs.cntd.ru/document/460292488>. – Дата доступа : 27.05.2019.
18. Красная книга Саратовской области. Грибы. Лишайники. Растения. Животные / науч. ред. : Г. В. Шляхтин. – Саратов : Изд-во Торг.-промышл. палаты Саратов. обл., 2006. – 526 с.
19. Красная книга Ульяновской области / под науч. ред. Е. А. Артемьевой, А. В. Масленникова, М. В. Корепова. – М. : Изд-во «Буки Веди», 2015. – 549 с.
20. Плаксина, Т. И. Астрагал длинноножковый (*Astragalus macropus* Bunge) / Т. И. Плаксина, Н. С. Ильина, В. Н. Ильина // Красная книга Самарской области. – Тольятти, 2007. – Т. 1 : Редкие виды растений, лишайников и грибов / под ред. Г. С. Розенберга, С. В. Саксонова. – С. 121.
21. Уранов, А. А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функция времени и энергетических волновых процессов / А. А. Уранов // Биол. науки. – 1975. – № 2. – С. 7–34.
22. Жукова, Л. А. Популяционная жизнь луговых растений / Л. А. Жукова. – Йошкар-Ола ; М. : Гос. ком. Рос. Федерации по высш. образованию, 1995. – 224 с.
23. Животовский, Л. А. Онтогенетические состояния, эффективная плотность и классификация популяций растений / Л. А. Животовский // Экология. – 2001. – № 1. – С. 3–7.
24. Шенников, А. П. Введение в геоботанику / А. П. Шенников. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1964. – 447 с.
25. Ильина, В. Н. Эколого-биологические особенности и структура ценопопуляций редких видов рода *Hedysarum* L. в условиях бассейна Средней Волги : автореф. дис. ... канд. биол. наук 03.00.16 / В. Н. Ильина ; Ин-т экологии Волж. бассейна Рос. акад. наук. – Тольятти, 2006. – 19 с.
26. Ильина, В. Н. Онтогенез копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) / В. Н. Ильина // Онтогенетический атлас растений / отв. ред. Л. А. Жукова. – Йошкар-Ола, 2007. – Т. 5. – С. 126–132.

27. Ильина, В. Н. О биоэкологических особенностях копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall., *Fabaceae*) в Самарской области / В. Н. Ильина // Самар. науч. вестн. – 2013. – № 4. – С. 78–80.
28. Ильина, В. Н. Структура и состояние популяций средневолжских видов рода *Hedysarum* L. (*Fabaceae*) / В. Н. Ильина // Самар. науч. вестн. – 2014. – № 2. – С. 37–40.
29. Ильина, В. Н. Характеристика растительных сообществ с участием редких копеечников (*Hedysarum* L., *Fabaceae*) / В. Н. Ильина, В. И. Матвеев // Изв. Самар. науч. центра Рос. акад. наук. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 199–205.
30. Grime, J. P. *Plant strategies and vegetation processes* / J. P. Grime. – Chichester : Wiley and Sons, 1979. 222 p.

References

1. Rabotnov T. A. Biological observations in the subalpine meadows of the North Caucasus. *Botanicheskii zhurnal* = *Botanical Journal*, 1945, vol. 30, no. 4, pp. 167–176 (in Russian).
2. 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 Academy of Sciences of USSR. Series 3. Geobotany], 1950, iss. 6, pp. 77–204 (in Russian).
3. Rabotnov T. A. To the technique of observation of herbaceous plants on permanent sites. *Botanicheskii zhurnal* = *Botanical Journal*, 1951, vol. 36, no. 6, pp. 643–646 (in Russian).
4. 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. 216 p. (in Russian).
5. Bogdanova A. G., Grigor'eva N. M., Egorova V. N. [et al.]. *Cenopopulation of plants. Development and relationships*. Moscow, Nauka Publ., 1977. 134 p. (in Russian).
6. Zaugol'nova L. B., Zhukova L. A., Komarov A. S., Smirnova O. V. *Cenopopulation of plants (essays of population biology)*. Moscow, Nauka Publ., 1988. 181 p. (in Russian).
7. Zhukova L. A. The diversity of pathways of ontogenesis in plant populations. *Ekologiya = Ecology*, 2001, no. 3, pp. 169–176 (in Russian).
8. Il'ina V. N. Ontogenetic spectra of cenopopulations of some calcephites of the Samara Luke. *Ekologicheskije, morfologičeskie i fiziologičeskie osobennosti i sovremennye metody issledovaniya zhivykh sistem: sbornik materialov* [Ecological, morphophysiological features and modern methods for the study of living systems: a collection of materials]. Kazan, 2003, pp. 17–20 (in Russian).
9. Il'ina V. N. On the role of quasisenylids in populations of calcephilous plant species in the steppes of the Middle Volga basin. *Printsipy i sposoby sokhraneniya bioraznoobraziya: materialy III Vseros. nauch. konf. (27 yanvarya–1 fevralya 2008 goda, Ioshkar-Ola)* [Principles and methods of biodiversity conservation: materials of III All-Russian scientific conference (January 27–February 1, 2008, Yoshkar-Ola)]. Yoshkar-Ola, Pushchino, 2008, pp. 335–336 (in Russian).
10. Il'ina V. N. Structure and dynamics of populations of some of the Middle Volga calcephites. *Printsipy i sposoby sokhraneniya bioraznoobraziya: materialy V Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (9–13 dekabrya 2013 goda, Ioshkar-Ola). Chast' I* [Principles and methods of biodiversity conservation: Proceedings of the V International scientific conference (December 9–13, 2013, Yoshkar-Ola). Part I]. Yoshkar-Ola, 2013, pp. 266–268 (in Russian).
11. Il'ina V. N. Determination of the conservation status of rare species of plants in the Red Book of the Samara Region (second edition) on the basis of the features of their ontogeny and population structure. *Fitoraznoobraziye Vostochnoi Evropy = Phytodiversity of Eastern Europe*, 2014, vol. 8, no. 4, pp. 98–113 (in Russian).
12. Il'ina V. N. Changes in the basic ontogenetic spectra of populations of some rare plant species in the Samara region under anthropogenic load on habitats. *Samarskaya Luka: problemy regional'noi i global'noi ekologii* [Samara Luke: problems of regional and global ecology], 2015, vol. 24, no. 3, pp. 144–170 (in Russian).
13. 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 Republic of Bashkortostan. *Rastitel'nye resursy = Plant resources*, 2016, vol. 52, no. 2, pp. 225–239 (in Russian).
14. Il'ina V. N., Saxonov S. V., Rodionova G. N. *Hedysarum grandiflorum* Pall. *Red Book The Red Book of the Samara Region. Vol. 1. Rare species of plants, lichens and fungi*. Tolyatti, 2007, p. 128 (in Russian).
15. Trutnev Yu. P. (ed.). *The Red Book of the Russian Federation (plants and fungi)*. Moscow, Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2008. 855 p. (in Russian).
16. Nazirov A. A. (ed.). *The Red Book of the Republic of Tatarstan (animals, plants, mushrooms)*. Kazan, Ideal-Press Publ., 2016. 760 p. (in Russian).
17. On Amendments to the Decree of the Government of the Orenburg Region of January 26, 2012 No. 67-p: Decree of the Government of the Orenburg Region, April 16, 2014, No. 229-p. *CODEX. Electronic Fund of legal and regulatory technical documentation*. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/460292488> (accessed 05.27.2019) (in Russian).
18. Shlyakhtin G. V. (ed.). *Red Book of the Saratov Region. Mushrooms Lichens. Plants. Animals*. Saratov: Publisher Chamber of Commerce of the Saratov region, 2006. 526 p. (in Russian).
19. Artem'eva E. A., Maslennikov A. V., Korepov M. V. (ed.). *Red Book of the Ulyanovsk Region*. Moscow, Buki Vedi Publ., 2015. 550 p. (in Russian).
20. Plaksina T. I., Il'ina N. S., Il'ina V. N. *Astragalus macropus* Bunge. *Red Book The Red Book of the Samara Region. Vol. 1. Rare species of plants, lichens and fungi*. Tolyatti, 2007, p. 121 (in Russian).
21. Uranov A. A. Age spectrum of phytocenopopulations as a function of time and energy wave processes. *Biologicheskije nauki = Biological sciences*, 1975, no. 2, pp. 7–34 (in Russian).

22. Zhukova L. A. *Population life of meadow plants*. Yoshkar-Ola, Moscow, Publishing House State Committee of the Russian Federation for Higher Education, 1995. 224 p. (in Russian).
23. Zhivotovskii L. A. Ontogenetic states, effective density and classification of plant populations. *Ekologiya = Ecology*, 2001, no. 1, pp. 3–7 (in Russian).
24. Shennikov A. P. *Introduction to geobotany*. Leningrad, Publishing House of Leningrad University, 1964. 447 p. (in Russian).
25. Il'ina V. N. *Ecological and biological features and the structure of cenopopulations of rare species of the genus Hedysarum L. in the conditions of the Middle Volga basin*. Abstract. of Ph. D. diss. Tolyatti, 2006. 19 p. (in Russian).
26. Il'ina V. N. Ontogenesis of *Hedysarum grandiflorum* Pall. *Ontogenetic atlas of plants. Vol. 5*. Yoshkar-Ola, 2007, pp. 126–132 (in Russian).
27. Il'ina V. N. On the bioecological features of *Hedysarum grandiflorum* Pall. (Fabaceae) in the Samara Region. *Samarskii nauchnyi vestnik = Samara journal of science*, 2013, no. 4, pp. 78–80 (in Russian).
28. Il'ina V. N. The structure and status of populations of Middle Volga species of the genus *Hedysarum* L. (Fabaceae). *Samarskii nauchnyi vestnik = Samara journal of science*, 2014, no. 2, pp. 37–40 (in Russian).
29. 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, p. 199–205 (in Russian).
30. Grime J. P. *Plant strategies and vegetation processes*. Chichester, Wiley and Sons, 1979. 222 p.

Информация об авторе

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

Information about the author

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

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 582.477.6:635.92:581.41

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-311-318>

Поступила в редакцию 05.12.2018

Received 05.12.2018

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

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕКОРАТИВНЫХ ФОРМ
МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ГОРИЗОНТАЛЬНОГО (*JUNIPERUS HORIZONTALIS* MOENCH.)
В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ**

Аннотация. Основными морфологическими признаками, позволяющими идентифицировать большинство декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.), являются окраска хвои и габитус растений. При идентификации сходных по этим признакам декоративных форм следует учитывать тип хвои, положение веточек первого порядка и плотность их размещения на скелетных ветвях, длину веточек предпоследнего и последнего порядков, окраску растущих и одревесневших побегов, аромат хвои при растирании.

Ключевые слова: *Juniperus horizontalis*, декоративные формы, культивары, морфология, габитус, ветвление, тип хвои, окраска хвои

Для цитирования: Торчик, В. И. Морфологические особенности декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.) в условиях Беларуси / В. И. Торчик, А. Ф. Келько, Г. А. Холопук // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 311–318. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-311-318>

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

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

**MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CREEPING JUNIPER CULTIVARS
(*JUNIPERUS HORIZONTALIS* MOENCH.) WHEN INTRODUCED IN BELARUS**

Abstract. The main morphological features that make it possible to identify the majority of the creeping juniper ornamental forms (*Juniperus horizontalis* Moench.), are the needle color and the habit of the plants. When identifying cultivars similar in these features, one should take into account the type of needles, the position of the first-order branchlets and the density of their placement on branches, the length of the penultimate and last order branchlets, the color of growing and lignified sprays, the aroma of needles during trituration.

Keywords: *Juniperus horizontalis*, ornamental forms, cultivars, morphology, habit, branching, needle type, needle color

For citation: Torchyk U. I., Kelko H. F., Kholopuk G. A. Morphological characteristics of creeping juniper cultivars (*Juniperus horizontalis* Moench.) when introduced in Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 311–318 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-311-318>

Введение. В условиях урбанизированной среды отмечается ухудшение развития корневых систем декоративных растений, что обусловлено уменьшением плодородного слоя почвы и наличием в его составе различного рода механических включений. В связи с этим перспективными для озеленения городов являются не требовательные к плодородию почвы растения с компактной надземной частью и неглубоко проникающей корневой системой, к числу которых относятся декоративные формы можжевельника горизонтального. Современный рынок декоративных растений насыщен разнообразными декоративными формами вида, которые различаются по габитусу, характеру ветвления, скорости роста, окраске хвои и другим признакам, что дает возможность их использования в различных по назначению композиционных решениях при озеленении склонов, мемориальных объектов, в каменистых садах, садах на крышах, при контейнерном озеленении и др. [1].

Введение в культуру новых декоративных форм требует детальной оценки перспективности их использования путем выявления индивидуальных особенностей роста и развития и разработки

на этой основе оптимальных технологий выращивания в местных условиях, что позволит избежать негативных последствий при создании объектов зеленого строительства. Заключительным этапом этих исследований является внесение устойчивых растений в Государственный реестр сортов, допущенных к производству, реализации и использованию на территории Беларуси. Кроме того, они позволяют дать морфологическую характеристику растений в новых природно-климатических условиях, которая будет служить для специалистов зеленого строительства методическим руководством при идентификации декоративных форм.

К настоящему времени в Государственный реестр сортов (2018) внесено 10 декоративных форм можжевельников, в том числе по заявке Ducik International (Сербия) – 4 формы в 2007 г., по заявке Центрального ботанического сада (ЦБС) НАН Беларуси – 6 форм в 2011 г. Среди них 2 декоративные формы можжевельника горизонтального [2].

Цель настоящей работы – изучение морфологических особенностей декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.) и определение наиболее характерных признаков для их идентификации.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись растения 15 декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.) из коллекции ЦБС НАН Беларуси (табл. 1) [3], представленных 10–30-летними кустарниками высотой 5–45 см и шириной 0,7–4,4 м.

Т а б л и ц а 1. Исследованные декоративные формы можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Table 1. Researched Creeping juniper cultivars (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Декоративная форма	Возраст растений, лет	Высота растений, см	Ширина растений, см
'Agnieszka'	20	40–45	180–220
'Blue Chip'	20	33–35	350–400
'Blue Forest'	10	27–30	80–90
'Emerald Spreader'	10	10–15	200–250
'Golden Carpet'	10	7–10	180–220
'Grey Pearl'	20	25–30	120–150
'Hughes'	20	25–30	350–400
'Limeglow'	10	15–20	70–80
'Monber' ('Icee Blue')	10	5–7	190–210
'Plumosa'	20	35–40	220–250
'Prince of Wales'	10	10–15	160–180
'Repens'	20	30–35	420–440
'Wiltonii'	30	5–7	190–210
'Winter Blue'	10	10–15	150–170
'Yukon Belle'	10	10–15	150–200

Оценку морфологических признаков растений (габитус, особенности ветвления, тип и окраска хвои и др.) проводили по «Методике проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Можжевельник (*Juniperus* L.)» (BY TG/103/3/1).

Результаты и их обсуждение. Морфологическая характеристика декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.) приведена в табл. 2. Растения имеют стелющийся, плоско-стелющийся или плоско-горизонтальный габитус. По скорости роста их можно разделить на медленно растущие формы, годичный прирост которых не превышает 10 см ('Blue Forest', 'Grey Pearl', 'Limeglow'), формы со средней скоростью роста в пределах 10–20 см ('Agnieszka', 'Blue Chip', 'Monber', 'Plumosa', 'Prince of Wales', 'Wiltonii', 'Winter Blue'), быстрорастущие с приростом побегов 20–25 см ('Emerald Spreader', 'Golden Carpet', 'Hughes', 'Yukon Belle') и очень быстрорастущие с годичным приростом побегов более 25 см ('Repens').

Большинство декоративных форм можжевельника горизонтального представляют собой женские клоны, формирующие шишкоягоды, покрытые сизым налетом. Некоторые из них образуют их в больших количествах ('Golden Carpet', 'Wiltonii'). На 'Limeglow', 'Plumosa', 'Prince of

Wales', 'Winter Blue' и 'Yukon Belle' с первой декады июля начинают формироваться микростробилы, которые к концу лета приобретают светло-коричневую окраску, достигая длины 3–4 мм. На 'Blue Forest' и 'Grey Pearl' генеративных органов не обнаружено.

Декоративные формы различаются также ароматом хвои. Например, при растирании сильный смолистый аромат имеет хвоя 'Agnieszka', 'Golden Carpet', 'Plumosa', 'Prince of Wales' и 'Repens', аромат средней силы характерен для 'Blue Chip', 'Emerald Spreader', 'Grey Pearl', и 'Wiltonii', слабый – для 'Blue Forest', 'Hughes', 'Limeglow' и 'Winter Blue'. У 'Monber' и 'Yukon Belle' аромат отсутствует.

Т а б л и ц а 2. Морфологическая характеристика декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Table 2. Morphological characteristics of Creeping juniper cultivars (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Декоративная форма	Габитус	Годичный прирост, см	Жесткость ветвей	Аромат хвои	Генеративные органы
'Agnieszka'	Плоско-горизонтальный	15–20	Средней жесткости	Сильный	Шишкочагоды
'Blue Chip'	Стелющийся	15–19	Мягкие	Средний	Шишкочагоды
'Blue Forest'	Стелющийся	8–11	Мягкие	Слабый	Отсутствуют
'Emerald Spreader'	Стелющийся	18–25	Средней жесткости	Средний	Шишкочагоды
'Golden Carpet'	Плоско-стелющийся	20–26	Средней жесткости	Сильный	Шишкочагоды
'Grey Pearl'	Стелющийся	6–8	Средней жесткости	Средний	Отсутствуют
'Hughes'	Стелющийся	21–23	Мягкие	Слабый	Шишкочагоды
'Limeglow'	Плоско-горизонтальный	8–10	Мягкие	Слабый	Микростробилы
'Monber'	Плоско-стелющийся	15–18	Средней жесткости	Отсутствует	Шишкочагоды
'Plumosa'	Плоско-горизонтальный	17–20	Мягкие	Сильный	Микростробилы
'Prince of Wales'	Стелющийся	13–15	Мягкие	Сильный	Микростробилы
'Repens'	Стелющийся	23–30	Мягкие	Сильный	Шишкочагоды
'Wiltonii'	Плоско-стелющийся	13–18	Жесткие	Средний	Шишкочагоды
'Winter Blue'	Плоско-горизонтальный	10–13	Средней жесткости	Слабый	Микростробилы
'Yukon Belle'	Стелющийся	20–27	Жесткие	Отсутствует	Микростробилы

Скелетные ветви у всех форм растут в горизонтальном направлении, при этом веточки первого порядка у большинства из них полупрямостоячие, за исключением 'Blue Forest' и 'Grey Pearl', у которых они прямостоячие (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Особенности ветвления декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Table 3. Branching particularities of Creeping juniper cultivars (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Декоративная форма	Число веточек первого порядка на каждые 20 см длины скелетной ветви, шт.	Положение веточек первого порядка	Длина веточек, мм		Основная окраска верхней стороны веточек первого порядка весной	
			предпоследнего порядка	последнего порядка	молодого побега	однолетнего побега
'Agnieszka'	15–17	Полупрямостоячие	22–28	6–12	Светло-зеленая	Бронзово-зеленая
'Blue Chip'	18–21	Полупрямостоячие	11–15	2–3	Сине-зеленая	Бронзово-зеленая
'Blue Forest'	42–43	Прямостоячие	16–22	3–8	Светло-синяя	Бронзово-зеленая

Декоративная форма	Число веточек первого порядка на каждые 20 см длины скелетной ветви, шт.	Положение веточек первого порядка	Длина веточек, мм		Основная окраска верхней стороны веточек первого порядка весной	
			предпоследнего порядка	последнего порядка	молодого побега	однолетнего побега
‘Emerald Spreader’	17–20	Полупрямостоячие	12–17	3–5	Бронзово-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Golden Carpet’	15–18	Полупрямостоячие	21–32	9–13	Желто-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Grey Pearl’	40–41	Прямостоячие	32–36	7–13	Серо-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Hughes’	14–17	Полупрямостоячие	20–30	7–13	Бронзово-зеленая	Бронзовая
‘Limeglow’	26–27	Полупрямостоячие	24–30	4–10	Светло-желтая	Желтая
‘Monber’	20–22	Полупрямостоячие	12–16	3–5	Бронзово-зеленая	Бронзовая
‘Plumosa’	14–17	Полупрямостоячие	18–26	5–10	Бронзово-зеленая	Бронзовая
‘Prince of Wales’	18–19	Полупрямостоячие	16–20	4–6	Бронзово-зеленая	Бронзовая
‘Repens’	13–15	Полупрямостоячие	37–46	7–12	Серо-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Wiltonii’	14–17	Полупрямостоячие	14–19	3–5	Сине-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Winter Blue’	14–15	Полупрямостоячие	14–17	6–7	Бронзово-зеленая	Бронзовая
‘Yukon Belle’	15–16	Полупрямостоячие	9–14	1,5–2	Сине-зеленая	Серо-зеленая

Культивары можжевельника горизонтального различаются плотностью ветвления, о чем свидетельствует разное количество веточек первого порядка на каждые 20 см длины скелетной ветви. Так, у ‘Winter Blue’ и ‘Repens’ их очень мало (менее 15 шт.), у ‘Agnieszka’, ‘Blue Chip’, ‘Emerald Spreader’, ‘Golden Carpet’, ‘Hughes’, ‘Plumosa’, ‘Prince of Wales’, ‘Wiltonii’ и ‘Yukon Belle’ их мало – в пределах 16–20 шт., среднее количество (21–30 шт.) – у ‘Limeglow’ и ‘Monber’, очень много (более 40 шт.) – у ‘Blue Forest’ и ‘Grey Pearl’.

Для исследованных культиваров можжевельника горизонтального характерны короткие веточки предпоследнего и последнего порядков длиной менее 20 и 6 мм соответственно и средней длины – в пределах 20–50 и 6–15 мм, что может служить одним из отличительных признаков для некоторых визуально сходных форм. Например, у ‘Blue Chip’ веточки предпоследнего и последнего порядков короткие (11–15 и 2–3 мм соответственно), у сходной формы ‘Repens’ – средней длины (37–46 и 7–12 мм соответственно). Среди исследованных культиваров можжевельника горизонтального форм с длинными веточками предпоследнего и последнего порядков (длиной более 50 и 15 мм соответственно) не отмечено.

Установлены различия в окраске побегов различного возраста. Так, молодые побеги ‘Hughes’, ‘Monber’, ‘Plumosa’, ‘Prince of Wales’ и ‘Winter Blue’, для которых характерна бронзово-зеленая окраска, уже к следующей весне полностью одревесневают и становятся бронзовыми. У остальных культиваров одревеснение неполное. Например, бронзово-зеленые растущие побеги ‘Emerald Spreader’ через год становятся более жесткими, но все еще сохраняют первоначальную окраску. Молодые побеги ‘Grey Pearl’ и ‘Repens’ имеют серо-зеленую окраску, на следующий год – бронзово-зеленую. У ‘Blue Chip’, ‘Wiltonii’ и ‘Yukon Belle’ растущие побеги имеют сине-зеленую окраску, которая у первых двух культиваров на следующий год становится бронзово-зеленой, а у последнего – серо-зеленой. Молодые побеги ‘Blue Forest’ окрашены в светло-синий цвет, у ‘Agnieszka’ – в светло-зеленый, у обеих форм к следующей весне окраска побегов сменяется на бронзово-зеленую. Среди остальных культиваров выделяются ‘Golden Carpet’ с желто-зеленым молодым приростом, который через год приобретает бронзово-зеленую окраску, и ‘Limeglow’ со светло-желтыми растущими побегами, темнеющими к следующему году до желтой окраски.

Для исследованных культиваров можжевельника горизонтального характерно наличие либо только игольчатой хвои длиной 3–6 мм с узко-заостренной или острой формой кончика, либо двух типов хвои – игольчатой и чешуевидной. Последняя, как правило, имеет длину от 1 до 2,5 мм и острую или тупую форму кончика (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Морфологические особенности хвои декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.)Table 4. Morphological particularities of needle of Creeping juniper cultivars (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Декоративная форма	Тип хвои	Игольчатая хвоя		Чешуевидная хвоя		Положение игольчатой хвои	
		Длина, мм	Форма кончика	Длина, мм	Форма кончика	Веточки первого порядка	Веточки последнего порядка
‘Agnieszka’	Игольчатый	2–4	Острая	–	–	Полуприжатое	Полуприжатое и прижатое
‘Blue Chip’	Игольчатый	3–4	Узко-заостренная	–	–	Полуприжатое	Полуприжатое
‘Blue Forest’	Игольчатый	4–6	Узко-заостренная	–	–	Полуприжатое	Полуприжатое
‘Emerald Spreader’	Чешуевидный и игольчатый	2,5–4	Узко-заостренная	1,5–2,5	Острая	Полуприжатое	Полуприжатое и прижатое
‘Golden Carpet’	Игольчатый и чешуевидный	2,5–4	Узко-заостренная	1,5–2	Острая	Прижатое	Полуприжатое и прижатое
‘Grey Pearl’	Игольчатый	4–6	Узко-заостренная	–	–	Полуприжатое	Полуприжатое
‘Hughes’	Игольчатый и чешуевидный	3–4	Острая и узко-заостренная	1–2	Острая	Прижатое	Полуприжатое
‘Limeglow’	Игольчатый и чешуевидный	3–5	Острая	1,5–2,5	Острая	Полуприжатое	Полуприжатое
‘Monber’	Чешуевидный и игольчатый	2,5–4	Острая	1–2	Тупая	Прижатое	Прижатое
‘Plumosa’	Игольчатый и чешуевидный	3–4	Узко-заостренная	1–2	Острая	Полуприжатое	Полуприжатое
‘Prince of Wales’	Игольчатый	3–4	Узко-заостренная	–	–	Полуприжатое	Прижатое
‘Repens’	Игольчатый	3–5	Узко-заостренная	–	–	Полуприжатое	Полуприжатое
‘Wiltonii’	Чешуевидный и игольчатый	2–3	Узко-заостренная	1–2	Острая и тупая	Прижатое	Прижатое
‘Winter Blue’	Чешуевидный и игольчатый	3–4	Узко-заостренная	1,5–2	Острая	Прижатое	Полуприжатое и прижатое
‘Yukon Belle’	Чешуевидный и игольчатый	3–5	Узко-заостренная	1–2	Острая	Полуприжатое	Полуприжатое и прижатое

Для большинства культиваров с двумя типами хвои свойственно преобладание одного из них (в табл. 4 преобладающий тип хвои указан первым). Так, например, у ‘Golden Carpet’, ‘Hughes’, ‘Limeglow’ и ‘Plumosa’ основная часть хвои игольчатая, чешуевидная отмечена лишь на некоторых побегах. У остальных культиваров с двумя типами хвои преобладает чешуевидная, а игольчатая присутствует в небольшом количестве внутри кроны растения либо на более старых или молодых побегах. Игольчатая хвоя на побегах последнего порядка у разных форм может быть прижатой к побегу или немного отстоящей (полуприжатой), что является одним из отличительных признаков некоторых форм.

Окраска хвои у отдельных культиваров может изменяться с возрастом и зависеть от поры года. Верхняя сторона хвои, как правило, имеет серо-зеленую окраску, что обусловлено наличием устьичных полос. Исключением является форма ‘Blue Chip’, верхняя сторона молодой хвои которой имеет летом светло-зеленую окраску, а зимой приобретает серо-зеленый оттенок. У ‘Blue Forest’ и ‘Wiltonii’ молодая хвоя сверху сине-зеленая, с возрастом – серо-зеленая. Верхняя сторона хвои любого возраста у ‘Monber’ и ‘Yukon Belle’ окрашена в сине-зеленый цвет и сохраняет окраску в зимний период. У ‘Limeglow’ молодая хвоя сверху желтая, однолетняя приобретает серо-зеленую окраску, а зимой становится бронзово-зеленой (табл. 5).

Окраска нижней стороны хвои определяет основную окраску растения в целом и является одним из основных отличительных признаков отдельных культиваров. Так, формы ‘Blue Chip’, ‘Blue Forest’ и ‘Repens’ в летний период имеют синюю окраску, зимой становятся бронзово-зелеными. Нижняя сторона хвои ‘Monber’ и ‘Yukon Belle’ на молодом приросте также окрашена в синий цвет, однолетняя хвоя – в сине-зеленый, причем зимой окраска сохраняется, лишь на концах побегов хвоя приобретает бронзово-зеленый оттенок. У формы ‘Grey Pearl’ молодая хвоя снизу окрашена в сине-зеленый цвет, однолетняя – в серо-зеленый, в зимний период растение приоб-

ретаает бронзово-зеленый оттенок. Сине-зеленую окраску имеет также молодая хвоя ‘Wiltonii’, через год она становится светло-зеленой, при этом зимой окраска сохраняется. Серо-зеленый цвет хвои имеют формы ‘Emerald Spreader’ и ‘Hughes’, причем у последнего культивара зимой хвоя становится бронзово-зеленой. Бронзовую окраску зимой имеют культивары ‘Limeglow’, ‘Plumosa’ и ‘Winter Blue’. При этом в летний период у ‘Limeglow’ молодая хвоя окрашена снизу в светло-желтый цвет, однолетняя – в желтый, у форм ‘Plumosa’ и ‘Winter Blue’ хвоя серо-зеленая. Светло-зеленая окраска нижней стороны хвои у формы ‘Agnieszka’ сохраняется в течение всего года, однако хвоя, отстоящая от побегов, при общем восприятии растения придает ему серо-зеленый оттенок за счет ярких устьичных полос. Не изменяется в холодный период окраска хвои также у ‘Golden Carpet’. Зеленая в летний период хвоя ‘Prince of Wales’ зимой становится бронзово-зеленой.

Т а б л и ц а 5. Окраска хвои декоративных форм можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Table 5. Needle color of Creeping juniper cultivars (*Juniperus horizontalis* Moench.)

Декоративная форма	Основная окраска на веточках первого порядка					
	Молодая хвоя летом		Однолетняя хвоя			
	Верхняя сторона	Нижняя сторона	Верхняя сторона		Нижняя сторона	
			Лето	Зима	Лето	Зима
‘Agnieszka’	Серо-зеленая	Светло-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Светло-зеленая	Светло-зеленая
‘Blue Chip’	Светло-зеленая	Синяя	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Синяя	Бронзово-зеленая
‘Blue Forest’	Сине-зеленая	Синяя	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Бронзово-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Emerald Spreader’	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая
‘Golden Carpet’	Серо-зеленая	Желтая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Светло-зеленая	Светло-зеленая
‘Grey Pearl’	Серо-зеленая	Сине-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Hughes’	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Бронзово-зеленая
‘Limeglow’	Желтая	Светло-желтая	Серо-зеленая	Бронзово-зеленая	Желтая	Бронзовая
‘Monber’	Сине-зеленая	Синяя	Сине-зеленая	Сине-зеленая	Сине-зеленая	Сине-зеленая
‘Plumosa’	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Бронзовая
‘Prince of Wales’	Серо-зеленая	Зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Зеленая	Бронзово-зеленая
‘Repens’	Серо-зеленая	Синяя	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Синяя	Бронзово-зеленая
‘Wiltonii’	Сине-зеленая	Сине-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Светло-зеленая	Светло-зеленая
‘Winter Blue’	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Светло-зеленая	Серо-зеленая	Серо-зеленая	Бронзовая
‘Yukon Belle’	Сине-зеленая	Синяя	Сине-зеленая	Сине-зеленая	Сине-зеленая	Сине-зеленая

Заключение. В результате изучения морфологических особенностей 15 культиваров можжевельника горизонтального (*Juniperus horizontalis* Moench.) из коллекции декоративных садовых форм древесных растений ЦБС НАН Беларуси выявлены их отличительные признаки, которые могут быть использованы при их идентификации. По этим признакам декоративные формы можно разделить на несколько групп:

Растения с желтой окраской хвои:

1) габитус плоско-горизонтальный, в зимний период окраска хвои изменяется на бронзовую, мужской клон – ‘Limeglow’;

2) габитус плоско-стелющийся, в зимний период желтая окраска сохраняется, женский клон – ‘Golden Carpet’.

Растения с зеленой окраской хвои:

1) габитус плоско-горизонтальный, хвоя светло-зеленая, колючая, отстоящая, с яркими серо-зелеными устьичными полосами с верхней стороны, за счет чего растения при общем восприятии имеют серо-зеленую окраску, женский клон – ‘Agnieszka’;

2) габитус стелющийся, хвоя темно-зеленая, прижатая на побегах последнего порядка, не колючая, мужской клон – ‘Prince of Wales’.

Растения с серо-зеленой, синей и сине-зеленой окраской хвои, имеющие два типа хвои – игольчатую и чешуевидную:

1) с плоско-стелющимся габитусом:

ветвление плотное (количество веточек первого порядка на каждые 20 см длины ветви 20–22 шт.), скелетные ветви не просматриваются, хвоя с возрастом сохраняет яркую сине-зеленую окраску, за счет чего растение выглядит плотным и равномерно окрашенным – ‘Monber’;

ветвление менее плотное (количество веточек первого порядка на каждые 20 см длины ветви 14–17 шт.), скелетные ветви просматриваются, хвоя с возрастом изменяет цвет с сине-зеленого на светло-зеленый, за счет чего растение имеет неравномерную окраску – ‘Wiltonii’;

2) со стелющимся габитусом:

молодой прирост яркого синего цвета, мужской клон – ‘Yukon Belle’;

молодой прирост серо-зеленого, изумрудно-зеленого цвета, женский клон – ‘Emerald Spreader’;

3) с плоско-горизонтальным габитусом:

на приростах текущего года трофических побегов хвоя как чешуевидная, так и игольчатая, ветви равномерно расходятся от центра радиально, приросты текущего года ростовых побегов длинные (17–20 см), равномерно черепитчато настилаются друг на друга, их концы слегка приподнимаются вверх, вследствие чего растение приобретает подушковидную форму, при общем восприятии серо-зеленого цвета летом, зимой – лилового (‘Plumosa’);

на приростах текущего года трофических побегов хвоя только чешуевидная, ветви равномерно расходятся от центра радиально, приросты текущего года ростовых побегов короткие (10–13 см), прямые, настилаются друг на друга, растение имеет более плоский габитус, при общем восприятии серо-зеленого цвета с легким бронзовым оттенком летом и бронзовой окраской зимой – ‘Winter Blue’.

Растения с серо-зеленой, синей и сине-зеленой окраской хвои с игольчатой хвоей:

1) веточки первого порядка прямостоячие:

растение мягкое на ощупь, веточки предпоследнего и последнего порядков короткие (16–22 и 3–8 мм соответственно), хвоя при растирании имеет слабый запах – ‘Blue Forest’;

растение более жесткое на ощупь, веточки предпоследнего и последнего порядков более длинные (32–36 и 7–13 мм соответственно), хвоя при растирании имеет сильный аромат – ‘Grey Pearl’;

2) веточки первого порядка полупрямостоячие:

хвоя колючая, серо-зеленая, плоский стелющийся габитус – ‘Hughes’;

хвоя мягкая, синяя, габитус приподнятый, подушковидный:

ветвление плотное, веточки предпоследнего и последнего порядков короткие (11–15 и 2,5–3 мм соответственно), количество веточек первого порядка на каждые 20 см длины скелетной ветви – 18–21 шт. (‘Blue Chip’);

ветвление рыхлое, веточки предпоследнего и последнего порядков длинные (37–46 и 7–12 мм соответственно), количество веточек первого порядка на каждые 20 см длины скелетной ветви – 13–15 шт. (‘Repens’).

Список использованных источников

1. Торчик, В. И. Декоративные садовые формы хвойных растений / В. И. Торчик, Е. Д. Антонюк. – Минск : Эдит ВВ, 2007. – 152 с.

2. Государственный реестр сортов / М-во сельского хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, Гос. инспекция по испытанию и охране сортов растений ; ред. В. А. Бейня. – Минск : б. и., 2018. – 240 с.

3. Холопук, Г. А. Декоративные формы можжевельника и перспективы их интродукции в Беларуси / Г. А. Холопук, В. И. Торчик // Промышленная ботаника: состояние и перспективы развития : материалы VII Междунар. науч. конф., Донецк, 17–19 мая 2017 г. / М-во образования и науки Донец. Народ. Респ., Донец. бот. сад ; отв. ред. С. А. Приходько. – Ростов н/Д, 2017. – С. 456–459.

References

1. Torchik V. I., Antonyuk E. D. *Ornamental forms of conifers*. Minsk, Edit VV Publ., 2007. 152 p. (in Russian).
2. Beinya V. A. (ed.). *State register of varieties*. Minsk, s. n., 2018. 240 p. (in Russian).
3. Kholopuk G. A., Torchik V. I. Ornamental forms of juniper and perspectives of their introduction in Belarus. *Промышленная ботаника: состояние и перспективы развития: материалы VII Международной научной конференции (Донецк, 17–19 мая 2017 года)* [Industrial botany: state and development prospects: proceedings of the VII International scientific conference (Donetsk, May 17–19, 2017)]. Rostov na Donu, 2017, pp. 456–459 (in Russian).

Информация об авторах

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

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

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

Information about the authors

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

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

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

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 634.737:581.522.4:631.5

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-319-325>

Поступила в редакцию 19.03.2019

Received 19.03.2019

Н. Б. Павловский

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ РАЗНЫХ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ ЗЕЛЕНЫМИ ЧЕРЕНКАМИ

Аннотация. На основании результатов 9-летних исследований дана оценка регенерационной способности 20 сортов голубики высокорослой и 3 сортов голубики полувысокорослой, интродуцированных в Беларуси. Установлено, что регенерационная способность зеленых черенков голубики генетически детерминирована с разной степенью выраженности у того или иного сорта. Полученные результаты позволили классифицировать сорта голубики по корнеобразующей способности на три группы: легкоукореняемые ('Elizabeth', 'Hardyblue', 'Northland'), среднеукореняемые ('Blueray', 'Coville', 'Croatan', 'Darrow', 'Denise Blue', 'Herbert', 'Jersey', 'Northcountry', 'Reka', 'Rubel') и трудноукореняемые ('Bluecrop', 'Bluetta', 'Bluerose', 'Carolinablue', 'Duke', 'Earliblue', 'Nelson', 'Northblue', 'Patriot', 'Weymouth'). Достоверно показано, что сорта данной культуры, обладающие более высокой корнеобразующей способностью, продуцируют растения с большими биометрическими параметрами надземной сферы. Зеленые черенки голубики высокорослой и полувысокорослой обладают удовлетворительной регенерационной способностью, что позволяет использовать данный метод вегетативного размножения для получения посадочного материала этой культуры в Беларуси.

Ключевые слова: голубика высокорослая, *Vaccinium corymbosum*, интродукция, вегетативное размножение, зеленый черенок, укореняемость, Беларусь

Для цитирования: Павловский, Н. Б. Регенерационная способность разных сортов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) при размножении зелеными черенками / Н. Б. Павловский // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 319–325. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-319-325>

N. B. Pavlovskiy

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

REGENERATION ABILITY OF DIFFERENT CULTIVARS OF THE Highbush BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) PROPAGATED BY GREEN STEM CUTTINGS

Abstract. An assessment of the regenerative capacity was made for 20 highbush blueberry cultivars and 3 half-highbush blueberry cultivars introduced in Belarus, based on 9-year research results. Has been established that the regeneration ability of the green cuttings of blueberry is genetically determined with varying degrees of severity in one or another cultivar. The results obtained allowed to classify blueberry cultivars according to their root-forming ability into three groups: easily rooted (('Elizabeth', 'Hardyblue', 'Northland'), medium rooted (('Blueray', 'Coville', 'Croatan', 'Darrow', 'Denise Blue', 'Herbert', 'Jersey', 'Northcountry', 'Reka', 'Rubel') and difficult to resist ('Bluecrop', 'Bluetta', 'Bluerose', 'Carolinablue', 'Duke', 'Earliblue', 'Nelson', 'Northblue', 'Patriot', 'Weymouth'). It is reliably shown that one hundred varieties of this crop, possessing a higher root-forming ability, produce plants with large biometric parameters of the above-ground sphere. The blue cuttings of highbush and half-highbush blueberries have a satisfactory regenerative capacity, which makes it possible to use this method of vegetative propagation for replication and to obtain planting material of this culture in Belarus.

Keywords: highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*, introduction, vegetative propagation, green cutting, rooting, Belarus

For citation: Pavlovskiy N. B. Regeneration ability of different cultivars of the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) propagated by green stem cuttings. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 319–325 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-319-325>

Введение. В настоящее время во многих странах мира, в том числе и в Беларуси, большой популярностью пользуется новая ягодная культура – голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.). Для успешного применения данной культуры в промышленном и приусадебном садоводстве необходимо обеспечить удовлетворение спроса на посадочный материал. В этой связи особую актуальность приобретает оценка регенерационной способности голубики при вегетативном размножении.

Анализ литературных источников показал, что вопрос о регенерационных способностях голубики высокорослой при размножении стеблевыми черенками рассмотрен в работах А. А. Пыжьяновой, А. Ф. Балабак [1, 2], А. А. Пыжьяновой [3, 4], посвященных совершенствованию технологии размножения голубики высокорослой стеблевыми черенками в условиях правобережной лесостепи Украины. Исследования по оценке регенерационной способности разных сортов голубики высокорослой выполнялись в Латвии [5] и Центрально-Черноземной зоне России [6, 7].

Ранее нами было показано влияние сроков черенкования [8], типа субстрата для укоренения и его температурного режима [9] на укореняемость зеленых черенков голубики высокорослой на примере трех сортов. Отмечено влияние типа побега, используемого для заготовки черенков, числа листьев, оставляемых на них [10], а также проведена предварительная оценка регенерационной способности стеблевых черенков 27 сортов голубики [11].

Цель настоящего исследования – оценка регенерационной способности разных сортов голубики при размножении зелеными черенками на основании многолетних наблюдений.

Объекты и методы исследований. Исследования выполнены в течение 2007, 2008, 2011–2017 гг. в отраслевой лаборатории интродукции и технологии нетрадиционных ягодных растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси, расположенной в Ганцевичском районе Брестской области (N 52°44', E 26°22'). Объектом исследований являлись растения 20 сортов голубики высокорослой ('Bluecrop', 'Blueray', 'Bluerose', 'Bluetta', 'Carolinablue', 'Coville', 'Croatan', 'Darrow', 'Denise Blue', 'Duke', 'Earliblue', 'Elizabeth', 'Hardyblue', 'Herbert', 'Jersey', 'Nelson', 'Patriot', 'Reka', 'Rubel', 'Weymouth') и 3 сорта голубики полувисокорослой ('Northblue', 'Northcountry' и 'Northland'). В качестве стандарта принят районированный в Беларуси и широко распространенный в мире среднеспелый сорт 'Bluecrop'.

Регенерационную способность зеленых черенков голубики исследовали в условиях пленочной теплицы. Черенки заготавливали в середине июня с побегов ветвления прироста текущего года, после окончания весеннего роста. Черенки нарезали длиной 5–8 см, в верхней части оставляли 3 листа, а нижние удаляли. При посадке черенки заглубляли до оставленных листьев. Заготовленные черенки высаживали по схеме 5×5 см в укоренительные гряды, заполненные смесью торфа с песком (2:1), слоем 15 см и закрытые светопрозрачной пленкой и спандбондом, натянутыми на каркас. Высаживали по 200–400 черенков каждого сорта.

В течение всего периода укоренения черенков в укоренительных тоннелях поддерживали относительную влажность воздуха в пределах 95–100 %. Для этого использовали мелкокапельное дождевание. Частота полива определялась температурой воздуха, которая в теплице в период укоренения черенков колебалась в пределах 20–35 °С. Для снижения температуры воздуха в солнечную погоду теплицу укрывали затеняющей сеткой (уровень затенения 80 %), а также проводили проветривание. Для адаптации сформировавшихся растений в сентябре с укоренительных гряд снимали спандбонд и пленку, а в середине октября раскрывали теплицу. После завершения листопада и снижения среднесуточной температуры воздуха ниже 0 °С укоренившиеся черенки укрывали еловыми ветками и оставляли зимовать в грядке.

В апреле следующего года теплицу накрывали пленкой. В начале июня, после завершения весенне-летнего роста побегов, проводили учет приживаемости черенков и определяли следующие биометрические показатели: число побегов, длину каждого побега, суммарную длину всех побегов, длину корневого пучка у 20 растений каждого сорта. Полученные растения (укоренившиеся черенки) высаживали в полиэтиленовые пакеты-контейнеры объемом 1,5 л, заполненные верховым торфом (рН_{H₂O} 4,0). Контейнеры помещали в условия открытого грунта на площадку, укрытую полипропиленовой агротканью. В течение вегетации осуществляли агротехнический уход за саженцами. В октябре выполняли измерения биометрических параметров сформировавшихся в контейнерах растений.

Статистическую обработку данных выполняли с применением пакета анализа данных программы Microsoft Excel на 95 %-ном уровне значимости.

Результаты и их обсуждение. Сравнительный анализ данных, представленных в табл. 1, показывает, что средняя укореняемость зеленых черенков голубики высокорослой, в зависимости

от сорта, варьируется от 50,4 до 82,0 %. Наиболее высокой способностью к образованию корней отличается сорт 'Hardyblue' (82,0 %), немного ниже она у сортов 'Elizabeth' (81,7 %) и 'Rubel' (77,6 %). Самая низкая приживаемость черенков отмечена у сорта 'Bluetta' (50,4 %). Слабая корнеобразующая способность характерна также для сорта 'Bluegay' (50,9 %). Наиболее стабильная укореняемость черенков ($V = 11$ %) на протяжении 9 лет исследований отмечена у сорта 'Elizabeth', хорошо регенерирующего адвентивные корни (68–92 %). Небольшой диапазон варьирования приживаемости черенков ($V = 12$ –13 %) характерен для сортов 'Herbert' (50–75 %), 'Bluerose' (44–65 %) и 'Darrow' (45–69 %).

Т а б л и ц а 1. Средняя многолетняя укореняемость зеленых черенков разных сортов голубики высокорослой, %

Table 1. Average long-term rooting of green cuttings of different cultivars of highbush blueberry, %

Сорт	Диапазон укореняемости	Средняя укореняемость	
		$\bar{X} \pm m_x$	V
'Bluecrop' (st)	43–78	59,0 ± 6,9	18
'Bluegay'	34–63	50,9 ± 5,5	16
'Bluerose'	44–65	55,5 ± 4,9	13
'Bluetta'	32–75	50,4 ± 8,6	25
'Carolinablue'	32–66	57,1 ± 7,1	18
'Coville'	40–69	65,0 ± 6,4	15
'Croatan'	38–80	65,4 ± 10,2	23
'Darrow'	45–69	60,5 ± 5,3	13
'Denise Blue'	54–90	74,9 ± 7,9*	16
'Duke'	38–77	55,9 ± 8,8	23
'Earliblue'	36–88	57,5 ± 13,7	36
'Elizabeth'	68–92	81,7 ± 5,9*	11
'Jersey'	53–86	70,9 ± 7,2*	15
'Hardyblue'	53–95	82,0 ± 8,4*	15
'Herbert'	50–75	61,1 ± 5,1	12
'Nelson'	36–70	56,0 ± 8,1	22
'Northland'	70–96	83,1 ± 5,5*	10
'Northblue'	32–73	53,7 ± 10,7	30
'Northcountry'	66–95	79,5 ± 6,1*	12
'Patriot'	42–76	59,8 ± 7,7	19
'Reka'	51–91	68,8 ± 9,1	20
'Rubel'	60–88	77,6 ± 7,1*	14
'Weymouth'	32–84	56,1 ± 10,2	27
НСР		10,46	

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2, 3 * – статистически значимые различия.

У сортов голубики полувысокорослой средняя приживаемость зеленых черенков находится в пределах от 53,7 % у сорта 'Northblue' до 83,1 % у сорта 'Northland'. Для сорта 'Northland' характерна наиболее стабильная укореняемость стеблевых черенков ($V = 10$ %) – 70–96 %.

К концу вегетационного сезона только отдельные прижившиеся черенки дали начало новым побегам. Весной следующего года практически все ювенильные растения сформировали побеги: черенки, имевшие верхушечную почку, как правило, из нее образовали по одному побегу, черенки без апикальной почки дали начало двум, реже одному или трем побегам из верхних латеральных почек.

Анализ биометрических параметров однолетних растений голубики высокорослой, сформировавшихся из черенков к началу второй вегетации (июнь), показал, что наибольший суммарный прирост побегов у сорта 'Denise Blue' (20,6 см) (табл. 2). Немного ниже этот показатель у сортов 'Reka' (17,5 см) и 'Darrow' (17,3 см). Наименьший суммарный прирост побегов у сорта 'Nelson' (11,6 см).

Максимальное число побегов отмечено у сорта ‘Hardyblue’ (2,4 шт.), минимальное – у ‘Bluerose’ (1,5 шт.). Наиболее длинный корневой пучок сформировали растения сортов ‘Duke’ и ‘Weymouth’ (8,3 см), тогда как у голубики сорта ‘Bluerose’ самый короткий пучок корней (6,5 см).

Среди полувысокорослых сортов голубики наибольшим числом побегов (2,8 шт.), их суммарным приростом (24,9 см), а также длиной корневого пучка (8,8 см) обладали растения сорта ‘Northland’. Наименьшие регенерационные показатели из этой группы сортов у культивара ‘Northblue’.

Т а б л и ц а 2. Средние многолетние показатели биометрических параметров растений голубики высокорослой, полученных из стеблевых черенков

T a b l e 2. Average long-term indicators of biometric parameters of highbush blueberry plants, obtained from stem cuttings

Сорт	Биометрические параметры растений				
	Начало вегетации			Конец вегетации	
	Число побегов, шт.	Суммарная длина побегов, см	Длина корневого пучка, см	Число побегов, шт.	Суммарная длина побегов, см
‘Bluecrop’ (st)	1,7 ± 0,1	16,9 ± 4,1	7,5 ± 0,6	4,4 ± 0,8	57,3 ± 11,8
‘Blueray’	1,8 ± 0,2	12,8 ± 2,6	6,8 ± 0,8	3,5 ± 0,2	38,6 ± 6,1
‘Bluerose’	1,5 ± 0,1	11,9 ± 2,0	6,5 ± 0,8	3,5 ± 0,3	35,2 ± 3,7*
‘Bluetta’	1,7 ± 0,3	11,8 ± 0,6	6,9 ± 0,6	4,1 ± 0,1	53,9 ± 6,7
‘Carolinablue’	1,7 ± 0,2	11,7 ± 1,7	8,1 ± 0,7	3,2 ± 0,1*	36,0 ± 3,9*
‘Coville’	1,7 ± 0,2	13,6 ± 2,0	7,3 ± 0,8	3,8 ± 0,3	56,5 ± 5,4
‘Croatan’	2,0 ± 0,3	16,2 ± 2,6	8,1 ± 1,0	4,2 ± 0,6	62,6 ± 9,1
‘Darrow’	1,8 ± 0,4	17,3 ± 4,5	7,6 ± 1,1	3,8 ± 0,3	42,5 ± 4,8
‘Denise Blue’	2,2 ± 0,4	20,6 ± 4,7	7,5 ± 0,8	5,7 ± 1,1*	77,9 ± 14,1*
‘Duke’	1,7 ± 0,3	14,9 ± 2,8	8,3 ± 0,6	4,1 ± 0,5	58,9 ± 9,0
‘Earliblue’	1,6 ± 0,1	14,0 ± 2,9	7,1 ± 0,8	3,1 ± 0,4*	39,1 ± 8,8
‘Elizabeth’	1,9 ± 0,3	14,9 ± 4,3	7,8 ± 0,6	4,4 ± 0,5	63,3 ± 7,8
‘Jersey’	1,6 ± 0,3	15,2 ± 2,7	6,8 ± 0,6	4,1 ± 0,4	65,3 ± 6,9
‘Hardyblue’	2,4 ± 0,6*	16,4 ± 2,9	7,5 ± 0,8	5,6 ± 0,5*	73,8 ± 8,1
‘Herbert’	1,6 ± 0,1	12,7 ± 1,8	7,2 ± 0,5	3,5 ± 0,2	36,6 ± 4,3*
‘Nelson’	1,6 ± 0,3	11,6 ± 2,1	7,5 ± 0,9	3,7 ± 0,5	59,9 ± 17,2
‘Northland’	2,8 ± 0,6*	24,9 ± 9,1*	8,8 ± 1,1	5,7 ± 1,0*	75,7 ± 7,5
‘Northblue’	1,8 ± 0,2	10,5 ± 0,9	6,3 ± 0,5	5,5 ± 0,7*	70,3 ± 10,2
‘Northcountry’	2,0 ± 0,2	11,9 ± 1,1	6,8 ± 0,6	7,3 ± 0,7*	74,9 ± 14,4
‘Patriot’	1,8 ± 0,2	13,3 ± 2,1	7,0 ± 0,6	4,3 ± 0,8	50,2 ± 10,5
‘Reka’	1,8 ± 0,2	17,5 ± 4,5	7,3 ± 0,6	4,3 ± 0,5	65,8 ± 13,2
‘Rubel’	2,0 ± 0,2	16,5 ± 2,8	8,0 ± 0,5	5,2 ± 0,4	67,8 ± 7,6
‘Weymouth’	1,9 ± 0,1	12,6 ± 1,7	8,3 ± 0,7	3,9 ± 0,6	43,3 ± 12,8
НСР	0,67	9,63	1,71	1,12	20,18

К концу второго вегетационного сезона (октябрь) у всех сортов голубики почва в контейнерах была пронизана густой сетью корней. У сформировавшихся к этому времени саженцев длина побегов в среднем составляла от 10,1 (‘Bluerose’) до 16,2 см (‘Nelson’), а суммарная их длина – от 35,2 (‘Bluerose’) до 77,9 см (‘Denise Blue’). При этом число побегов к осени увеличилось от 1,9 раза у сортов ‘Blueray’, ‘Carolinablue’ и ‘Earliblue’ до 3,7 у сорта ‘Northcountry’.

Интенсивная регенерация побегов с суммарным их приростом более 50 см отмечена для группы сортов ‘Denise Blue’, ‘Hardyblue’, ‘Jersey’, ‘Northland’, ‘Northcountry’, ‘Northblue’ и ‘Rubel’. К тому же для этих культиваров характерно и более высокое число побегов. Следует отметить, что в группу с более интенсивным побегообразованием вошли все испытываемые нами сорта полувысокорослой голубики.

Сравнение регенерационного потенциала подземной и надземной сфер голубики указывает на то, что сорта, характеризующиеся более высокой укореняемостью, дали и больший прирост

побегов. Это подтверждают положительные и достоверные коэффициенты корреляции между укореняемостью и морфометрическими показателями надземной части сформировавшихся растений (табл. 3). При этом следует отметить слабую корреляцию между приживаемостью черенков и длиной корней (0,32). По-видимому, это можно объяснить тем, что ювенильные растения сортов, обладающих высокой корнеобразующей способностью, интенсивно формировали адвентивные корни и в то же время увеличивали конкуренцию между формирующимися на соседних черенках корнями, что, в свою очередь, ограничивало рост самих корней.

Т а б л и ц а 3. Коэффициенты корреляции между укореняемостью черенков голубики и биометрическими параметрами сформировавшихся растений, %

Table 3. Correlation coefficients between the rooting rate of blueberry cuttings and the biometric parameters of the plants formed, %

Биометрические параметры растений				
Начало вегетации			Конец вегетации	
Число побегов	Суммарная длина побегов	Длина корневого пучка	Число побегов	Суммарная длина побегов
0,71*	0,67	0,32	0,61	0,71*

Анализируя литературные данные, касающиеся регенерационной способности стеблевых черенков разных сортов голубики, нельзя не отметить имеющиеся в них существенные противоречия. Так, R. E. Gough [12] сообщает, что черенки сортов голубики ранних сроков созревания урожая в некоторой степени укореняются лучше, чем позднеспелый сорт ‘Coville’. По данным польских исследователей A. Rejman, K. Pliszka [13], сорта ‘Jersey’ и ‘Blueray’ размножаются стеблевыми черенками относительно легко, сорта ‘Bluetta’, ‘Bluecrop’ и ‘Earliblue’ – значительно трудней. Т. В. Курлович и В. Н. Босак [14] на основании результатов, полученных в условиях Беларуси, характеризуют сорта ‘Bluecrop’ и ‘Herbert’ как трудноукореняемые. Латышские авторы А. К. Рипа с соавт. [5] характеризуют сорт ‘Weymouth’ как легкоукореняемый, а культивары ‘Blueray’, ‘Coville’ и ‘Jersey’ – как трудноукореняемые. В экспериментах А. А. Пыжьяновой, А. Ф. Балабак [1, 2] самая высокая укореняемость зеленых черенков голубики без дополнительного стимулирования отмечена у сорта ‘Darrow’ (35,4 %), а самая низкая – у ‘Duke’ (22,5 %). Полученные нами результаты частично согласуются с данными A. Rejman, K. Pliszka, Т. В. Курлович, В. Н. Босак и А. А. Пыжьяновой, А. Ф. Балабак, но противоречат сведениям R. E. Gough и А. К. Рипы с соавт., так как в условиях нашего опыта черенки многих раннеспелых сортов (‘Blueray’, ‘Bluetta’, ‘Earliblue’ и ‘Weymouth’) укоренялись значительно труднее, чем позднеспелых (‘Coville’, ‘Elizabeth’, ‘Darrow’, ‘Jersey’).

Результаты исследований вегетативного размножения голубики показали, что корнеобразующая способность стеблевых черенков является лабильным показателем, существенно варьирующимся по годам, но, тем не менее, одни сорта характеризуются более высокой и стабильной укореняемостью черенков, а другие слабо регенерируют придаточные корни. Поскольку укоренение черенков разных культиваров проводилось в идентичных условиях, то основным фактором, определяющим их укореняемость, являлась индивидуальная способность сорта к регенерации корней. Это позволяет классифицировать исследуемые сорта по способности регенерировать адвентивные корни на три группы: легкоукореняемые с приживаемостью более 80 % (‘Elizabeth’, ‘Hardyblue’, ‘Northland’), среднеукореняемые с приживаемостью 80–60 % (‘Blueray’, ‘Coville’, ‘Croatan’, ‘Darrow’, ‘Denise Blue’, ‘Herbert’, ‘Jersey’, ‘Northcountry’, ‘Reka’, ‘Rubel’) и трудноукореняемые с приживаемостью менее 60 % (‘Bluecrop’, ‘Bluetta’, ‘Bluerose’, ‘Carolinablue’, ‘Duke’, ‘Earliblue’, ‘Nelson’, ‘Northblue’, ‘Patriot’, ‘Weymouth’).

Анализ зависимости корнеобразующей способности сортов голубики от срока созревания урожая не дал четкой закономерности, но, тем не менее, прослеживался тренд, свидетельствовавший о том, что для раннеспелых сортов голубики (‘Bluetta’, ‘Earliblue’, ‘Duke’, ‘Northblue’, ‘Patriot’, ‘Weymouth’) характерна более низкая регенерация корней, чем для средне- и позднеспелых культиваров (‘Elizabeth’, ‘Darrow’, ‘Jersey’, ‘Rubel’).

Заключение. Регенерационная способность зеленых черенков голубики генетически детерминирована с разной степенью выраженности у того или иного сорта. По корнеобразующей способности сорта голубики классифицированы на три группы: легкоукореняемые ('Elizabeth', 'Hardyblue', 'Northland'), среднеукореняемые ('Blueray', 'Coville', 'Croatan', 'Darrow', 'Denise Blue', 'Herbert', 'Jersey', 'Northcountry', 'Reka', 'Rubel') и трудноукореняемые ('Bluecrop', 'Bluetta', 'Bluerose', 'Carolinablue', 'Duke', 'Earliblue', 'Nelson', 'Northblue', 'Patriot', 'Weymouth'). Сорта, обладающие более высокой корнеобразующей способностью, как правило, продуцируют растения с большими биометрическими параметрами надземной сферы. Зеленые черенки голубики высокорослой и полувысокорослой обладают удовлетворительной регенерационной способностью, что позволяет использовать данный метод вегетативного размножения для тиражирования посадочного материала этой культуры в Беларуси.

Список использованных источников

1. Пиж'янова, А. А. Вплив сорту і типу пагона на укорінюваність зелених стеблових живців голубики високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.) / А. А. Пиж'янова, А. Ф. Балабак // Сортівивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2013. – № 2. – С. 42–45.
2. Пыжьянова, А. А. Особенности выращивания посадочного материала голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) из зеленых стеблевых черенков в условиях Правобережной лесостепи Украины / А. А. Пыжьянова, А. Ф. Балабак // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. / Гродн. гос. аграр. ун-т. – Гродно, 2013. – Т. 22. – С. 136–142.
3. Пиж'янова, А. А. Удосконалення технології дорошування кореневласних саджанців чорниці високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.) у правобережному лісостипу України / А. А. Пиж'янова // Садівництво. – 2015. – Вып. 69. – С. 95–103.
4. Пиж'янова, А. А. Удосконалення технології розмноження чорниці високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.) стебловими живцями в правобережному лісостипу України : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.07 / А. А. Пиж'янова ; Нац. акад. агр. наук Укр., Ін-т сад. – Київ, 2015. – 26 с.
5. Рипа, А. К. Клюква крупноплодная, голубика высокая, брусника / А. К. Рипа, В. Ф. Коломийцева, Б. А. Аудрина ; отв. ред. Т. Ф. Пука. – Рига : Зинатне, 1992. – 216 с.
6. Суслин, А. Особенности размножения голубики высокорослой в условиях ЦЧЗ РФ / А. Суслин, А. Пчелинцев // Вестн. Мичурин. гос. аграр. ун-та. – 2011. – № 2, ч. 1. – С. 59–62.
7. Суслин, А. Особенности размножения голубики высокорослой в условиях ЦЧЗ РФ / А. Суслин, А. Пчелинцев // Главный агроном. – 2012. – № 11. – С. 64–67.
8. Павловский, Н. Б. Влияние сроков черенкования на регенерационную способность зеленых черенков *Vaccinium × covilleum* But. et Pl. (*V. corymbosum* L.) / Н. Б. Павловский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2008. – № 2. – С. 14–19.
9. Павловский, Н. Б. Влияние типа почвенного субстрата и его температурного режима на регенерационную способность зеленых черенков *Vaccinium × covilleum* But. et Pl. (*V. corymbosum* L.) / Н. Б. Павловский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2008. – № 3. – С. 16–19.
10. Павловский, Н. Б. Регенерационные способности зеленых черенков *Vaccinium × covilleum* But. et Pl. (*V. corymbosum* L.), заготовленных с разных типов побегов и с разным числом листьев / Н. Б. Павловский // Совершенствование сортимента плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда в современных условиях хозяйствования : материалы междунар. науч.-практ. конф., пос. Самохваловичи, 28–30 авг. 2007 г. / РУП «Ин-т плод.» ; редкол. : В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2007. – С. 271–274.
11. Павловский, Н. Б. Оценка регенерационной способности зеленых черенков интродуцированных в Беларуси сортов голубики (*Vaccinium corymbosum*) / Н. Б. Павловский, О. В. Дрозд // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 2. – С. 5–9.
12. Gough, R. E. The highbush blueberry and its management / R. E. Gough. – New York ; London : Norwood, 1994. – 262 p.
13. Rejman, A. Borówka wysoka / A. Rejman, K. Pliszka. – Warszawa : Państwowe Wydaw. Rolnicze i Leśne, 1991. – 112 s.
14. Курлович, Т. В. Голубика высокорослая в Беларуси / Т. В. Курлович, В. Н. Босак. – Минск : Беларус. навука, 1998. – 176 с.

References

1. Pizh'yanova A. A., Balabak A. F. Influence of type and shoots on the increase of green stem elongated vinegar (*Vaccinium corymbosum* L.). *Sortovivchennya ta okhorona prav na sorti roslin* [Variety study and protection of rights to varieties plants], 2013, no. 2, pp. 42–45. (in Ukrainian).
2. Pyzh'yanova A. A., Balabak A. F. Features of growing planting material of tall blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) from green stem cuttings in the conditions of the Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine. *Sel'skoe khozyaistvo – problemy i perspektivy: sbornik nauchnykh trudov* [Agriculture – problems and prospects: a collection of scientific papers]. Grodno, 2013, vol. 22, pp. 136–142 (in Russian).

3. Pizh'yanova A. A. Improvement of the technologic of the cultivating of root-and-branch seedlings of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) in the right-bank cattle-breeding farm of Ukraine. *Sadivnictvo* [Gardening], 2015, iss. 69, pp. 95–103 (in Ukrainian).
4. Pizh'yanova A. A. *Improvement of the tahnologii of reproduction of blueberry tallow (Vaccinium corymbosum L.) by stem cuttings in the right-bank cattle-breeding farm of Ukraine*. Abstract of Ph. D. diss. Kyiv, 2015. 26 p. (in Ukrainian).
5. Ripa A. K., Kolomiitseva V. F., Audrinya B. A. *Cranberries are large-fruited, blueberries are high, lingonberries*. Riga, Zinatne Publ., 1992. 216 p. (in Russian).
6. Suslin A., Pchelintsev A. Features of reproduction of a blueberry tall in the conditions of the Russian Federation. *Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Michurinsky State Agrarian University], 2011, no. 2, pt. 1, pp. 59–62 (in Russian).
7. Suslin A., Pchelintsev A. Peculiarities of reproduction of highbush blueberries in the conditions of the Russian Federation. *Glavnyi agronom* [Chief agronomist], 2012, no. 11, pp. 64–67 (in Russian).
8. Pavlovskii N. B. The influence of the timing of grafting on the regenerative capacity of green cuttings *Vaccinium × covilleianum* But. et Pl. (*V. corymbosum* L.). *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2008, no. 2, pp. 14–19 (in Russian).
9. Pavlovskii N. B. The influence of the type of soil substrate and its temperature regime on the regeneration ability of green cuttings *Vaccinium × covilleianum* But. et Pl. (*V. corymbosum* L.). *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2008, no. 3, pp. 16–19 (in Russian).
10. Pavlovskii N. B. Regenerative abilities of green cuttings *Vaccinium × covilleianum* But. et Pl. (*V. corymbosum* L.) harvested from different types of shoots and with different numbers of leaves. *Sovershenstvovanie sortimenta plodovykh, yagodnykh, orekhoplodnykh kul'tur i vinograda v sovremennykh usloviyakh khozyaistvovaniya: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (poselok Samokhvalovichi, 28–30 avgusta 2007 goda)* [Improvement of fruit, small fruit, nuts and vine assortment under present management conditions: materials of the international scientific-practical conference (Samokhvalovichi settlement, August 28–30, 2007)]. Samokhvalovichi, 2007, pp. 271–274 (in Russian).
11. Pavlovskii N. B., Drozd O. V. Evaluation of the regenerative capacity of green cuttings of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars introduced in Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2011, no. 2, pp. 5–9 (in Russian).
12. Gough R. E. *The highbush blueberry and its management*. New York, London, Norwood Publ., 1994. 262 p.
13. Rejman A., Pliszka K. *Borówka wysoka (Highbush blueberries)*. Warszawa, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, 1991. 112 p. (in Polish).
14. Kurlovich T. V., Bosak V. N. *Highbush blueberries in Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 1998. 176 p. (in Russian).

Информация об авторе

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

Information about the author

Nikolay B. Pavlovskiy – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavlovskiy@tut.by

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.112+577.322
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-326-337>

Поступила в редакцию 10.04.2019
Received 10.04.2019

В. В. Побойнев¹, В. В. Хрусталёв¹, Т. А. Хрусталёва², А. Н. Стожаров¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ В СМЕШАННЫХ КЛАССАХ БЕЛКОВ

Аннотация. Изучены особенности аминокислотного состава участков белков классов «альфа + бета» и «альфа/бета», склонных к структурным переходам. Данные получены путём сравнения разных трёхмерных структур белков с абсолютно идентичной аминокислотной последовательностью. В работе не рассматривались фрагменты белков, расположение атомов в которых невозможно определить методом рентгеноструктурного анализа. Судя по более высокому проценту остатков, находящихся в структурно неустойчивых фрагментах, белки класса «альфа + бета» менее стабильны, чем белки класса «альфа/бета». Наиболее частым структурным переходом является укорочение *N*- и *C*-концов альфа-спиралей и бета-тяжей. Найдены и полностью «исчезающие» (переходящие в койл) альфа-спирали и бета-тяжи, аминокислотный состав которых несёт в себе ценную информацию, позволяющую выявить фрагменты белков, которые способны к переходу от альфа-спиралей к бета-тяжам и обладают сходным аминокислотным составом как с «исчезающими» альфа-спиралями, так и с «исчезающими» бета-тяжами. Аминокислотный состав способных к полному «исчезновению» альфа-спиралей достоверно отличается от такового способных к полному «исчезновению» бета-тяжей, что обусловлено высокой частотой использования аланина, глутамина и глутаминовой кислоты и низкой частотой использования изолейцина, треонина и глицина.

Ключевые слова: структурный переход, белок, бета-тяж, альфа-спираль, вторичная структура белка

Для цитирования: Структурные переходы в смешанных классах белков / В. В. Побойнев [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 326–337. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-326-337>

V. V. Poboinev¹, V. V. Khrustalev¹, T. A. Khrustaleva², A. N. Stojarov¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

STRUCTURAL TRANSITIONS IN MIXED CLASSES OF PROTEINS

Abstract. It was studied the features of amino acid content of protein regions of “alpha + beta” and “alpha/beta” classes, that are prone to structural transitions. The data have been obtained by the way of the comparison of different three-dimensional structures of proteins with absolutely identical amino acid sequence. In this study we ignored fragments of proteins in which positions of atoms cannot be determined with the help of *X*-ray crystallography. Proteins of “alpha + beta” class are less stable than proteins of “alpha/beta” class, since the percent of structurally instable residues in them is higher. Most frequent type of structural transitions is the decrease of length of *N*-terminal and *C*-terminal parts of alpha helices and beta strands. Alpha helices and beta strands that can completely disappear (turn to coil) have also been found. The data of their amino acid content is important for the development of the method able to detect fragments of proteins prone to transitions from alpha helix to beta strand. Those fragments should combine characteristic features of amino acid content of both completely disappearing alpha helices and completely disappearing beta strands. The amino acid composition of alpha-helices capable to complete disappearance is significantly different from that for beta-strands capable to complete disappearance: frequencies of alanine, glutamine and glutamic acid usage are increased, frequencies of isoleucine, threonine and glycine usage are reduced.

Keywords: structural transition, protein, beta-strand, alpha-helix, secondary structure of protein

For citation: Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Stojarov A. N. Structural transitions in mixed classes of proteins. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 326–337 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-326-337>

Введение. В соответствии со структурной классификацией SCOP [1] все белки можно разделить на 7 основных классов. К первым двум классам относятся альфа-спиральные белки, вторичная структура которых представлена в основном альфа-спиралями, и бета-структурные, вторичная структура которых представлена в основном бета-тяжами. Конечно, как в альфа-спиральных белках возможно формирование немногочисленных бета-тяжей, так и в бета-структурных белках

возможно формирование отдельных альфа-спиралей. Лишь некоторые из таких одиночных альфа-спиралей и бета-структур могут отличаться повышенной стабильностью. Примером альфа-спиральных белков является человеческий интерлейкин-6 (PDB-идентификатор: 1ALU), примером бета-структурных белков – иммуноглобулин (PDB-идентификатор FC-фрагмента IGG1: 1DN2). К третьему классу относятся мембранные белки и пептиды (за исключением белков и пептидов иммунной системы). К четвёртому – небольшие белки, имеющие в первичной структуре до 100 аминокислотных остатков. Третичная структура белков данного класса обычно поддерживается дисульфидными связями, взаимодействием с лигандами и кофакторами [1]. В белках класса «альфа + бета» существуют отдельные альфа-спиральные и бета-структурные области, т. е. из одной части аминокислотной последовательности формируются альфа-спирали, а из другой – бета-структуры. В белках класса «альфа/бета» отдельные альфа-спиральные и бета-структурные области выделить нельзя (чаще всего в них альфа-спирали и бета-тяжи чередуются друг с другом через один элемент вторичной структуры). В соответствии со структурной классификацией можно также выделить класс белков «альфа и бета». Для данных белков характерно наличие отдельных доменов, принадлежащих к разным классам.

Белки разных классов отличаются по своему аминокислотному составу. Согласно термодинамическим расчётам, белки разных классов отличаются по уровню структурной стабильности [2], а значит, на возможность осуществления структурного перехода должна влиять аминокислотная последовательность белка. Известен целый ряд заболеваний, возникновение которых обусловлено изменением конформации белковых молекул. К конформационным заболеваниям относят прионные болезни: губчатые энцефалопатии млекопитающих (бычья губчатая энцефалопатия или коровье бешенство, скрэпи овец) и нейродегенеративные заболевания человека (болезни Крейтцфельда–Якоба и Герстмана–Штраусслера–Шейнкера, семейную фатальную бессонницу и куру) [3, 4]. Эти заболевания могут быть наследственными, приобретенными и спорадическими [3, 4]. Прионные заболевания могут передаваться от человека человеку или от животных человеку [5], что повышает актуальность раскрытия механизмов перехода нормального прионного белка в его патологическую форму, а именно переход альфа-спиралей в бета-тяжи. Следовательно, инфекционным агентом для таких заболеваний является аномальная (бета-структурная) форма прионного белка [6].

К конформационным относят также амилоидные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Хангтингтона и Паркинсона, при которых происходит вне- или внутриклеточное накопление белковых агрегатов фибриллярной структуры, в норме представляющих собой растворимые клеточные белки [7]. При этом на эти заболевания не распространяется прионная концепция, что тормозит развитие их этиотропной терапии. Знание возможного механизма перехода одних элементов вторичной структуры в другие позволит ускорить разработку ингибиторов для того или иного структурного перехода.

Структурные переходы в какой-то мере можно объяснить схожим аминокислотным составом различных элементов вторичной структуры: альфа-спирали обогащены такими аминокислотными остатками, как аланин, глутаминовая кислота, глутамин, лейцин, аргинин, лизин, метионин [8]. При этом все эти аминокислотные остатки в той или иной степени могут включаться и в состав бета-тяжей, которые в среднем содержат больше валина, изолейцина, фенилаланина, тирозина и треонина, чем альфа-спирали и неструктурированные участки [9], т. е. обогащены гидрофобными аминокислотными остатками. Однако помимо гидрофобных бета-тяжей встречаются и относительно гидрофильные, с чередованием гидрофобных и гидрофильных остатков через один [10].

Цель исследования – определить особенности структурно неустойчивых мотивов белков классов «альфа + бета» и «альфа/бета», склонных к переходам от альфа-спиралей и бета-тяжей к неструктурированному состоянию, предположить особенности аминокислотного состава фрагментов белков, склонных к переходам от альфа-спирального к бета-структурному состоянию.

Практическая значимость работы заключается в том, чтобы выявить особенности фрагментов белков, склонных к структурным переходам. На основании полученной информации планируется создать алгоритм, с помощью которого можно выявлять участки альфа-спиралей

и бета-тяжей, склонных переходить в неструктурированное состояние, а также фрагменты белков, в которых возможен переход альфа-спиралей в бета-тяжи. Поиск таких структурно неустойчивых фрагментов белков важен в рамках разработки возможных методов ингибирования данного перехода, а соответственно, и лечения конформационных заболеваний.

На сегодняшний день стало возможным изучение структурных переходов с использованием известных структур белков, без компьютерного моделирования строения нормальных и мутантных белков, так как количество 3D-структур в международном банке данных (PDB) растёт стремительными темпами. Например, если в 2000 г. известно было лишь 13589 структур, то на апрель 2019 г. их насчитывалось уже 150593 [11]. Один и тот же белок зачастую представлен несколькими 3D-структурами, построенными разными авторами по результатам рентгеноструктурного анализа или ядерно-магнитного резонанса в разных условиях, в комплексе с различными лигандами. Если ранее можно было сравнивать эти структуры друг с другом с целью раскрытия конформационной изменчивости каждого отдельно взятого белка, то сейчас стало возможным изучение общих механизмов структурных переходов для целых классов белков.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили две выборки трёхмерных структур белков человека и других эукариот из международной базы данных Protein Data Bank (www.pdb.org). Белки, вошедшие в состав каждой выборки (по 100 белков класса «альфа/бета» и класса «альфа + бета»), не являлись гомологичными (степень сходства между аминокислотными последовательностями белков в каждой выборке не превышала 25 %). Для определения степени их сходства использовали алгоритм Decrease Redundancy (www.web.expasy.org/decrease_redundancy). При этом в выборку попадали лишь те белки, для которых существует хотя бы одна аминокислотная последовательность со 100 %-ной идентичностью к исследуемой. В данной работе нами не использовались белки, которые нельзя классифицировать однозначно. Кроме того, если белок был представлен олигомером, одну цепь которого можно отнести или к классу «альфа/бета», или к классу «альфа + бета», то в выборку включали только ту цепь, которую можно отнести к одному из исследуемых нами классов белков. Элементы вторичной структуры определяли с помощью алгоритма DSSP (www.swift.cmbi.umcn.nl/gv/dssp). Все фрагменты полипептидной цепи, не образующие альфа-спирали и бета-тяжи, классифицировались как койл.

При рассмотрении структурной неустойчивости были выделены четыре возможных случая нахождения конкретной аминокислоты: альфа-спираль/койл (НС), бета-тяж/койл (ЕС), альфа-спираль/бета-тяж (НЕ) и альфа-спираль/бета-тяж/койл (НЕС). НС – случай, когда аминокислота находится в составе альфа-спирали на одной структуре белка и в койле на другой структуре белка со 100 %-ной аминокислотной идентичностью; ЕС – случай, когда аминокислота может находиться как в бета-тяже, так и в койле белков со 100 %-ной аминокислотной идентичностью; НЕ – случай, когда аминокислота может находиться в альфа-спирали или в бета-тяже белка со 100 %-ной аминокислотной идентичностью; НЕС – случай, когда аминокислота может находиться или в альфа-спирали, или в бета-тяже, или в неструктурированном участке белка со 100 %-ной аминокислотной идентичностью. Участки белков с отсутствующей электронной плотностью на рентгенологической структуре не учитывали.

Аминокислотный состав структурно изменчивых участков белков сравнивали с аминокислотным составом устойчивых к структурным переходам фрагментов альфа-спиралей, бета-тяжей и койла. Локализацию фрагментов НС определяли относительно границ структурно устойчивых альфа-спиралей. Выделяли фрагменты НС, которые граничат как с *N*-, так и с *C*-концом альфа-спирали, а также фрагменты НС, которые не граничат со структурно устойчивыми фрагментами альфа-спиралей. Аналогичным образом были проклассифицированы фрагменты ЕС относительно локализации устойчивых бета-тяжей.

Пентапептидный состав рассчитывали с учётом разделения всех аминокислот на гидрофобные (O) и гидрофильные (W), сформировав 32 возможных варианта. При разделении элементов вторичной структуры на пентапептиды использовали метод скольжения с шагом в одну аминокислоту, с учётом того, что переменный аминокислотный остаток занимает третье положение в пентапептиде.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью *t*-критерия для относительных значений.

Результаты исследования. Особенности неустойчивых фрагментов альфа-спиралей. Среди участков с неустойчивой вторичной структурой практически отсутствовали те, которые могут образовывать как альфа-спираль, так и бета-тяж. Этот факт свидетельствует о том, что такие переходы «запрещены» в подавляющем большинстве белков. При этом процент остатков, находящихся в составе альфа-спиралей на одних структурах и в составе неструктурированных участков (в койле) на других довольно велик, так же как и процент остатков, способных находиться как в составе бета-тяжа, так и в койле. Особенности участков НС (в которых «разрешен» переход из альфа-спирали в койл и обратно) и ЕС (в которых «разрешен» переход из бета-тяжа в койл и обратно) посвящена большая часть данной работы.

Для частот встречаемости остатков из фрагментов НС характерно распределение, отличное от такового для альфа-спиралей и койла. Тем не менее фрагменты НС ближе по своему составу к альфа-спиралям, нежели к койлу. Аминокислотный состав фрагментов НС не соответствует среднему аминокислотному составу альфа-спиралей и койла. Исходя из этого, можно предположить, что большая часть фрагментов НС – это альфа-спирали и их участки, которые при определенных обстоятельствах способны переходить в неструктурированное состояние. Причиной появления самой возможности таких переходов могут быть единичные аминокислотные замены, дестабилизирующие альфа-спиральную конформацию.

Аминокислотные остатки можно разделить на несколько групп, в зависимости от частоты их использования во фрагментах НС, в альфа-спиралях и койле, в среднем – в альфа-спиралях и койле. Остатки Gly/Pro/Asp («брейкеры»: глицин, пролин и аспарагиновая кислота) в сумме достоверно реже встречаются во фрагментах НС, чем в койле, в среднем – в койле и альфа-спиралях. При этом в белках класса «альфа + бета» Gly/Pro/Asp достоверно больше во фрагментах НС (табл. 1), чем в альфа-спиралях, чего нельзя сказать о белках класса «альфа/бета» (табл. 2).

Таблица 1. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа + бета» в устойчивых альфа-спиралях (Н), койле (С), в участках, способных существовать как в составе альфа-спирали, так и в составе койла (НС), в среднем по альфа-спиралям и койлу (Н + С)

Table 1. Differences in the total frequencies of amino acid residues of “alpha + beta” class proteins in stable alpha helices (H), random coil (C), in areas that can exist both in the alpha helix and in the random coil (HC), on average in alpha helices and random coil (H + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Н/С	НС/С	НС/Н	Н + С/НС
Gly/Pro/Asp	↓	↓	↑	↑
Leu/Gln/Ala/Glu	↑	↑	↓	↓
His/Arg/Lys	=	↑	↑	↓
Tyr/Trp	↑	=	↓	=
Ser/Asn	↓	=	↑	=
Met/Ile/Val/Phe/Cys/Thr	↑	=	↓	=

Примечание. В табл. 1–4 достоверность различий между группами: «↑» – более высокая частота, «↓» – более низкая частота, «=» – нет различий.

Известные «формирователи» альфа-спиралей (Leu/Gln/Ala/Glu: лейцин, глутамин, аланин и глутаминовая кислота) во фрагментах НС, наоборот, встречаются достоверно чаще, чем в койле и в среднем – в койле и альфа-спиралях. В белках класса «альфа + бета» (см. табл. 1) Leu/Gln/Ala/Glu имеют более низкую общую частоту использования во фрагментах НС, чем в альфа-спиралях, в отличие от белков «альфа/бета» (табл. 2).

Характерной особенностью фрагментов НС в обоих классах белков является высокая частота использования положительно заряженных остатков His/Arg/Lys (гистидина, аргинина и лизина), превышающая таковую даже в альфа-спиралях.

Таблица 2. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа/бета» в устойчивых альфа-спиралях (Н), койле (С), в участках, способных существовать как в составе альфа-спирали, так и в составе койла (НС), в среднем по альфа-спиралям и койлу (Н + С)

Table 2. Differences in the total frequencies of amino acid residues of “alpha/beta” class proteins in stable alpha helices (H), random coil (C), in areas that can exist both in the alpha helix and in the random coil (HC), on average in alpha helices and random coil (H + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Н/С	НС/С	НС/Н	Н + С/НС
Gly/Pro/Asp	↓	↓	=	↑
Leu/Gln/Ala/Glu	↑	↑	=	↓
His/Arg/Lys	↑	↑	↑	↓
Tyr/Trp	=	=	=	=
Ser/Asn	↓	=	↑	=
Met/Ile/Val/Phe/Cys/Thr	↑	=	↓	↑

Остатки тирозина и триптофана (Tyr/Trp) в белках класса «альфа/бета» не отличаются какими-либо особенностями в распределении по рассматриваемым фрагментам, а в белках класса «альфа + бета» их больше в альфа-спиралях, чем в койле и во фрагментах НС.

Остатков серина и аспарагина (Ser/Asn) достоверно больше во фрагментах НС, чем в спиральях, а в последних они не настолько распространены, как в койле.

Аминокислотные остатки Met/Ile/Val/Phe/Cys/Thr (метионин, изолейцин, валин, фенилаланин, цистеин и треонин) чаще встречаются в альфа-спиралях, чем в койле, а во фрагментах НС – чаще, чем в среднем по альфа-спиралям и койлу в белках класса «альфа/бета». Известно, что такие аминокислотные остатки, как изолейцин, валин, фенилаланин, цистеин и треонин, являются «формирователями» бета-структуры. При этом в белках обоих рассматриваемых классов их меньше во фрагментах НС, чем в альфа-спиралях, что говорит об их повышенной защищенности от возможных переходов в бета-структуру.

Следует отметить, что в участках НС количество аминокислотных остатков на С-концах альфа-спиралей, в 3 раза больше, чем на N-концах. То есть альфа-спирали меняют свою длину чаще за счёт «расплетания» С-концов, чем N-концов. Полное разрушение альфа-спирали происходит редко: количество остатков в НС на N-конце спиралей примерно равно таковому в «исчезающих» альфа-спиралях. По этой причине аминокислотные остатки, часто встречающиеся как на С-концах альфа-спиралей [12], так и в койле за ними (Ser/Asn/His/Arg/Lys), имеют высокие частоты использования в целом во фрагментах НС. В отличие от них, «брейкеры» Gly/Pro/Asp, а также Glu часто находятся на N-концах альфа-спиралей или в койле перед ними.

Важно отметить, что 11,12 % альфа-спиралей имеют неустойчивый N-конец, при этом каждая третья альфа-спираль (33,74 %) имеет неустойчивую область на С-конце. Информация о структурной неустойчивости концов альфа-спиралей важна для разработки алгоритма, способного корректно определять их длину. Информация о возможности полного исчезновения альфа-спиралей (рис. 1) особенно важна для изучения патогенеза конформационных заболеваний.

Длина N- и С-концевых неустойчивых фрагментов альфа-спиралей, как правило, составляет от одного до трёх аминокислотных остатков (на N-конце: один остаток – в 53,55 % случаев, два – в 21,86 %, три – в 13,11 %; на С-конце: один остаток – в 65,41 % случаев, два – в 20,54 %, три – в 6,85 %). Длина «исчезающих» альфа-спиралей в большинстве случаев минимальна – 4 аминокислотных остатка (в 53,97 % случаев). При изменении конформации такие альфа-спирали зачастую формируют спирали 3/10, которые в данной работе классифицируются как койл. Действительно, 49,85 % аминокислотных остатков из «исчезающих» альфа-спиралей находятся в составе спиралей 3/10 хотя бы в одном из структурных вариантов белка. Как правило, для спиралей 3/10 характерна длина в три или в пять аминокислотных остатков [13]. Поэтому многие «исчезающие» альфа-спирали укорачиваются, переходя частью своих остатков в спирали 3/10.

В целом, альфа-спирали, полностью превращающиеся в койл, обладают аминокислотным составом, более близким к альфа-спиралям, чем к койлу (рис. 1). В таких альфа-спиралях частота использования пролина достоверно выше, чем в устойчивых альфа-спиралях, а частота исполь-

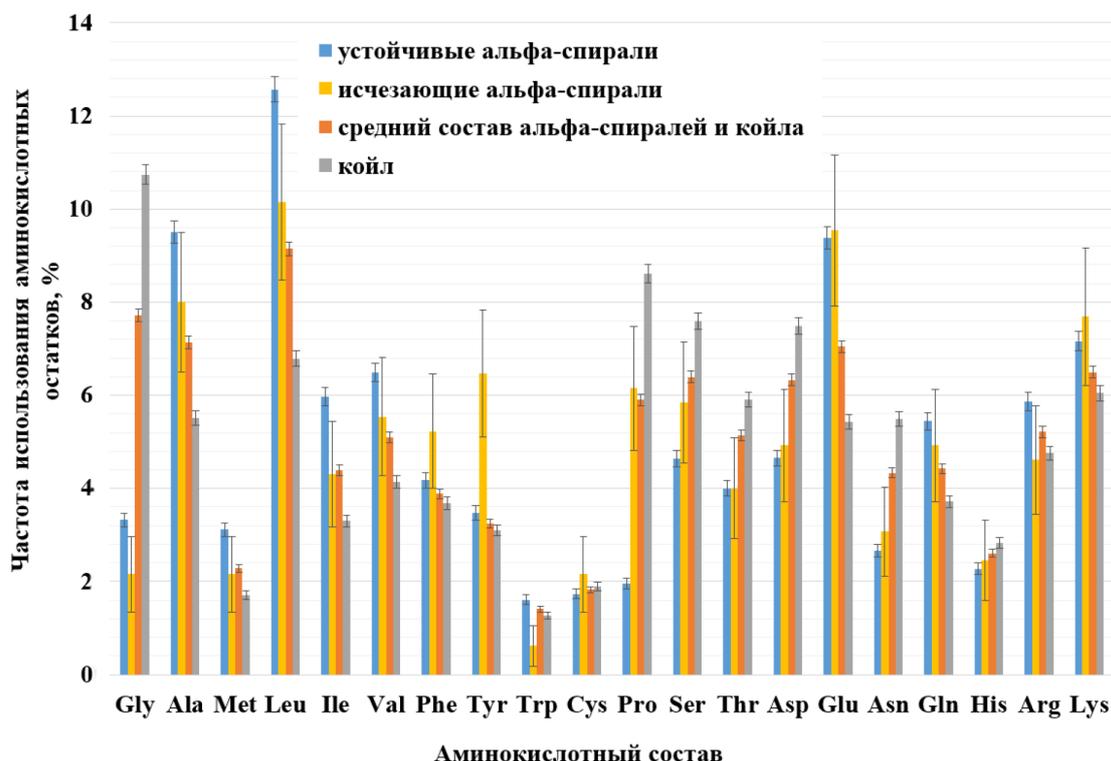


Рис. 1. Частота использования аминокислотных остатков в альфа-спиралях и койле, %

Fig. 1. Percentage of amino acids in alpha helices and random coil, %

зования лейцина – ниже. Высокую частоту использования в них пролина можно объяснить их небольшой длиной: пролин может находиться только в первых трёх положениях альфа-спиралей. Специфической чертой таких спиралей, обуславливающей их неустойчивость, может быть низкая частота использования лейцина. В обсуждаемых альфа-спиралях таких «брейкеров», как глицин, пролин, серин и аспарагин, достоверно меньше, чем в койле, а альфа-спиральных лейцина, аланина и глутаминовой кислоты – достоверно больше, так же как и тирозина.

По пентапептидному составу «исчезающие» альфа-спирали похожи как на устойчивые альфа-спирали, так и на койл. Резкие различия в нашей выборке касаются повышенной частоты использования пентапептида WWOWW в таких спиралях по сравнению с койлом при более низкой частоте использования бета-структурного пентапептида OOOOO [14], чем в устойчивых альфа-спиралях и койле.

Особенности неустойчивых фрагментов бета-тяжей. По распределению частот встречаемости аминокислотных остатков фрагменты ЕС отличаются как от бета-тяжей, так и от койла. Кроме того, нельзя считать состав фрагментов ЕС усредненным составом бета-тяжей и койла.

В структурно изменчивых фрагментах ЕС значительно снижена частота использования такого альфа-спирального остатка, как аланин. Его частота достоверно ниже в ЕС, чем в устойчивых бета-тяжах и койле. Этот факт свидетельствует о «запрете» на переходы от бета-тяжа к альфа-спирали и обратно в таких фрагментах.

Остатки Thr/Glu/Arg/Lys в обоих классах белков в большей степени используются во фрагментах ЕС, чем в бета-тяжах. При этом в белках обоих классов их суммарная частота использования одинакова в ЕС и койле (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о высокой степени гидрофильности бета-тяжей и их фрагментов, подверженных структурным переходам в койл.

Частоты использования «брейкеров» Gly/Pro/Ser/Asp/Asn/His во фрагментах ЕС выше, чем в устойчивых бета-тяжах, но не достигают среднего значения для бета-тяжей и койла. Частоты использования «формирователей» бета-тяжей Ile/Val/Tyr во фрагментах ЕС, напротив, понижены по сравнению с устойчивыми бета-тяжами, но остаются на более высоком уровне, чем в среднем по бета-тяжам и койлу.

Частоты использования остатков Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln, большая часть которых обладает альфа-спиральным потенциалом, тем не менее, выше в бета-тяжах, чем в койле, но ниже во фрагментах ЕС, чем в бета-тяжах. В белках обоих классов частоты использования Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln во фрагментах ЕС достоверно выше, чем в койле (табл. 3, 4).

Т а б л и ц а 3. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа + бета» в устойчивых бета-тяжах (Е), койле (С), в участках, способных существовать как в составе бета-тяжа, так и в составе койла (ЕС), в среднем по бета-тяжам и койлу (Е + С)

Table 3. Differences in the total frequencies of amino acid residues of “alpha + beta” class proteins in stable beta-strands (E), random coil (C), in areas that can exist both in beta-strands and in the random coil (EC), on average in beta-strands and random coil (E + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Е/С	ЕС/С	ЕС/Е	Е + С/ЕС
Thr/Glu/Arg/Lys	↓	=	↑	↓
Ala	=	↓	↓	↑
Gly/Pro/Ser/Asp/Asn/His	↓	↓	↑	↑
Ile/Val/Tyr	↑	↑	↓	↓
Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln	↑	↑	↓	=

Т а б л и ц а 4. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа/бета» в устойчивых бета-тяжах (Е), койле (С), в участках, способных существовать как в составе бета-тяжа, так и в составе койла (ЕС), в среднем по бета-тяжам и койлу (Е + С)

Table 4. Differences in the total frequencies of amino acid residues of proteins of class “alpha/beta” in stable beta-strands (E), random coil (C), in areas that can exist both in the beta-strands and in the random coil (EC), on average in beta-strands and random coil (E + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Е/С	ЕС/С	ЕС/Е	Е + С/ЕС
Thr/Glu/Arg/Lys	↓	=	↑	↓
Ala	=	↓	↓	↑
Gly/Pro/Ser/Asp/Asn/His	↓	↓	↑	↑
Ile/Val/Tyr	↑	↑	↓	↓
Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln	↑	↑	↓	=

Приведенные данные показывают, что аминокислотный состав «исчезающих» бета-тяжей в белках классов «альфа + бета» близок к таковому в белках класса «альфа/бета». Тенденции, приведенные в табл. 3, полностью воспроизводятся в табл. 4.

Количество аминокислотных остатков во фрагментах ЕС, расположенных на *N*- и *C*-концах бета-тяжей, примерно одинаково. Приблизительно в 2 раза меньше остатков во фрагментах ЕС из полностью «исчезающих» бета-тяжей. Информация об аминокислотном составе последних приведена на рис. 2.

Длина структурно неустойчивых *N*- и *C*-концевых фрагментов бета-тяжей составляет обычно один-два остатка (на *N*-конце: один остаток – в 72,16 % случаев, два – в 19,16 % случаев; на *C*-конце: один остаток – в 78,86 % случаев, два – в 13,43 % случаев). Около 16 % бета-тяжей имеют структурно неустойчивый *N*-конец, столько же – неустойчивый *C*-конец.

Длина «исчезающих» бета-тяжей, как правило, составляет два-три остатка (два остатка – в 63,35 % случаев, три – в 18,01 % случаев), хотя встречаются и довольно длинные бета-тяжи до 10 остатков длиной, полностью «исчезающие» на некоторых 3D-структурах абсолютно идентичных белков. В таких бета-тяжах достоверно больше пролина и глицина и достоверно меньше валина, лейцина и аланина, чем в структурно устойчивых бета-тяжах. Тем не менее, в них достоверно больше сильных «формирователей» бета-структуры (изолейцина, валина, тирозина), чем в койле, а также в них реже встречаются «брейкеры»: глицин, пролин, аспарагиновая кислота и аспарагин. Изолейцина в неустойчивых бета-тяжах достоверно больше, чем в среднем по койлу

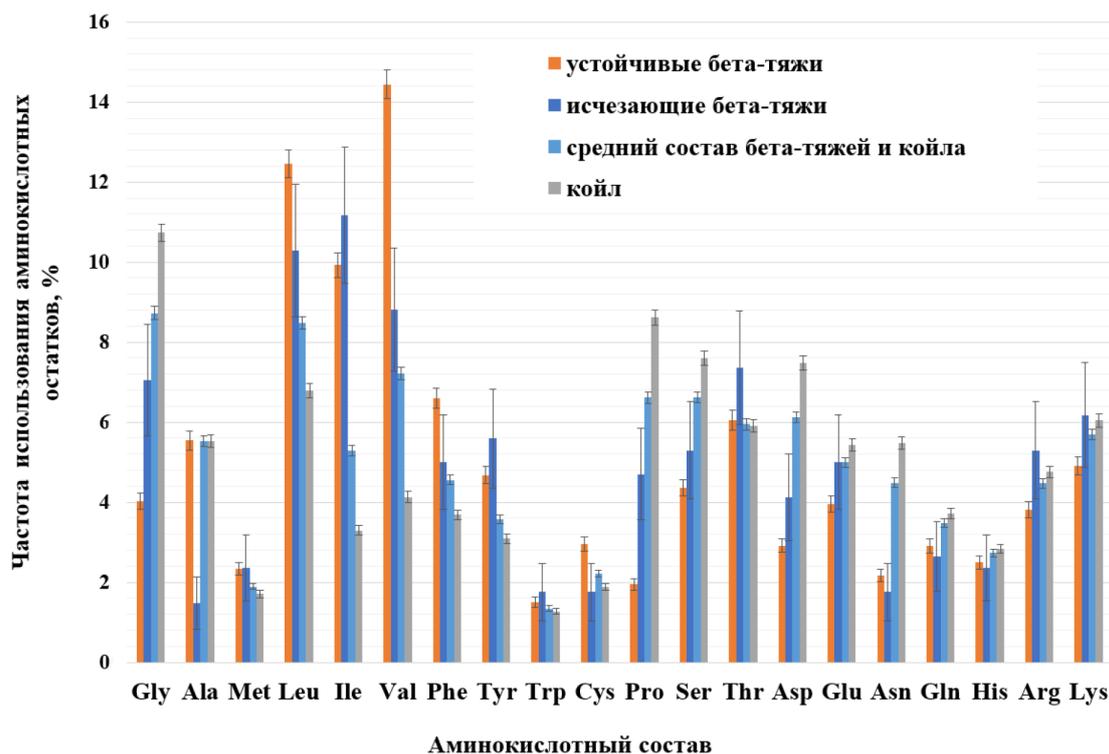


Рис. 2. Частота встречаемости аминокислотных остатков в бета-тяжах и койле, %

Fig. 2. Percentage of amino acids in beta strands and random coil, %

и устойчивым бета-тяжам. Именно в «исчезающих» бета-тяжах, а не в концевых фрагментах устойчивых бета-тяжей особенно заметно снижение частоты использования аланина.

Пентапептидный состав «исчезающих» бета-тяжей гораздо ближе к составу койла, чем к составу устойчивых бета-тяжей. Гидрофобные пентапептиды в «исчезающих» бета-тяжах встречаются достоверно реже, чем в устойчивых. Нельзя не подчеркнуть высокие частоты использования таких альфа-спиральных пентапептидов, как WOOWW и WWOOW [14] в «исчезающих» бета-тяжах. Лишь специфические комбинации аминокислотных остатков (в частности, низкая частота использования аланина) могут предотвратить переход от бета-тяжа к альфа-спирали в таких пентапептидах.

Обсуждение. Элементы вторичной структуры формируются на ранних этапах фолдинга белка [15]. Формирование регулярных водородных связей по типу main chain – main chain должно быть энергетически выгодно само по себе. При этом существенный (а порой решающий) вклад в тепловой эффект от образования вторичной структуры вносят слабые взаимодействия (в основном гидрофобные) между радикалами аминокислот, а также водородные связи по типу main chain – side chain и side chain – side chain [2]. Считается, что альфа-спирали как элемент вторичной структуры более устойчивы, чем бета-тяжи, так как известно, что альфа-спирали могут накапливать мутации без изменения вторичной структуры в большей мере, чем бета-тяжи [16]. На основании этого можно предположить, что альфа-спирали в меньшей степени склонны к структурным переходам.

Интересен тот факт, что в белках обоих классов обнаружено большое количество нестабильных участков белков, в которых возможны переходы как бета-тяжей в койл и обратно, так и альфа-спиралей в койл и обратно, но переходов альфа-спиралей в бета-тяжи в белках «альфа/бета» не выявлено, при этом в исследованных белках «альфа + бета» найдено только три таких перехода. Однако известны заболевания, при которых на месте альфа-спиралей образуются бета-тяжи, т. е. переход альфа-спиралей в бета-тяжи, по всей видимости, происходит через промежуточные стадии формирования койла или полностью неструктурированного состояния, которое невозможно обнаружить методом рентгеновской кристаллографии. Кроме того, установлено, что

переходов койла в бета-тяжи и обратно больше в белках класса «альфа + бета», чем в белках класса «альфа/бета». Это ещё раз подтверждает тот факт, что белки класса «альфа/бета» более стабильные.

Согласно нашей гипотезе, участки белков, способные к переходу из альфа-спирали в бета-тяжи и обратно, должны обладать аминокислотным составом, сочетающим особенности как «исчезающих» альфа-спиралей, так и «исчезающих» бета-тяжей. Тогда альфа-спирали смогут перейти в койл, а на месте койла сможет сформироваться бета-тяж. При сравнении аминокислотного состава «исчезающих» бета-тяжей и альфа-спиралей выяснилось, что между ними есть только шесть достоверных различий. Структурно неустойчивые бета-тяжи отличаются от неустойчивых альфа-спиралей приблизительно в 4 раза пониженной частотой использования аланина и почти в 2 раза более низкой частотой использования глутаминовой кислоты и глутаминна. При появлении этих альфа-спиральных аминокислотных остатков во фрагментах ЕС вероятность образования ими альфа-спирали должна существенно повышаться. В большинстве случаев, судя по нашим данным, такие мутации подвергаются элиминации. Структурно неустойчивые альфа-спирали обеднены глицином (приблизительно в 3 раза), изолейцином (более чем в 2,5 раза) и треонином (почти в 2 раза) по сравнению с неустойчивыми бета-тяжами. Следовательно, появление изолейцина и треонина во фрагментах НС должно повышать вероятность формирования ими бета-тяжа, а появление глицина должно способствовать поворотам полипептидной цепи с целью её правильной ориентации для образования бета-структуры. Согласно полученным данным, фрагменты белков, в которых облегчен структурный переход из альфа-спирального состояния в бета-структурное, должны обладать повышенной частотой использования как альфа-спиральных аланина, глутаминна и глутаминовой кислоты, так и бета-структурных изолейцина и треонина с глицином. Интересно, что в некоторых случаях фрагменты белка, способные к переходу из альфа-спирали в бета-тяж и обратно, выполняют такую важную биологическую функцию, как, например, участие в механизме активации рецепторов факторов роста [17].

Следует также отметить статистически одинаковые частоты использования цистеина в белках обоих классов. При этом нет никаких достоверных различий во встречаемости цистеина во фрагментах ЕС или НС белков какого-либо из смешанных классов, т. е. значение дисульфидных связей в переходах вторичной структуры велико только для отдельных белков, а не представляет собой фундаментальное явление для белков класса «альфа + бета» или «альфа/бета». Наличие же дисульфидных связей в переменных областях белков, наоборот, должно стабилизировать их вторичную структуру и предотвращать структурный переход, как, например, в рибонуклеазе А [18].

При любых структурных переходах происходит изменение общей энергии системы, на которую, как известно, влияют энтальпийный и энтропийный факторы, вклад которых различен при формировании тех или иных элементов вторичной структуры. Обычно в альфа-спиралях аминокислотные остатки образуют большее количество взаимодействий, чем в бета-тяжах [16]. То есть энтропия при образовании альфа-спиралей снижается в большей степени, чем при образовании бета-структуры, что должно способствовать переходу из альфа-спирали в бета-тяж. Из-за большего количества взаимодействий между аминокислотными остатками энтальпия при образовании альфа-спиралей снижается в большей степени, чем при формировании бета-тяжей, что должно способствовать переходу из бета-тяжа в альфа-спираль. Естественно, в каждом конкретном случае степени снижения энтальпии и энтропии могут существенно варьироваться, способствуя формированию того или иного типа вторичной структуры. Чем больше количество гидрофобных аминокислотных остатков взаимодействуют друг с другом в составе бета-структуры, тем большим должен быть тепловой эффект от её формирования и тем вероятнее смещение равновесия в сторону её образования. Поэтому повышенное процентное содержание изолейцина, фенилаланина, тирозина, валина в обоих классах белков способствует формированию гидрофобного бета-структурного кластера.

Терапию заболеваний, сопровождающихся альфа-бета переходом, рационально проводить только до возникновения признаков заболевания и направлять её на предотвращение самой воз-

возможности такого перехода. Другими словами, для каждого конформационного заболевания в идеале можно подобрать ингибитор (белковой природы или низкомолекулярный миметик антитела [19]), препятствующий структурному переходу конкретной области соответствующего белка. Обнаружить «мишени» для разработки такой терапии можно с помощью полученных в данной работе знаний об аминокислотном составе «исчезающих» альфа-спиралей и бета-тяжей.

Выводы

1. В белках класса «альфа + бета» частота использования аминокислотных остатков, склонных к структурным переходам, достоверно выше (7,82 %), чем в белках класса «альфа/бета» (5,42 %).

2. Аминокислотный состав структурно неустойчивых фрагментов белков, в особенности класса «альфа/бета», контролируется естественным отбором на стадии элиминации неблагоприятных аминокислотных замен: «разрешенными» являются переходы единичных аминокислотных остатков из альфа-спиралей в койл и из бета-тяжей в койл (в большинстве случаев на N- и C-концах альфа-спиралей и бета-тяжей), а переходы из альфа-спиралей в бета-тяжи, как правило, «запрещены».

3. Наиболее часто структурным переходам из альфа-спирали в койл (что характерно для каждой третьей альфа-спирали) подвержены C-концевые остатки альфа-спиралей, обогащенные положительно заряженными аминокислотными остатками.

4. Аминокислотный состав способных к полному «исчезновению» альфа-спиралей достоверно отличается от такового способных к полному «исчезновению» бета-тяжей, что обусловлено повышенной частотой использования аланина, глутамина и глутаминовой кислоты и пониженной частотой использования изолейцина, треонина и глицина.

Список использованных источников

1. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures / A. G. Murzin [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 247, N 4. – P. 536–540. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80134-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80134-2)
2. Термодинамическая характеристика стабильности структуры белков четырех классов / В. В. Побойнев [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф. ; 13-й съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков : тез. докл., Минск, 27–29 июня 2018 г. / редкол. : И. Д. Вологовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – С. 34.
3. Geschwind, M. D. Prion diseases / M. D. Geschwind // *CONTINUUM: Lifelong Learn. in Neurol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1612–1638. <https://doi.org/10.1212/CON.00000000000000251>
4. Knight, R. S. G. Prion diseases / R. S. G. Knight, R. G. Will // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2004. – Vol. 75, N 90001. – P. 36–42. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.036137>
5. Johnson, R. T. Prion diseases / R. T. Johnson // *Lancet Neurol.* – Vol. 4, N 10. – P. 635–642. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(05\)70192-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(05)70192-7)
6. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie / S. B. Prusiner // *Science.* – 1982. – Vol. 216, N 4542. – P. 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
7. Cooperative structural transitions in amyloid-like aggregation / T. Steckmann [et al.] // *J. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 146, N 13. – P. 135103. <https://doi.org/10.1063/1.4979516>
8. Chou, P. Y. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence / P. Y. Chou, G. D. Fasman // *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* / ed. A. Meister. – New York, 1978. – Vol. 47. – P. 45–148.
9. Стабильность альфа-спиральных и бета-структурных блоков в белках четырех структурных классов / В. В. Побойнев [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук. Сер. біял. навук.* – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 391–400.
10. Хрусталёв, В. В. Особенности аминокислотного состава бета-тяжей в белках различных структурных классов / В. В. Хрусталёв, В. В. Побойнев, Т. А. Хрусталёва // *Фундаментальная наука в современной медицине : материалы сателл. дистанц. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых (Минск, 3 марта 2017 г.)* / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. А. В. Сикорского [и др.]. – Минск, 2017. – С. 331–336.
11. The Protein Data Bank / H. M. Berman [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28, N 1. – P. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
12. Aurora, R. Helix capping / R. Aurora, G. D. Rose // *Protein Sci.* – 1998. – Vol. 7, N 1. – P. 21–38. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070103>
13. Khrustalev, V. V. The influence of flanking secondary structures on amino acid content and typical lengths of 3/10 helices / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, T. A. Khrustaleva // *Int. J. Proteomics.* – 2014. – Vol. 2014. – Art. ID 360230. <https://doi.org/10.1155/2014/360230>

14. Побойнев, В. В. Особенности аминокислотного состава альфа-спиральных участков в полипептидных цепях белков различных структурных классов / В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Вес. Нац. акад. наук. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 58–66.
15. Baldwin, R. L. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states / R. L. Baldwin, G. D. Rose // Trends Biochem. Sci. – 1999. – Vol. 24, N 5. – P. 77–83. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01345-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01345-0)
16. Abrusán, G. Alpha helices are more robust to mutations than beta strands / G. Abrusán, J. A. Marsh // PLoS Comput. Biol. – 2016. – Vol. 12, N 12. – P. e1005242. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005242>
17. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor / X. Zhang [et al.] // Cell. – 2006. – Vol. 125, N 6. – P. 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.013>
18. Dynamics of disulfide-bond disruption and formation in the thermal unfolding of ribonuclease A / P. Krupa [et al.] // J. Chem. Theory Comput. – 2017. – Vol. 13, N 11. – P. 5721–5730. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00724>
19. Разработка потенциальных ингибиторов ВИЧ-1 методами in silico клик-химии и молекулярного моделирования / А. М. Андрианов [и др.] // Мат. биология и биоинформатика. – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 507–525.

References

1. Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, 1995, vol. 247, no. 4, pp. 536–540. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80134-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80134-2)
2. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Stozharov A. N., Khrustaleva T. A. Thermodynamic characteristics of stability of the structure of proteins of four classes. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funkcionirovaniya biosistem: mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya; Trinadtsatyi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov: tezisy dokladov (Belarus', Minsk, 27–29 iyunya 2018 goda)* [Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems: international scientific conference; The thirteenth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists: abstracts of reports (Belarus, Minsk, June 27–29, 2018)]. Minsk, 2018, p. 34 (in Russian).
3. Geschwind M. D. Prion Diseases. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 2015, vol. 6, pp. 1612–1638. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000251>
4. Knight R. S. G., Will R. G. Prion diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2004, vol. 75, no. 9001, pp. 36–42. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.036137>
5. Johnson R. T. Prion diseases. *Lancet Neurology*, vol. 4, no. 10, pp. 635–642. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(05\)70192-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(05)70192-7)
6. Prusiner S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, vol. 216, no. 4542, pp. 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
7. Steckmann T. Y., Bhandari R., Chapagain P. P., Gerstman B. S. Cooperative structural transitions in amyloid-like aggregation. *Journal of Chemical Physics*, 2017, vol. 146, no. 13, p. 135103. <https://doi.org/10.1063/1.4979516>
8. Chou P. Y., Fasman G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. New York, 1978, vol. 47, pp. 145–148.
9. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Stozharov A. N., Khrustaleva T. A. Stability of alpha-helical and beta-structural blocks in proteins of four structural classes. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 4, pp. 391–400 (in Russian).
10. Khrustalev V. V., Poboinev V. V., Khrustaleva T. A. Features of amino acid composition of beta-strands in proteins of different structural classes. *Fundamental'naya nauka v sovremennoi meditsine: materialy satellitnoi distantsionnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov i molodykh uchenykh (Minsk, 3 marta 2017 goda)* [Fundamental science in modern medicine: materials of the satellite remote scientific-practical conference of students and young scientists (Minsk, March 3, 2017)]. Minsk, 2017, pp. 331–336 (in Russian).
11. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 1, pp. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
12. Aurora R., Rose G. D. Helix capping. *Protein Science*, 1998, vol. 7, no. 1, pp. 21–38. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070103>
13. Khrustalev V. V., Barkovsky E. V., Khrustaleva T. A. The influence of flanking secondary structures on amino acid content and typical lengths of 3/10 helices. *International Journal of Proteomics*, 2014, vol. 2014, art. ID 360230. <https://doi.org/10.1155/2014/360230>
14. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A. Features of amino acid composition of alpha-helical regions in proteins of different structural classes. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 58–66 (in Russian).
15. Baldwin R. L., Rose G. D. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, vol. 24, no. 5, pp. 77–83. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01345-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01345-0)
16. Abrusán G., Marsh J. A. Alpha helices are more robust to mutations than beta strands. *PLoS Computational Biology*, 2016, vol. 12, no. 12, p. e1005242. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005242>
17. Zhang X., Gureasko J., Shen K., Cole P. A., Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 2006, vol. 125, no. 6, pp. 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.013>

18. Krupa P., Sieradzan A. K., Mozolewska M. A., Li H., Liwo A., Scheraga H. A. Dynamics of disulfide-bond disruption and formation in the thermal unfolding of ribonuclease A. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017, vol. 13, no. 11, pp. 5721–5730. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00724>

19. Andrianov A. M., Nikolaev G. I., Kashin I. A., Tuzikov A. V. Development of potential inhibitors of HIV-1 in silico methods of click-chemistry and molecular modeling. *Matematicheskaya biologiya i bioinformatika* [Mathematical biology and bioinformatics], 2018, vol. 13, no. 2, pp. 507–525 (in Russian).

Информация об авторах

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

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

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

Стожаров Александр Николаевич – профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: stojarov@mail.ru

Information about the authors

Victor V. Poboinev – Postgraduate student, assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dremozzew@mail.ru

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

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

Aliaksandr N. Stazharau – Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: stojarov@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 631.95:628.381.4
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-338-349>

Поступила в редакцию 21.02.2019
Received 21.02.2019

О. Е. Чезлова, А. А. Волчек

Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси, Брест, Республика Беларусь

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ СТОКОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ИХ ВНЕСЕНИЯ НА ЛУГОПАСТБИЩНЫЕ ТРАВЫ

Аннотация. Утилизация животноводческих стоков, имеющих высокий инфекционный потенциал, на полях орошения ведет к длительному бактериальному загрязнению природных компонентов, в том числе растительной продукции. В мелкочаечном полевом эксперименте оценена выживаемость санитарно-показательных бактерий в пастбищных травах при нормах полива их стоками свиного комплекса 270, 180 и 90 м³/га. Выявлено, что бактериальное обсеменение растений находится в прямой зависимости от нормы полива сточными водами (СВ). Так, через 21 день после полива наибольшее количество бактерий группы кишечной палочки и энтерококков при норме полива СВ 270 м³/га составило 6,5·10² и 1,6·10³ КОЕ/г; при норме 180 м³/га – 10² и 5,5·10²; при норме 90 м³/га – 55 и 3,5·10² КОЕ/г соответственно. Через 10 дней при норме полива СВ 270 м³/га *E. coli* сохранялась в растениях, а при нормах полива 180 и 90 м³/га отсутствовала. Через 21 день данный микроорганизм отсутствовал в растениях во всех вариантах опыта. Для показателей *E. coli*, общего микробного числа (ОМЧ), энтерококков адекватна модель экспоненциального отмирания бактерий в растениях в зависимости от времени после полива СВ. По скорости отмирания микроорганизмы распределились следующим образом (в сторону убывания): *E. coli* ($k = 48 \text{ день}^{-1}$), ОМЧ ($k = 0,089 - 0,17 \text{ день}^{-1}$), энтерококки ($k = 0,086 - 0,10 \text{ день}^{-1}$). Наименьшим время 10-кратного сокращения числа бактерий было у *E. coli* – 4,76 дня; для энтерококков оно варьировалось от 22,91 до 26,69 дня; для ОМЧ – от 13,37 до 25,77 дня. Полученные уравнения множественной регрессии позволили выявить наиболее значимые факторы, влияющие на численность бактерий, а также прогнозировать ее в рамках созданных моделей.

Ключевые слова: санитарно-показательные бактерии, растения, животноводческие сточные воды

Для цитирования: Чезлова, О. Е. Выживаемость патогенных и условно-патогенных бактерий животноводческих стоков при различных способах их внесения на лугопастбищные травы / О. Е. Чезлова, А. А. Волчек // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 338–349. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-338-349>

O. E. Chezlova, A. A. Volchak

Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Brest, Republic of Belarus

SURVIVAL OF FECAL INDICATOR BACTERIA IN THE GRASS PHILOSPHERE WHEN IRRIGATED WITH LIVESTOCK WASTE WATER

Abstract. In a field experiment, the dying off of sanitary-indicative bacteria in grasses when irrigating them with wastewater of a pig breeding complex was assessed. Watering was carried out with norms of 270, 180 and 90 m³/ha. Bacterial contamination of herbs was directly dependent on the rate of irrigation with wastewater. *E. coli* 10 days after watering with a wastewater norm of 270 m³/ha was preserved in plants, while at a rate of 180 and 90 m³/ha it was absent. After 21 days, this microorganism was absent in plants with all types of irrigation wastewater. For indicators of *E. coli*, the total microbial count (TBC), enterococci is adequate model of the exponential dying of bacteria in plants, depending on the time after watering wastewater. Microorganisms were distributed according to the rate of dying down as follows (in decreasing direction): *E. coli* ($k = 0.48 \text{ day}^{-1}$), TBC ($k = 0.089 - 0.17 \text{ day}^{-1}$), enterococci ($k = 0.086 - 0.10 \text{ day}^{-1}$). The time of a 10-fold reduction in the number of bacteria was smaller for *E. coli* – 4.76 days, for enterococci it varied from 22.91 to 26.69, for TBC – from 13.37 to 25.77 days. The obtained equations of multiple regression allowed to identify the most significant factors influencing the number of bacteria, as well as to predict it within the framework of the models created.

Keywords: sanitari-indicative microflora, livestock wastewater irrigation, plants

For citation: Chezlova O. E., Volchak A. A. Survival of fecal indicator bacteria in the grass phiosphere when irrigated with livestock waste water. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 338–349 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-338-349>

Введение. Жизнеспособность патогенных и условно-патогенных бактерий, попавших в природные и природно-антропогенные экосистемы вследствие внесения навоза и животноводческих сточных вод (СВ), отличается большой вариабельностью [1–7]. Поэтому для оценки фекальных бактерий как возможного звена в передаче возбудителей инфекционных заболеваний необходимо знать сроки их выживания в компонентах окружающей среды. Очевидно, что для предотвращения загрязнения природной среды оросительная норма на сельскохозяйственных полях орошения (ЗПО) должна быть увязана со степенью бактериальной загрязненности животноводческими стоками и временем самоочищения почв, вод и растительной продукции от патогенных микроорганизмов.

Известно, что растениями обычно не обнаруживаются такие патогены человека, как *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria* и др. [8]. Однако зоонозные бактерии могут переноситься с почвой, навозом, компостом, поливной водой, а также насекомыми, дикими или домашними животными и др. [9]. Независимо от источника бактериального загрязнения, кишечные бактерии могут относительно быстро прикрепляться к растущим тканям растений, колонизировать их, сосуществовать с автохтонными эпифитными бактериями и сохраняться в течение длительного времени [10]. Исследования смывов с выращиваемых на ЗПО сельскохозяйственных культур показывают увеличение титра бактерий группы кишечной палочки (БГКП) на 3–4 порядка, в результате чего данный показатель может достигать значения 10^{-2} – 10^{-3} мл, титр *E. coli* и энтерококков – 10^{-2} и 10^{-1} мл соответственно. Общее микробное число (ОМЧ) может возрастать на 1–2 порядка и определяться на уровне $(1,3–1,8) \cdot 10^6$ колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) [11]. На степень бактериологического загрязнения выращиваемых на ЗПО растений влияет не только способность к выживанию отдельных видов микроорганизмов в полевых условиях, но и режим орошения, а также способ внесения жидких стоков. Установлено, что более интенсивное обсеменение трав наблюдается при поверхностном внесении СВ, чем при дождевании и тем более при внутрпочвенном внесении навоза. ОМЧ их может достигать значения $2 \cdot 10^6$ КОЕ/г, титр БГКП и энтерококков – 10^{-4} и 10^{-3} г соответственно [12–14]. По сути, растения и почва являются единым резервуаром, где растительный организм служит звеном, выносящим бактерии из почвы [15]. Так, например, кишечные иерсинии обнаруживаются не только в почве полей орошения, но и в силосе, приготовленном из растений с этих полей [16].

Филлосфера растений не является благоприятной средой для выживания кишечных бактерий. На поверхность листьев воздействуют такие факторы, как ультрафиолетовый свет, перепады температуры и относительная влажность, доступность влаги [17]. Так, установлено, что адгезия болезнетворных микроорганизмов к поверхности растений менее интенсивна при более низких температурах [9]. На выживание бактерий в филлосфере помимо климатических и физических влияют биологические факторы. Так, целый ряд эпифитных микробов препятствует способности кишечных бактерий колонизировать поверхность листьев. А кроме того, на их выживание и рост влияет наличие источников углерода и азота [17]. Одна из стратегий выживания бактериальных клеток на растительной поверхности – образование биопленок. В таком виде существуют от 30 до 80 % эпифитных бактерий. Микроорганизмы, встроенные в матрицу внеклеточных полисахаридов, защищены от высыхания и воздействия антимикробных соединений [18]. Еще одним механизмом защиты от неблагоприятных условий окружающей среды является способность некоторых бактерий проникать внутрь растительных тканей. Она выявлена у многих микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae (иерсиний, клебсиелл, энтеробактеров, серраций и кишечной палочки) [19–22]. Сальмонеллы разных сероваров, источником которых считаются животные, могут размножаться и в растениях [6, 23]. Бактерии получают доступ к внутренним областям листа через устьица, повреждения, действие фитопатогенов и через корневую систему [17]. Непатогенные бактерии (например, *Pantoea agglomerans*) используют преимущественно эпифитный механизм колонизации растений [8].

На данный момент вопросы жизнеспособности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в филлосфере растений, выращиваемых на ЗПО, изучены недостаточно. Игнорирование экологического подхода к утилизации животноводческих стоков, отличающихся высоким

инфекционным потенциалом, ведет к снижению качества продукции растениеводства, опасному биологическому загрязнению экосистем, росту заболеваемости животных и населения [24].

Цель данной работы – оценка бактериологической обсемененности санитарно-показательной микрофлорой многолетних трав при поливе их сточными водами свиноводческого комплекса, а также выявление влияющих на нее факторов.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований являлась растениеводческая продукция, полученная на ЗПО ОАО СГЦ «Западный»: многолетние лугопастбищные травы и их микроорганизмы.

ОАО СГЦ «Западный», являющийся крупным свиноводческим комплексом Брестского района, рассчитанным на выращивание до 90 тыс. голов свиней в год, дает около 400 тыс. м³ стоков.

Исследование проводили в июле–августе 2016 г. Для установления зависимости бактериального загрязнения растений от дозы вносимых стоков был заложен мелкоделяночный полевой опыт. Размер делянки 1 м². Сообщество многолетних трав включало овсяницу тростниковую, ежу сборную, клевер луговой. Почва опытного участка дерново-подзолистая глееватая, на связном песке. Используемые поливные нормы СВ – 90, 180 и 270 м³/га. Контролем служила площадь, где полив СВ не производился. Внесение стоков проводили в июле после второго укоса трав. Пробы растений отбирали до полива, а также через 5, 10 и 21 день после полива СВ. Опыты проводили в двукратной повторности.

Для оценки погодно-климатических факторов использовали данные Брестского областного центра по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Среднесуточная температура воздуха и атмосферные осадки за предшествующие 3 дня перед отбором растительных образцов

Table 1. Average daily air temperature and precipitation over the previous 3 days before sampling of plant samples

Показатель	21.07.2016	26.07.2016	02.08.2016	09.08.2016
Температура, °С	19,0	18,8	22,1	20,5
Осадки, мм	48,3	6,4	4,3	19,2

Содержание бактерий в СВ (КОЕ/100 мл): общие колиформные бактерии – $6,2 \cdot 10^3$, термотолерантные колиформные бактерии – $2,4 \cdot 10^2$, энтерококки – 10^5 ; ОМЧ – $1,5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В поливной воде обнаружены следующие виды бактерий сем. Enterobacteriaceae: *E. coli*, *Citr. freundii*, *Pr. vulgaris* (в титрах 0,001; 0,01; 0,1 мл соответственно).

Для микробиологического анализа в сухую погоду (в утренние часы, после высыхания росы) в стерильные полиэтиленовые пакеты отбирали репрезентативные растительные пробы в количестве 200–500 г, не допуская контаминации их посторонней микрофлорой. В течение 2 ч пробы доставляли в лабораторию и до начала исследования хранили в холодильнике. Срок хранения – не более суток. В дальнейшем исследуемый материал тщательно перемешивали, используя стерильный инструмент, и измельчали на кусочки длиной около 1 см, навеску ($10 \pm 0,01$ г) гомогенизировали, переносили в колбу, добавляли 90 мл стерильного физиологического раствора и обрабатывали на встряхивателе в течение 5 мин. Из полученной таким образом исходной суспензии готовили серии десятичных разведений для посева на питательные среды. Бактериологический анализ осуществляли по стандартным методикам.

БГКП определяли методом прямого посева суспензий на поверхность среды Эндо. Чашки с посевами инкубировали 18–24 ч при температуре среды 37 ± 1 °С. При росте колоний (окрашивание в малиновый цвет с металлическим блеском или без него, а также в красный или розовый) проводили микроскопию колоний с последующей постановкой оксидазного теста. При обнаружении грамотрицательных оксидазоотрицательных палочек по 2–3 колонии каждого типа засеивали полужидкую среду с лактозой для подтверждения ферментации лактозы при температуре 37 ± 1 °С. Для выявления термотолерантных форм БГКП дополнительно термостатировали посева при 44 ± 1 °С. Через 18 ч инкубации проводили учет. Наличие кислоты и газа свидетель-

ствовало о присутствии бактерий группы кишечной палочки. При наличии только кислоты пробирки оставляли в термостате еще на 24 ч, после чего при отсутствии газообразования результат учитывали как отрицательный.

Определение видового состава условно-патогенных бактерий семейства Enterobacteriaceae проводили традиционным методом бактериологического анализа. Выросшие на плотных питательных средах энтеробактерии отсеивали на комбинированную среду Клиглер (по 3–5 однотипных колоний) для первичной дифференциации и накопления культуры. На заключительном этапе осуществляли окончательную дифференциацию по комплексу биохимических признаков [25].

Для определения наличия энтерококков делали прямой посев суспензий на плотную селективную среду (энтерококкагар). Чашки инкубировали 44–48 ч при температуре 37 ± 1 °С. При отсутствии роста микрофлоры посева считали отрицательными. При росте культуры для подтверждения наличия энтерококков делали каталазный тест и микроскопию окрашенных по Граму мазков.

Метод определения ОМЧ основан на выявлении и количественном подсчете всех выросших колоний микроорганизмов на мясопептонном агаре (МПА), при культивировании посевов в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 24 ч и пересчете их количества на 1 г зеленой массы растений.

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам [26].

Для аппроксимации 1-го порядка ординаты концентраций бактерий преобразованы в натуральные логарифмы и подобраны как функция линейной регрессии от времени в соответствии с уравнением отмирания 1-го порядка [27, 28]:

$$N_{\tau} = N_0 \exp(-k\tau), \quad (1)$$

где N_{τ} – количество бактерий в момент времени τ ; N_0 – количество бактерий в начальный момент времени; k – константа отмирания 1-го порядка (день⁻¹); τ – ордината времени (день).

В дальнейшем для выявления факторов, влияющих на изменение числа бактерий в зеленой массе растений, был проведен множественный корреляционно-регрессионный анализ. Принятая модель множественной регрессии оценивалась как

$$\hat{Y} = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n, \quad (2)$$

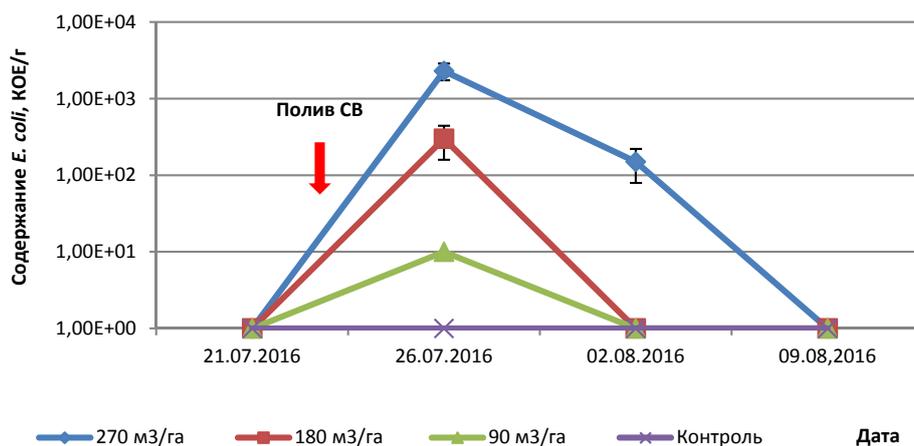
где \hat{Y} – предсказанное значение численности бактерий; a – отрезок, отсекаемый на оси y ; x_1, x_2, x_n – независимые факторы; b_1, b_2, b_n – частные коэффициенты регрессии [26].

Для множественной регрессии данные численности бактерий N были трансформированы в $\lg N$ (массивы данных, в составе которых присутствовали нулевые значения, трансформировались в $\lg(N + 1)$). На следующем этапе оценивали взаимосвязь независимых факторов с результирующей переменной (численность бактерий) с помощью корреляционной матрицы. При наличии коллинеарных факторов для дальнейшей работы использовали тот, который имел наименьшие коэффициенты корреляции с другими регрессорами. В уравнении множественной регрессии оставляли независимые переменные, константы при которых были статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение. До полива стоками БГКП в растениях не обнаруживались (<10 КОЕ/г). Общее количество сапрофитов (ОМЧ) определялось на уровне от $2,50 \cdot 10^5$ до $3,85 \cdot 10^5$ КОЕ/г, энтерококков – от 10^2 до $4 \cdot 10^2$ КОЕ/г, лактозоотрицательных энтеробактерий – от $2,05 \cdot 10^4$ до $3,45 \cdot 10^4$ КОЕ/г. Следует отметить, что до полива СВ в растениях обнаруживался только один представитель энтеробактерий – *Pantoea agglomerans*, который, по всей видимости, является типичным для эпифитной микрофлоры многолетних трав данного участка.

После внесения стоков травы всех политых СВ участков содержали *E. coli* (рис. 1). Выделенные штаммы обнаруживали термотолерантные свойства (способность к росту и ферментации лактозы при 44 °С), что согласовалось с качеством стоков для полива, так как в них данный микроорганизм встречался до титра 0,001 мл и также обладал термотолерантностью.

Через 5 дней после полива СВ содержание *E. coli* в зеленой массе растений (КОЕ/г) возросло при норме 270 м³/га до $2,3 \cdot 10^3$, при норме 180 м³/га – до $3 \cdot 10^2$, при норме 90 м³/га – до 10.

Рис. 1. Содержание *E. coli* в зеленой массе растений после полива СВFig. 1. The content of *E. coli* in the green mass of plants after irrigation with wastewater

Через 10 сут данный вид энтеробактерий не обнаруживался в растениях при нормах 180 и 90 м³/га, а при норме 270 м³/га оставался на уровне 1,5·10² КОЕ/г. К 21-му дню после полива СВ данный вид был полностью элиминирован из зеленой массы растений при всех нормах полива. Этот факт необходимо учитывать при назначении карантинного срока перед скармливанием животным зеленого корма.

Динамика БГКП во многом была обусловлена динамикой *E. coli* (рис. 2). Так, через 5 дней наблюдался скачок количества микроорганизмов данной группы: при норме полива СВ 270 м³/га значение показателя увеличилось на 3 порядка и достигло значения 2,3·10³ КОЕ/г, при норме полива 180 м³/га – на 2 порядка и составило 3·10² КОЕ/г, при норме полива 90 м³/га – на 2 порядка и достигло значения 1,1·10² КОЕ/г. Выделенные лактозоположительные энтеробактерии в основном были представлены видом *E. coli*. При использовании нормы 90 м³/га также был выделен *Citrobacter spp.*

Через 10 дней наблюдался спад количества бактерий данной группы. Так, количество БГКП при нормах 180 и 90 м³/га снизилось в 55 и 18 раз соответственно, приблизившись к значению в контроле (<10 КОЕ/г). При норме 270 м³/га снижение произошло в 4,6 раза. Однако количество данных бактерий оставалось достаточно высоким – 5·10² КОЕ/г. БГКП сохраняли термотолерантные свойства. Через 21 день наблюдался вторичный рост БГКП в зеленой массе трав по всем опытным делянкам: при норме 270 м³/га – до 6,5·10² КОЕ/г, при норме 180 м³/га – до 10², при норме 90 м³/га – до 55 КОЕ/г. Однако к данному сроку *E. coli* в растениях отсутствовали, обнаруживались только *Citrobacter spp.* Рост показателя БГКП, возможно, обусловлен трансформацией

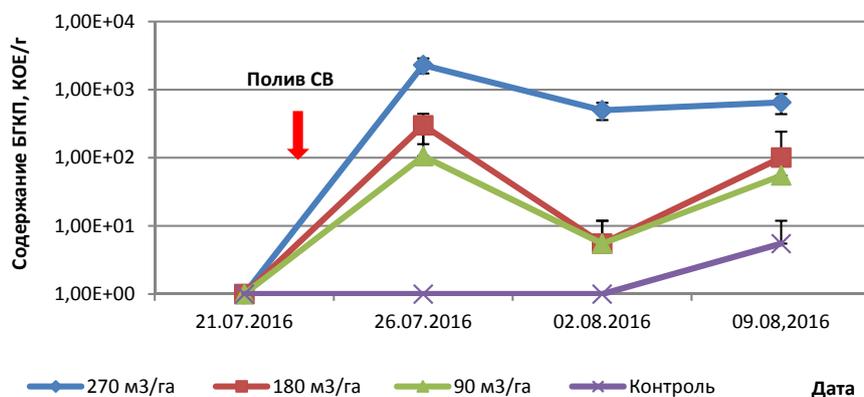


Рис. 2. Содержание БГКП в зеленой массе растений после полива СВ

Fig. 2. The content of coliform bacteria in the green mass of plants after watering wastewater

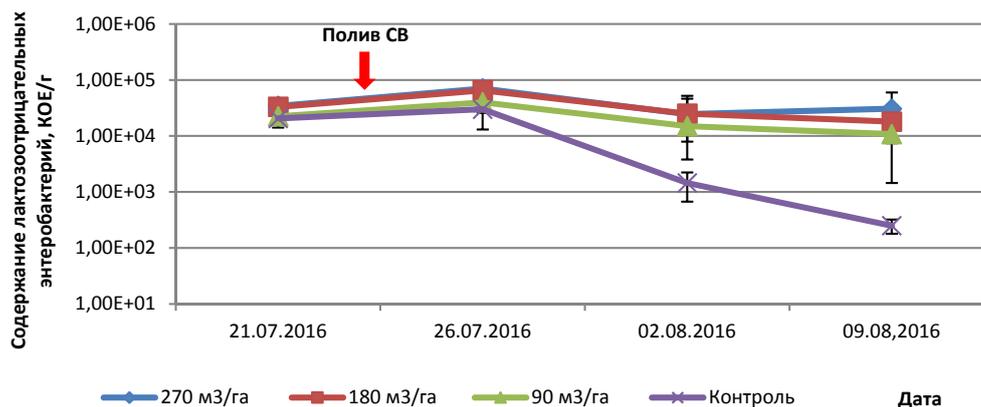


Рис. 3. Содержание лактозоотрицательных энтеробактерий в зеленой массе растений после полива СВ

Fig 3. The content of lactose-negative enterobacteria in the green mass of plants after watering wastewater

ферментативных свойств бактерий стоков в условиях полей (в частности, *E. coli*), на что указывают некоторые ученые [29], а также развитием автохтонных лактозоположительных колиформ. Для выяснения данного предположения необходимо привлечение молекулярно-генетических методов исследования. В сравнении с контролем к 21-му дню после внесения стоков наблюдался рост показателя в 118, 18 и 10 раз при нормах 270, 180, 90 м³/га соответственно.

Присутствие в стоках значительного количества лактозоотрицательных энтеробактерий обусловило исследование их динамики в травах. Через 5 дней после полива СВ данные микроорганизмы демонстрировали увеличение количества в сравнении с контролем: при норме 270 м³/га – в 2,35 раза, при норме 180 м³/га – в 2,18, при норме 90 м³/га – в 1,33 раза (рис. 3). К 11-му дню после полива СВ количество лактозоотрицательных представителей сем. Enterobacteriaceae в растительных пробах снизилось при всех вариантах полива СВ от 1,4 до 2,2 раза, приблизившись к значениям показателя до полива. К 21-му дню количество данных бактерий в растениях политых делянок менялось незначительно, оставаясь ниже, чем до полива СВ, в 1,1–2,08 раза. Тем временем в контрольных растениях отмечалось снижение в 82 раза. К 21-му дню после внесения СВ содержание энтеробактерий в филлосфере трав со внесенными стоками превышало их значение в контроле в 43–123 раза. Данная группа была представлена только одним видом – *Pantoea agglomerans*.

По всей видимости, поступление питательных веществ со стоками вызвало рост аборигенных представителей данного вида. Характерные для СВ лактозоотрицательные энтеробактерии рода *Proteus* отсутствовали.

Показатель ОМЧ через 5 дней после полива стоками составил 2,35·10⁶ (при норме 270 м³/га), 1,85·10⁶ (при норме 180 м³/га) и 5,3·10⁵ КОЕ/г (при норме 90 м³/га), что превышало его значение в контроле в 5,7; 4,5; 1,3 раза соответственно (рис. 4).

Количество сапрофитов при нормах 270, 180 м³/га к 11-му дню после полива СВ в растениях сократилось в 3–3,6 раза. При норме 90 м³/га оно сохранялось на том же уровне. К 21-му дню после полива значение ОМЧ в растениях при норме полива СВ 270 м³/га оставалось повышенным в сравнении с периодом до полива в 1,6 раза, при нормах 180 и 90 м³/га снизилось в 3,3 и 1,9 раза соответственно. В сравнении с контролем количество сапрофитов было выше в 11; 2,6; 3 раза при нормах полива 270, 180 и 90 м³/га соответственно.

Через 5 дней количество энтерококков в зеленой массе растений при нормах полива 270, 180 и 90 м³/га увеличилось в 22; 7,7; 3,6 раза соответственно, достигнув значений 7,55·10³, 2,7·10³, 1,25·10³ КОЕ/г (рис. 5).

На 11-й день произошло снижение количества энтерококков в 4,9 (при норме 270 м³/га), 3 (при норме 180 м³/га) и 1,4 раза (при норме 90 м³/га), что превышало значение показателя в контроле в 3,9; 3,3; 2,2 раза соответственно. Однако в травах контрольных делянок данный показатель также возрос и обнаруживался на уровне 4·10² КОЕ/г, что связано, по-видимому, со снижением иммунитета растений после укуса.

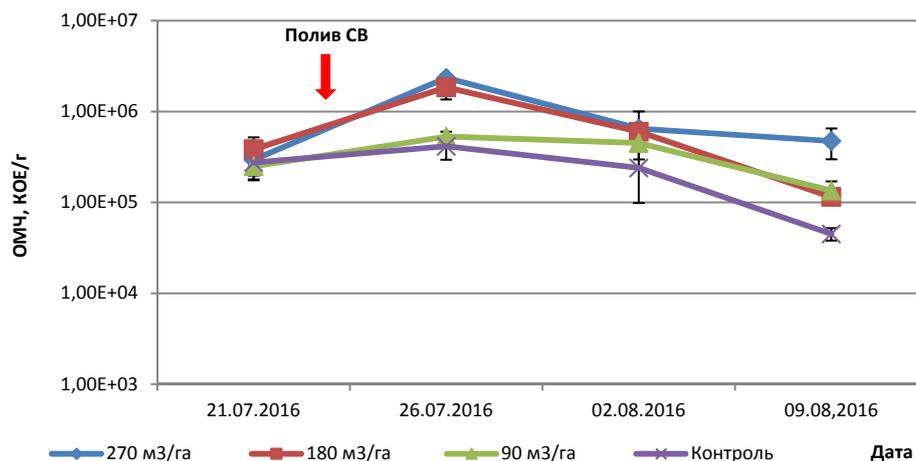


Рис. 4. ОМЧ зеленой массы растений после полива СВ

Fig. 4. Total bacterial count of green mass of plants after watering wastewater

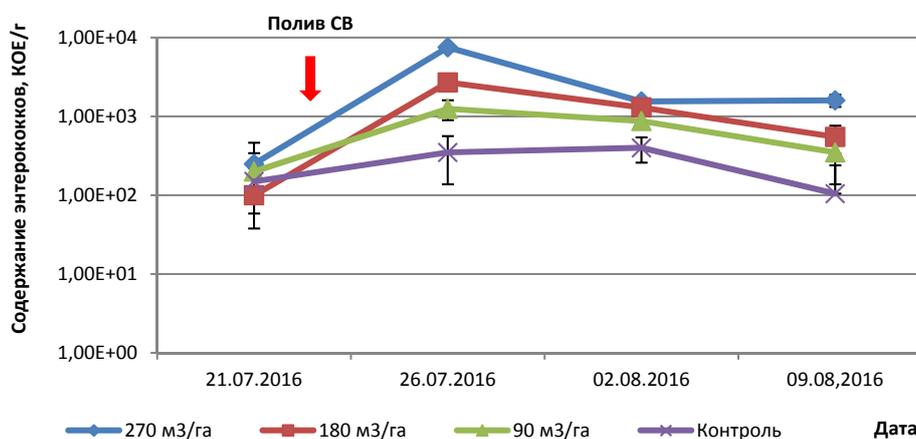


Рис. 5. Содержание энтерококков в зеленой массе растений после полива СВ

Fig. 5. The content of enterococci in the green mass of plants after watering wastewater

К 21-му дню после полива СВ при норме полива 270 м³/га количество энтерококков практически осталось на том же уровне ($1,6 \cdot 10^3$ КОЕ/г), превышая их количество до полива в 6,4 раза. При нормах полива 180 и 90 м³/га произошло снижение показателя до $5,5 \cdot 10^2$ и $3,5 \cdot 10^2$ КОЕ/г соответственно, что превышало количество энтерококков до полива в 5,5 и 1,75 раза. В сравнении с контролем количество энтерококков было выше в 15, 5 и 3 раза при нормах 270, 180 и 90 м³/га соответственно.

Аппроксимация 1-го порядка позволила оценить скорость отмирания исследуемой микрофлоры растений и рассчитать время 10-кратного сокращения их численности (так называемое *D*-значение). *D*-значение, или «время десятичного сокращения», – это время, необходимое для достижения гибели 90 % (или 1 lg) бактерий при определенном наборе условий [30]. Модель экспоненциального отмирания во времени оказалась адекватной для показателей *E. coli*, энтерококков и ОМЧ, но не для БГКП и лактозоотрицательных энтеробактерий, у которых наблюдался повторный рост (см. рис. 2, 3). Параметры полученных моделей в соответствии с формулой (1) и расчеты на их основе отражены в табл. 2.

Для выявления факторов, влияющих на изменение числа санитарно-показательных бактерий в зеленой массе растений, проведен множественный корреляционно-регрессионный анализ и получены уравнения регрессии в соответствии с формулой (2). Независимые факторы, значения которых использовали для построения моделей, приведены в табл. 3.

В табл. 4 приведены полученные уравнения зависимости.

Таблица 2. Коэффициенты скорости отмирания (k) и D -значения *E. coli*, энтерококков и ОМЧ

Table 2. Die-off rate coefficients and D -values *E. coli*, enterococci and TBC

Норма полива СВ, м ³ /га	N_0 , КОЕ/г	k , день ⁻¹	R^2	Значимость F -критерия	D -значения, дни
<i>E. coli</i>					
270	26 800	0,48	0,99	0,00001	4,76
<i>Энтерококки</i>					
270	7748	0,087	0,60	0,07*	26,43
180	4226	0,010	0,92	0,002	22,91
90	2014	0,086	0,77	0,02	26,69
<i>ОМЧ</i>					
270	2 767 016	0,094	0,66	0,05	24,40
180	4 152 163	0,17	0,98	0,0001	13,37
90	932 104	0,089	0,82	0,012	25,77

Примечание. * – превышение заданного уровня $\alpha = 0,05$.

Таблица 3. Независимые факторы, используемые при построении регрессионных моделей

Table 3. Independent factors used in the construction of regression models

Независимый фактор	Обозначение в уравнении множественной регрессии
Объем внесенных стоков, м ³ /га	$V_{ст}$
Среднесуточная температура воздуха за предыдущие 3 дня, °С	t
Среднесуточные атмосферные осадки за предыдущие 3 дня, мм	p
Время после полива, дни	τ

Таблица 4. Модели показателей бактериальной обсемененности растений

Table 4. Models of indicators of bacterial contamination of plants

Показатель	Уравнение регрессии	Коэффициент детерминации	Значимость F -критерия
<i>E. coli</i>	$N_{E. coli} = 10^{0,009V_{ст} - 0,052\tau}$	0,66	0,0006
	$N_{E. coli} = 10^{0,008V_{ст} - 0,03\tau^2}$	0,69	0,0003
БГКП	$N_{БГКП} = 10^{0,01V_{ст}}$	0,90	1,4E-08
Энтеробактерии лактозоотрицательные	$N_{ЭБлак-} = 10^{4,37+0,004V_{ст} - 0,06\tau}$	0,67	0,0007
ОМЧ	$N_{ОМЧ} = 10^{4,02+0,003V_{ст}+0,08\tau-0,04\tau^2}$	0,91	1,08E-06
Энтерококки	$N_{энт} = 10^{0,004V_{ст}+0,13\tau-0,015\tau^2}$	0,998	2,75E-16

Для показателя *E. coli* лучшим приближением аналитических данных была модель экспоненциального отмирания бактерий со временем (см. табл. 2). Для нормы полива СВ 270 м³/га получено уравнение с высоким качеством аппроксимации ($R^2 = 0,99$, значимость F -критерия Фишера – 0,00001). При меньших нормах полива число определяемых бактерий было очень малым (на границе чувствительности метода), что затрудняло построение моделей. Однако аналогичный характер динамики кишечной палочки в растениях при применении всех норм позволял считать модель, полученную при норме полива СВ 270 м³/га, репрезентативной для меньших норм. Исходя из полученного уравнения, коэффициент отмирания k равен 0,48 день⁻¹, а для 90 %-ной элиминации бактерий требовалось 4,76 дня. Таким образом, ограниченное количество питательных элементов, воздействие инсоляции способствовали достаточно быстрому отмиранию *E. coli* в растительных образцах.

Уравнение множественной линейной регрессии описывало динамику *E. coli* со средним качеством – 66 % вариации показателя объяснялось с помощью уравнения регрессионной зависимости. Наиболее значимым фактором, исходя из оценки *t*-статистики его коэффициента в уравнении регрессии, являлось внесение стоков. Из модели следует, что в каждый момент времени увеличение объема внесенных стоков на 1 м³/га приведет к повышению содержания *E. coli* в растительной продукции на 0,009 lg (1,021) КОЕ/г. Градиент уменьшения количества данных бактерий со временем составил 0,052 lg (1,127) КОЕ/г в день (при фиксированной норме полива СВ). Использование в уравнении регрессии переменной времени τ более высокого порядка (τ^2), позволяющее отразить нелинейность исследуемой связи, дало возможность получить уравнение с большим коэффициентом детерминации R^2 (0,69), однако качество полученной зависимости уступало качеству экспоненциальной модели (табл. 4).

Уравнение множественной регрессии для БГКП содержало только один значимый параметр – объем внесенных стоков (табл. 4). Коэффициент детерминации (R^2) полученной зависимости был высоким – 0,91. Исходя из данной модели, увеличение поливной нормы на 1 м³/га приведет к возрастанию показателя на 0,01 lg КОЕ/г (т. е. увеличение нормы полива СВ на 100 м³/га в рамках исследуемой модели приведет к возрастанию в 10 раз количества БГКП в растительной продукции).

Оценка качества уравнения множественной регрессии для лактозоотрицательных энтеробактерий позволила сделать вывод о меньшей его зависимости от выбранных независимых факторов. Исходя из уравнения, увеличение объема внесенных стоков на 1 м³/га приведет к увеличению содержания лактозонегативных форм энтеробактерий в растительной продукции на 0,001 lg (1,002) КОЕ/г (при неизменном времени). Наблюдалась положительная коррелятивная связь с фактором времени – по мере удаления от момента полива СВ количество данных бактерий увеличивалось. В отсутствии полива СВ количество энтеробактерий, не ферментирующих лактозу, составит 4,37 lg (2,34·10⁴) КОЕ/г, о чем свидетельствует наличие свободного члена в уравнении. Достоверные связи со среднесуточной температурой воздуха и атмосферными осадками за предшествующие 3 дня отсутствовали (табл. 4).

Характер динамики сапрофитов (показатель ОМЧ) (рис. 4) позволял описать ее с помощью модели линейной регрессионной зависимости от времени. Исходя из полученного уравнения, скорость отмирания мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) варьировалась от 0,089 до 0,17 день⁻¹, причем большей она оказалась при норме полива СВ 180 м³/га. Количество дней, необходимых для 10-кратного снижения численности данной группы бактерий, находилось в диапазоне от 13,37 до 25,77 дней (см. табл. 2). С помощью множественного регрессионного анализа получено уравнение, в число независимых факторов которого помимо таких показателей, как объем внесенных стоков и время после полива СВ, вошел фактор температуры за предыдущие 3 дня (табл. 4). Исходя из полученной зависимости, увеличение объема полива на 1 м³/га приведет к увеличению содержания сапрофитов в растительной продукции на 0,003 lg (1,007) КОЕ/г (при неизменных времени и температуре). Фактор температуры за предыдущие 3 дня имел положительную коррелятивную связь с результирующей переменной – увеличение температуры на 1 °С приводило к возрастанию показателя ОМЧ на 0,08 lg (1,202) КОЕ/г в рамках модели. С фактором времени наблюдалась отрицательная корреляционная связь – с каждым днем после полива происходило снижение показателя на 0,04 lg (1,096) КОЕ/г.

С помощью аппроксимации 1-го порядка в отношении энтерококков получены уравнения зависимости со средней и высокой точностью приближения ($R^2 = 0,60–0,92$). Скорость отмирания данного фекального индикатора варьировалась от 0,086 до 0,10 день⁻¹, а количество дней для 10-кратного снижения числа бактерий – от 22,91 до 26,69 (см. табл. 2). Проведенный множественный регрессионный анализ позволил увеличить точность аппроксимации: полученное трехфакторное уравнение регрессии выражало 99,8 % вариации зависимой переменной, а значимость *F*-критерия Фишера была значительно ниже заданного уровня значимости $\alpha = 0,05–2,75 \text{ E-}16$. В данном уравнении также помимо связи с факторами внесения стоков и времени имелась достоверная связь с положительным знаком фактора средней температуры за предшествующие 3 дня.

Таким образом, при неизменности других факторов увеличение объема полива СВ на 1 м³/га приводило к увеличению содержания энтерококков в растительной продукции на 0,004 lg (1,009) КОЕ/г; увеличение температуры на 1 °С – к возрастанию количества энтерококков на 0,08 lg (1,202) КОЕ/г; увеличение времени после полива на 1-й день – к уменьшению показателя на 0,015 lg (1,035) КОЕ/г в рамках созданной модели (табл. 4).

Выводы

1. Количество санитарно-показательной микрофлоры трав после полива стоками свиного комплекса находится в прямой зависимости от нормы СВ. Так, через 21 день количество бактерий при нормах полива СВ 270, 180, 90 м³/га в сравнении с контролем возрастало для показателя БГКП в 118, 18 и 10 раз, для энтерококков – в 15, 5 и 3 раза, для ОМЧ – в 11; 2,6; 3 раза соответственно. *E. coli* через 10 дней после полива СВ при норме 270 м³/га сохранялась в растениях на уровне 1,5·10² КОЕ/г, а при нормах 180 и 90 м³/га отсутствовала. Через 21 день данный микроорганизм отсутствовал в растениях при всех вариантах полива СВ. Этот факт необходимо учитывать при назначении карантинного срока перед стравливанием животным зеленого корма.

2. Для *E. coli*, ОМЧ, энтерококков адекватна модель экспоненциального отмирания бактерий в растениях после полива СВ. По скорости отмирания микроорганизмы распределились следующим образом (в сторону убывания): *E. coli* ($k = 0,48$ день⁻¹), МАФАНМ ($k = 0,089–0,17$ день⁻¹), энтерококки ($k = 0,086–0,10$ день⁻¹). Время 10-кратного сокращения числа бактерий было меньше у *E. coli* – 4,76 дня, для энтерококков оно варьировалось от 22,91 до 26,69 для ОМЧ – от 13,37 до 25,77 дня.

3. Созданные стохастические регрессионные модели динамики санитарно-показательной микрофлоры в зеленой массе многолетних трав после полива СВ свиноводческого комплекса позволили выявить наиболее значимые факторы, влияющие на численность бактерий, а также прогнозировать ее в рамках созданных моделей.

Список использованных источников

1. Гончарук, Е. И. Санитарно-бактериологическая оценка почвенной очистки сточных вод свиноводческого комплекса / Е. И. Гончарук, Г. А. Багдасарян, А. К. Баубинас // Гигиена и санитария. – 1980. – № 10. – С. 86–88.
2. Microbial pathogen survival study in a high plains feedyard playa / C. W. Purdy [et al.] // Texas J. Sci. – 2001. – Vol. 53, N 3. – P. 247–266.
3. Duffy, G. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries / G. Duffy // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 94, N s1. – P. 94–103. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x>
4. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories / A. V. Semenov [et al.] // Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 10, N 6. – P. 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01558.x>
5. A glimpse of *Escherichia coli* O157:H7 survival in soils from eastern China / H. Wang [et al.] // Sci. Total Environ. – 2014. – Vol. 476–477. – P. 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.004>
6. An outbreak of Salmonella saint-paul infection associated with bean sprouts / M. J. O'Mahony [et al.] // Epidemiol. Infection. – 1990. – Vol. 104, N 2. – P. 229–235. <https://doi.org/10.1017/s0950268800059392>
7. Berg, G. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria / G. Berg, L. Eberl, A. Hartmann // Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 7, N 11. – P. 1673–1685. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>
8. Хуснетдинова, К. А. Структура сообществ эпифитных бактерий культурных и сорных растений : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / К. А. Хуснетдинова ; Моск. гос. ун-т. – М., 2017. – 27 с.
9. Yaron, S. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence / S. Yaron, U. Römling // Microb. Biotechnol. – 2014. – Vol. 7, no. 6. – P. 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>
10. Solomon, E. B. Microbial attachment and limitations of decontamination methodologies / E. B. Solomon, M. Sharma // Produce contamination problem: causes and solutions / ed. : E. B. Slomon, G. M. Sapers K. R. Matthews. – Amsterdam ; Boston, 2009. – P. 21–45.
11. Суржко, О. А. Обоснование методологии экологически безопасной подготовки и утилизации жидких отходов предприятий агропромышленного комплекса : дис. ... д-ра техн. наук : 25.00.26 / О. А. Суржко. – Новочеркасск, 2003. – 390 с.
12. Захарова, О. А. Орошение серых лесных почв сточными водами свиного комплекса : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.02 / О. А. Захарова ; Ряз. гос. сельхоз. акад. – Рязань, 1998. – 21 с.
13. Максимовский, Н. С. Очистка сточных вод / Н. С. Максимовский. – М. : Изд-во М-ва коммун. хоз-ва РСФСР, 1961. – 352 с.

14. Тимченко, И. И. Использование сточных вод животноводческих комплексов на орошение / И. И. Тимченко, В. А. Калачиков // Охрана воды от загрязнения ядохимикатами и удобрениями : тез. докл. всесоюз. науч.-техн. совещания «Охрана воды от загрязнения ядохимикатами и удобрениями», 28–30 сент. 1976 г. – Краснодар ; Москва, 1976. – С. 103–105.
15. Литвин, В. Ю. Патогенные бактерии общие для человека и растений: проблема и факты / В. Ю. Литвин, Е. Н. Емельяненко, В. И. Пушкарева // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1996. – № 2. – С. 101–104.
16. Гордейко, В. А. Пути циркуляции и эпидемиологическое значение иерсиний в агроценозе : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.30 / В. А. Гордейко ; НИИ эпидемиологии и микробиологии. – М., 1990. – 22 с.
17. Matthews, K. R. Leafy vegetables / K. R. Matthews // Produce contamination problem: causes and solutions / ed. : E. B. Slomon, G. M. Sapers, K. R. Matthews. – Amsterdam ; Boston, 2009. – P. 165–187.
18. Biofilms in fresh fruit and vegetables / В. А. Annous [et al.] // Biofilms in the Food and Beverage Industries / ed. : P. M. Fratamico, В. А. Annous, N. W. Guenther. – Boca Raton, 2009. – P. 517–535.
19. Бирюкова, О. В. Эндобитная ризобактерия *Klebsiella planticola*, взаимодействие с растением и ценозом микромицетов в фитоплане и ризосфере : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / О. В. Бирюкова ; Моск. с.-х. акад. – М., 2001. – 22 с.
20. Гордейко, В. А. Цепь циркуляции иерсиний в агроценозе и эпидемиологическое ее проявление // Потенциально патогенные бактерии в природе : сб. науч. тр. / редкол. : В. Ю. Литвин (отв. ред.) [и др.]. – М., 1991. – С. 75–85.
21. Люлин, С. Ю. Микробные сообщества городских почв и влияние поллютантов на популяцию *Escherichia coli* в системе почва – растение : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / С. Ю. Люлин ; Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева. – М., 2001. – 24 с.
22. Маркова, Ю. А. Растения как экологическая ниша патогенных для человека бактерий / Ю. А. Маркова, А. Л. Турская // Политем. сетевой электрон. науч. журн. Кубан. гос. аграр. ун-та, 2012. – № 84. – С. 87–101.
23. Asplund, K. The growth of salmonellae in tomatoes / K. Asplund, E. Nurmi // Int. J. Food Microbiol. – 1991. – Vol. 13, N 2. – P. 177–182. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90059-x](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90059-x)
24. Тарасов, С. И. Актуальные направления исследований По экологически безопасному использованию бесподстилочного навоза. Сообщение I. Актуальные вопросы нормативного регулирования обращения с бесподстилочным навозом / С. И. Тарасов, Г. Е. Мерзлая, А. С. Максимова // Плодородие. – 2018. – № 5. – С. 39–41.
25. Инструкция по применению № 026–0309 Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями : утв. Гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь 08.05.2009 г. – Минск, 2009. – 103 с.
26. Статистические методы в природопользовании : учеб. пособие / В. Е. Валуев [и др.]. – Брест : Брест. политехн. ин-т, 1999. – 251 с.
27. Crane, S. R. Modeling enteric bacterial die-off: A review / S. R. Crane, J. A. Moore // Water Air Soil Poll. – 1986. – Vol. 27, N 3–4. – P. 411–439. <https://doi.org/10.1007/BF00649422>
28. Gene expression during survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water / A. D. Duffitt [et al.] // Int. J. Microbiol. – 2011. – Vol. 2011. – Art. ID 340506. <https://doi.org/10.1155/2011/340506>
29. Wang, L. Survival of fecal bacteria in dairy cow manure / L. Wang, K. R. Mankin, G. L. Marchin // Trans. ASAE. – 2004. – Vol. 47, N 4. – P. 1239–1246. <https://doi.org/10.13031/2013.16574>
30. Mazzola, P. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes / P. Mazzola, T. C. V. Penna, A. M. da S. Martins // BMC infectious diseases. – 2003. – Vol. 3, N 1. – P. 3–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-3-24>

References

1. Goncharuk E. I., Bagdasaryan G. A., Baubinas A. K. Sanitary and bacteriological assessment of soil wastewater treatment of a pig-breeding complex. *Gigiena i sanitariya* [Hygiene and sanitation], 1980, no. 10, pp. 86–88 (in Russian).
2. Purdy C. W., Straus D. C., Harp J. A., Mock T. J. S. R. Microbial pathogen survival study in a high plains feedyard playa. *Texas Journal of Science*, 2001, vol. 53, no. 3, pp. 247–266.
3. Duffy G. Verocytotoxicogenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, vol. 94, no. s1, pp. 94–103. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x>
4. Semenov A. V., Franz E., van Overbeek L., Aad J., Termorshuizen A. J., van Bruggen A. H. C. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environmental Microbiology*, 2008, vol. 10, iss. 6, pp. 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01558.x>
5. Wang H., Ibekwe A. M., Ma J., Wu L., Lou J., Wu Z., Liu R., Xu J., Yates S. R.. A glimpse of *Escherichia coli* O157:H7 survival in soils from eastern China. *Science of the Total Environment*, 2014, vol. 476–477, pp. 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.004>
6. O'Mahony M., Cowden J., Smyth B., Lynch D., Hall M., Rowe B. [et al.]. An outbreak of *Salmonella saint-paul* infection associated with bean sprouts. *Epidemiology and Infection*, 1990, vol. 104, no. 2, pp. 229–235. <https://doi.org/10.1017/s0950268800059392>
7. Berg G., Eberl L., Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 2005, vol. 7, no. 11, pp. 1673–1685. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>
8. Khusnetdinova K. A. *The structure of communities of epiphytic bacteria of cultivated and weed plants*. Abstract of Ph. D. diss. Moscow, 2017. 27 p. (in Russian).

9. Yaron S., Römling U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology*, 2014, vol. 7, no. 6, pp. 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>
10. Solomon E. B., Sharma M. Microbial attachment and limitations of decontamination methodologies. *Produce contamination problem: causes and solutions*. Amsterdam, Boston, 2009, pp. 21–45.
11. Surzhko O. *A Justification of the methodology for the environmentally safe preparation and disposal of liquid waste from enterprises of the agro-industrial complex*. Ph. D. Thesis. Novocheerkassk, 2003. 390 p. (in Russian).
12. Zakharova O. A. *Irrigation of gray forest soils with wastewater of pig farms*. Abstract of Ph. D. diss. Ryazan, 1998. 21 p. (in Russian).
13. Maksimovskii N. S. *Wastewater treatment*. Moscow, Publishing House of the Ministry of Public Utilities of the RSFSR, 1961. 352 p. (in Russian).
14. Timchenko I. I., Kalachikov V. A. *Wastewater use of livestock farms for irrigation. Okhrana vody ot zagryazneniya yadokhimikatami i udobreniyami: tezisy dokladov vsesoyuznogo nauchno-tekhnicheskogo soveshchaniya (28–30 sentyabrya 1976 goda, Krasnodar)* [Protection of water from pollution by pesticides and fertilizers: theses of reports of the All-Union scientific and technical conference (September 28–30, 1976, Krasnodar)]. Krasnodar, Moscow, 1976, pp. 103–105 (in Russian).
15. Litvin V. Yu., Emel'yanenko E. N., Pushkareva V. I. Pathogenic bacteria common to humans and plants: the problem and the facts. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*, 1996, no. 2, pp. 101–104 (in Russian).
16. Gordeiko V. A. *Circulation paths and the ecidemiological significance of Yersinia in the agrocenosis*. Abstract of Ph.D. diss. Moscow, 1990. 22 p. (in Russian).
17. Matthews K. Leafy vegetables. *Produce contamination problem: causes and solutions*. Amsterdam, Boston, 2009, pp. 165–187.
18. Annous B. A., Smith J. L., Fratamico P. M., Solomon E. B. Biofilms in fresh fruit and vegetables. *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Boca Raton, 2009, pp. 517–535.
19. Biryukova O. V. *Endophytic rhizobacteria Klebsiella planticola, interaction with plant and micromycete cenosis in phytoplankton and rhizosphere*. Abstract of Ph. D. diss. Moscow, 2001. 22 p. (in Russian).
20. Gordeiko V. A. The chain of circulation of Yersinia in the agrocenosis and its epidemiological manifestation. *Potentsial'no patogennyye bakterii v prirode: sbornik nauchnykh trudov* [Potentially pathogenic bacteria in nature: a collection of scientific papers]. Moscow, 1991, pp. 75–85 (in Russian).
21. Lyulin S. Yu. *Microbial communities of urban soils and the influence of pollutants on the population of Escherichia coli in the system soil – plant*. Abstract of Ph. D. diss. Moscow, 2001. 24 p. (in Russian).
22. Markova Yu. A., Turskaya A. L. Plants as an ecological niche of human pathogenic bacteria. *Politematicheskii setevoi elektronnyi nauchnyi zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Polythematic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University], 2012, no. 84, pp. 87–101 (in Russian).
23. Asplund K., Nurmi E. The growth of salmonellae in tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 1991, vol. 13, no. 2, pp. 177–182. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90059-x](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90059-x)
24. Tarasov S. I., Merzlaya G. E., Maksimova A. S. Current research directions on the environmentally sound use of manure-free manure. Report 1. Current issues of regulatory management of manure disposal. *Plodorodiye* [Fertility], 2018, no. 5, pp. 39–41 (in Russian).
25. *Application Instructions No. 026–0309 Microbiological diagnosis of diseases caused by enterobacteria. Approved by the Chief Sanitary State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus 08.05.2009*. Minsk, 2009. 103 p. (in Russian).
26. Valuev V. E., Volchek A. A., Poita P. S., Shvedovskii P. V. *Statistical methods in environmental management: studies manual*. Brest, Publishing house of the Brest Polytechnic Institute, 1999. 251 p. (in Russian).
27. Crane S. R., Moore J. A. Modeling enteric bacterial die-off: a review. *Water Air and Soil Pollution*, 1986, vol. 27, no. 3–4, pp. 411–439. <https://doi.org/10.1007/BF00649422>
28. Duffitt A. D., Reber R. T., Whipple A., Chauret C. Gene expression during survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water. *International Journal of Microbiology*, 2011, vol. 2011, art. ID 340506. <https://doi.org/10.1155/2011/340506>
29. Wang L., Mankin K. R., Marchin G. L. Survival of fecal bacteria in dairy cow manure. *Transactions of the ASAE*, 2004, vol. 47, no. 4, pp. 1239–1246. <https://doi.org/10.13031/2013.16574>
30. Mazzola P., Penna T. C. V., da S. Martins A. M. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. *BMC Infectious Diseases*, 2003, vol. 3, no. 1, pp. 3–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-3-24>

Інфармацыя аб аўтарах

Чезлова Ольга Евгеньевна – науч. сотрудник. Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси (ул. Московская, 204/1-1, 224020, г. Брест, Республика Беларусь). E-mail: olgachezlova@tut.by

Волчек Александр Александрович – д-р геогр. наук, профессор, вед. науч. сотрудник. Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси (ул. Московская, 204/1-1, 224020, г. Брест, Республика Беларусь). E-mail: Volchak@tut.by

Information about the authors

Olga E. Chezlova – Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (204/1-1, Moskovskaya Str., 224020, Brest, Republic of Belarus). E-mail: olgachezlova@tut.by

Alexandr A. Volchak – D. Sc. (Geogr.), Professor, Leading researcher. Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (204/1-1, Moskovskaya Str., 224020, Brest, Republic of Belarus). E-mail: Volchak@tut.by

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 573.6.086.83
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-350-358>

Поступила в редакцию 28.03.2019
 Received 28.03.2019

Т. В. Рябцева¹, Д. А. Макаревич², Е. М. Ермола², В. П. Голубович², В. В. Кирковский¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ И ВИРТУАЛЬНЫЙ ДОКИНГ ОЛИГОПЕПТИДОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ И ЭЛИМИНИРОВАНИЯ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6

Аннотация. Интерлейкин-6 (ИЛ-6) рассматривается в качестве перспективной мишени для разработки противовоспалительной терапии при многих патологических состояниях (сепсис, аутоиммунная патология, аллергические заболевания). Цель данного исследования – разработка и изучение эффективности олигопептидов, предназначенных для связывания ИЛ-6. Для достижения цели были поставлены и успешно решены следующие задачи: на основании изучения трехмерных моделей молекулярных структур ИЛ-6 в комплексе с рецептором к ИЛ-6 и gp130 спрогнозированы структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов; для выявления максимально эффективного олигопептида проведена оценка их свободной энергии связывания с ИЛ-6; изучена эффективность олигопептидов по изменению концентрации ИЛ-6 в модельном растворе после контакта с экспериментальными олигопептидами.

В статье представлены результаты вычисления энергии связывания 62 пептидов, сконструированных с помощью программы PyMol, с ИЛ-6. Энергию связывания олигопептидов с ИЛ-6 рассчитывали в программе Chimera с помощью приложения AutodockVina. Представлены также результаты экспериментов *in vitro*, в которых синтезированные 7 секстапептидов, 2 тетрапептида и 3 трипептида взаимодействовали с рекомбинатным ИЛ-6. Эффективность пептидов рассчитывали по снижению концентрации цитокина в растворе в процентах от исходной концентрации.

Анализ свободной энергии связывания показал, что эффективность связывания увеличивается с возрастанием общего числа аминокислот, в частности ароматических, в олигопептиде. Корреляционный анализ показал, что метод молекулярного моделирования не является абсолютно эффективным для прогнозирования структуры олигопептида, однако может использоваться в качестве одной из предварительных ступеней анализа взаимодействия между молекулами и изучения оптимальных точек их соприкосновения для принятия решения о целесообразности синтеза и дальнейшего исследования лигандов. В результате экспериментов *in vitro* были определены два наиболее перспективных олигопептида для дальнейшего синтеза с целью использования их в качестве лигандов для связывания ИЛ-6 в плазме крови человека.

Ключевые слова: интерлейкин-6, молекулярное моделирование, докинг, пептиды

Для цитирования: Молекулярное конструирование и виртуальный докинг олигопептидов для связывания и элиминирования из плазмы крови интерлейкина-6 / Т. В. Рябцева [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 350–358. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-350-358>

T. V. Ryabzeva¹, D. A. Makarevich², E. M. Ermola², V. P. Golubovich², V. V. Kirkovskiy¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR DESIGN AND VIRTUAL DOCKING OF OLIGOPEPTIDES FOR BINDING AND ELIMINATION INTERLEUKIN-6 FROM BLOOD PLASMA

Abstract. Binding of interleukin-6 (IL-6) is the perspective target for the anti-inflammatory therapy in many pathological conditions (sepsis, autoimmune pathology, allergic diseases). The aim of this work was to develop and study the binding IL-6 oligopeptides. To achieve the goal, were set and successfully solved the following tasks: studying three-dimensional models of molecular structures of IL-6 in combination with the R-IL-6 and gp130, prediction and virtual synthesis low molecular weight oligopeptides; evaluating the free energy of IL-6 binding for identify the most effective oligopeptide; studying the changing the concentration of IL-6 in the model solution after contact with experimental oligopeptides. In the article presents the binding IL-6 energy of 62 peptides, designed using the PyMol. Energy was calculated in the Chimera program using the AutodockVina application. There are also presented results of *in vitro* experiments interacting 7 sextapeptides, 2 tetrapeptides, and 3 tripeptides with recombinant IL-6. The effectiveness of the peptides was calculated by reducing the concentration of cytokine in solution as a percentage of the initial concentration.

The free binding energy has shown that the efficiency of binding increases with an increase in the total number of amino acids and, in particular, of aromatic amino acids in the oligopeptide. Correlation analysis showed that the molecular modeling

method is not absolutely effective for predicting the structure of an oligopeptide, however, it can be used as one of the preliminary steps for analyzing the interaction between molecules and studying the optimal interaction points. Two oligopeptides were identified as the most promising for further synthesis as the ligands for binding and evaluating IL-6 in human blood plasma.

Keywords: interleukin-6, molecular design, docking, peptides

For citation: Ryabzeva T. V., Makarevich D. Al., Ermola E. M., Golubovich V. P., Kirkovskiy V. V. Molecular design and virtual docking of oligopeptides for binding and elimination interleukin-6 from blood plasma. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 350–358 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-350-358>

Введение. Интерлейкин-6 (ИЛ-6) характеризуется широким спектром действия как на клетки иммунной системы, так и на клетки организма в целом, оказывая гормоноподобный эффект и поддерживая гомеостатические процессы. В зависимости от микроокружения данный цитокин может проявлять и про-, и противовоспалительные свойства. В настоящее время ИЛ-6 рассматривается в качестве перспективной мишени для разработки противовоспалительной терапии при многих патологических состояниях (сепсис, аутоиммунная патология, аллергические заболевания) [1].

ИЛ-6 продуцируется различными типами клеток, таких как Т-клетки, В-клетки, моноциты, фибробласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки, мезангиальные клетки, адипоциты и некоторые опухолевые клетки. Рецептор ИЛ-6 (ИЛ-6Р) в основном экспрессируется на Т-клетках, моноцитах, активированных В-клетках и нейтрофилах. Когда в 1986 г. ИЛ-6 был впервые идентифицирован, его основной характеристикой являлась способность индуцировать активацию и пролиферацию Т-клеток, а также участвовать в дифференцировке В-клеток в плазматические клетки. Сейчас ИЛ-6 рассматривается как плейотропный цитокин с гормоноподобной активностью, который участвует в патогенезе сосудистых заболеваний, нарушении липидного обмена, инсулинорезистентности посредством влияния на регуляцию нейроэндокринной и нейропсихологической систем [2].

В экспериментах на животных было показано, что ИЛ-6 играет ключевую роль в повышении температуры тела в острой фазе воспаления, а также в продукции белков острой фазы воспаления гепатоцитами [3]. Подкожное введение человеческого ИЛ-6 (1–10 мкг/кг в сутки) в течение 7 сут приводит к увеличению концентрации сывороточного амилоида А (SAA), С-реактивного белка (CRP), α 1-кислого гликопротеина, α 1-антихимотрипсина, гаптоглобина, α 1-антитрипсина, фибриногена, компонента комплемента С3 и церулоплазмينا [4]. Кроме того, доказано, что ИЛ-6 является важным фактором поддержания гомеостаза в печени. ИЛ-6 наряду с другими провоспалительными цитокинами участвует в ангиогенезе, регулирует процессы пролиферации и активации эндотелиальных клеток, а также миграцию иммунокомпетентных клеток по эндотелию сосудов. После инъекции ИЛ-6 наблюдается демаргинация внутрисосудистого пула нейтрофилов, а в периферической крови отмечается нейтрофилия: первая волна – через 1,5 ч, вторая волна – в течение 4–12 ч после инъекции ИЛ-6 [5]. Участие ИЛ-6 в развитии специфического иммунного ответа связано в первую очередь с активацией пролиферации и дифференцировки В-клеток и Т-хелперов в ответ на воздействие митогена. ИЛ-6 усиливает продукцию IgM, IgG и IgA плазматическими клетками, оказывает мощное влияние на образование костной ткани и регуляцию ее обновления (в частности, он стимулирует образование и активность остеокластов, особенно после падения концентрации эстрогена) [6], играет важную роль в метаболизме липидов [7].

Нормальные физиологические концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови человека являются относительно низкими (1–5 пг/мл), однако они быстро увеличиваются в условиях патологического процесса и могут достигать величин в мг/мл. Во многих случаях ИЛ-6 является более чувствительным и более ранним прогностическим маркером развития воспаления, чем С-реактивный белок. Участие ИЛ-6 доказано при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, болезнь Каслмана и мезангиальный пролиферативный гломерулонефрит. Кроме того, ИЛ-6 является фактором роста некоторых опухолей, таких как множественная миелома и карцинома почки. Предполагается участие ИЛ-6 в развитии кахексии через стимуляцию синтеза белков острой фазы клетками печени.

Применение блокаторов/ингибиторов ИЛ-6 (в первую очередь моноклональных антител к ИЛ-6 или к рецепторам ИЛ-6) рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений фармакотерапии воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. В мировой медицинской практике разработан и успешно применяется препарат Тоцилизумаб, представляющий собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело к человеческому рецептору ИЛ-6 [8, 9]. Успешное его применение создало предпосылки для разработки других лекарственных средств, которые в перспективе могут сформировать новый класс генно-инженерных биологических препаратов – ингибиторов ИЛ-6. В табл. 1 представлены препараты, которые либо нашли клиническое применение, либо проходят испытания.

Таблица 1. Ингибиторы ИЛ-6

Table 1. IL-6 inhibitors

Препарат	Описание	Стадия исследования
Тоцилизумаб	Моноклональные антитела против рецептора ИЛ-6	Клинические испытания
Силтуксимаб	Химерные моноклональные антитела против рецептора ИЛ-6	Клинические испытания
Олоклизумаб	Моноклональные антитела против ИЛ-6	Клинические испытания
Сарилумаб	Человеческие моноклональные антитела против рецептора ИЛ-6	Клинические испытания
Елсалимомаб	Мышиные моноклональные антитела против ИЛ-6	Клинические испытания
Сирукумаб	Человеческие моноклональные антитела против ИЛ-6	Доклинические испытания
Клазакизумаб	Гликозилированные моноклональные антитела против ИЛ-6	Доклинические испытания

Однако применение препаратов на основе моноклональных антител связано с развитием целого ряда побочных эффектов, таких как реакция гиперчувствительности замедленного типа, инфекционные осложнения (туберкулез, вирусные гепатиты), лимфопролиферативные заболевания, лейкопения, тромбоцитопения и нейтропения [10]. Кроме того, одним из важных недостатков лечения с применением моноклональных антител является стоимость. Таким образом, поиск новых способов регулирования концентрации провоспалительных цитокинов в плазме крови с использованием синтетических пептидных лигандов является актуальной и перспективной задачей современной медицинской науки. Во-первых, олигопептид является менее чужеродным антигеном, чем химерные моноклональные антитела, во-вторых – он более дешевый.

Цель данной работы – разработать и изучить эффективность олигопептидов, предназначенных для связывания ИЛ-6.

Для достижения цели были поставлены и успешно решены следующие задачи: на основании изучения трехмерных моделей молекулярных структур ИЛ-6 в комплексе с рецептором к ИЛ-6 и gp130 спрогнозированы структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов; для выявления максимально эффективного олигопептида проведена оценка их свободной энергии связывания с ИЛ-6; изучена эффективность олигопептидов по изменению концентрации ИЛ-6 в модельном растворе после контакта с экспериментальными олигопептидами.

Материалы и методы исследования. Для прогнозирования структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов проведен анализ трехмерных моделей из базы данных NCBI ProteinDataBank: 111R (комплекс цитокина с цитокинсвязывающей областью gp130) и 1P9M (комплекс ИЛ-6/рецептор ИЛ-6/gp130) в программе Chimera. Оценку свободной энергии взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6 проводили методом молекулярного докинга с помощью программного обеспечения AutodockVina [11]. Для докинга указывали координаты центра и размеры куба, которые определяли визуально, исходя из структуры цитокина. Координаты центра: Sx:0, Sy:0, Sz:0. Размеры куба: Sx:50, Sy:50, Sz:50.

Эффективность взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6 изучали на модельных растворах. Рабочая концентрация рекомбинантного ИЛ-6 (Cloud-CloneCorp., США) – 100 нг/мл, рекомбинантного рецептора к ИЛ-6 (Cloud-CloneCorp., США) – 100 нг/мл, экспериментального пептида (№ 1–12, синтезирован сотрудниками ИБОХ НАН Беларуси) – 0,05 мг/мл. Для постановки экспе-

римента в лунке планшета смешивали 100 мкл раствора пептида и 100 мкл раствора ИЛ-6. В качестве отрицательного контроля смешивали 100 мкл физиологического раствора NaCl, 100 мкл раствора ИЛ-6 и инкубировали 2 ч при 37 С, а затем около 18 ч при 4 °С. Через 20 ч от начала эксперимента отбирали 100 мкл для постановки иммуноферментного анализа с целью определения концентрации ИЛ-6. По изменению концентрации ИЛ-6 в пробе с пептидами по сравнению с концентрацией ИЛ-6 в пробе с физиологическим раствором судили об эффективности экспериментального пептида. Снижение концентрации цитокина рассчитывали в процентах от исходной концентрации.

Статистическую обработку и построение графиков проводили с помощью программы Statistica 10.0 и GraphPadPrism6. Значения свободной энергии связывания представлены в виде Me (25 %; 75 %).

Результаты исследования. Результаты определения свободной энергии связывания пептидов с ИЛ-6 представлены в табл. 2. Результаты сравнительного анализа процента связывания синтезированных олигопептидов с ИЛ-6 в экспериментах *in vitro* с рассчитанной свободной энергией связывания приведены в табл. 3, результаты статистического анализа изменений свободной энергии связывания в зависимости от строения олигопептидов – в табл. 4.

Т а б л и ц а 2. Свободная энергия связывания пептидов с ИЛ-6
T a b l e 2. Free energy of peptide binding to IL-6

Пептид	Энергия, –ккал/моль (Me (25 %; 75 %))	Энергия, –ккал/моль (Me (25 %; 75 %))
<i>Дипептиды</i>		
Gly-Ser	4,05 (3,85; 4,20)	5,22 (4,82; 5,70)
Gly-Val	4,35 (4,20; 4,50)	
Gly-Pro	4,40 (4,30; 4,65)	
Ser-Val	4,60 (4,42; 4,87)	
Leu-Ser	4,70 (4,50; 4,87)	
Ser-Ile	4,80(4,60; 4,97)	
Thr-His	4,90 (4,80; 5,20)	
Asp-Leu	5,00 (4,90; 5,27)	
Val-Ile	5,15 (4,72; 5,30)	
Ser-Phe	5,30 (5,20; 5,57)	
Gly-Phe	5,40 (5,10; 5,70)	
Lis-Phe	5,50 (5,22; 5,60)	
Tyr-Arg	5,70 (5,50; 5,90)	
Trp-Ala	5,70 (5,50; 5,87)	
Val-Tyr	5,85 (5,60; 6,20)	
Phe-Val	5,90 (5,70; 6,10)	
<i>Трипептиды</i>		
Ser-Lys-Ser	4,65 (4,50; 4,82)	5,65 (5,12; 5,85)
Ser-Val-Ile	5,00 (4,72; 5,07)	
Ser-Ile-Lys	5,00 (5,00; 5,10)	
Pro-Leu-Ser	5,00 (4,72; 5,47)	
Lys-Asp-Leu	5,10 (5,00; 5,20)	
Ser-Thr-Val	5,15 (5,00; 5,40)	
Ala-Thr-His	5,30 (5,10; 5,50)	
Ser-Pro-Leu	5,50 (5,32; 5,67)	
Asp-Leu-Gln	5,50 (5,40; 5,60)	
Val-Pro-Glu	5,55 (5,37; 5,62)	
Tyr-Arg-Leu	5,65 (5,20; 5,80)	
Lys-Phe-Ala	5,65 (5,50; 5,87)	
Phe-Glu-Gly	5,70 (5,50; 5,90)	
Lys-Tyr-Gly	5,75 (5,40; 6,02)	

Окончание табл. 2

Пептид	Энергия, –ккал/моль (Ме (25 %; 75 %))	Энергия, –ккал/моль (Ме (25 %; 75 %))
Ser-Ser-Phe	5,80 (5,70; 6,00)	
Phe-Tyr-Arg	5,80 (5,70; 5,97)	
Glu-Trp-Ala	5,90 (5,80; 6,30)	
Ser-Phe-Tyr	6,15 (5,72; 6,47)	
Phe-Gln-Asn	6,30 (6,10; 6,42)	
Trp-Gly-His	6,55 (6,20; 6,80)	
Tyr-Phe-Val	6,60 (6,40; 6,80)	
<i>Тетрапептиды</i>		
Gln-Gly-Cys-Gln	4,90 (4,52; 4,97)	5,85 (5,48; 6,08)
Lys-Asp-Leu-Gln	5,20 (5,00; 5,40)	
Ser-Pro-Leu-Ser	5,30 (5,20; 5,40)	
Glu-Phe-Gly-Gln	5,45 (5,30; 5,67)	
Tyr-Ser-Thr-Val	5,60 (5,15; 5,97)	
Val-Asn-Gly-Arg	5,60 (5,30; 5,75)	
Glu-Gly-Leu-Phe	5,75 (5,57; 6,02)	
Gln-Asn-Ser-Pro	5,80 (5,50; 6,17)	
Ser-Ser-Phe-Tyr	5,90 (5,70; 6,07)	
Glu-Glu-Phe-Gly	5,95 (5,50; 6,30)	
Asp-Pro-Val-Tyr	6,00 (5,60; 6,30)	
Val-Tyr-Phe-Val	6,05 (5,80; 6,47)	
Phe-Gly-Gln-Gly	6,10 (5,92; 6,27)	
Asp-Tyr-Ala-Pro	6,15 (5,90; 6,30)	
Tyr-Phe-Val-Asn	6,25 (6,02; 6,47)	
Trp-Ala-Thr-His	6,35 (6,02; 6,67)	
<i>Пентапептиды</i>		
Ile-Lys-Ser-Val-Ile	5,20 (5,10; 5,30)	5,30 (5,20; 5,40)
Glu-Gly-Asp-Ser-Ser	5,30 (5,12; 5,40)	
Asn-Glu-Gly-Lys-Lys	5,50 (5,20; 5,70)	
<i>Секстапептиды</i>		
Met-Pro-Pro-Ala-Asp-Glu	5,50 (5,20; 5,80)	6,09 (5,85; 6,42)
Phe-Gln-Asn-Ser-Phe-Tyr	5,95 (5,72; 6,00)	
Pro-Ala-Pro-Glu-Asp-Tyr	6,00 (5,85; 6,12)	
Pro-Pro-Ala-Asp-Glu-Asp	6,25 (6,07; 6,42)	
Ser-Phe-Tyr-Phe-Gln-Asn	6,40 (6,30; 6,60)	
Phe-Gly-Gln-Gly-Ser-Phe	6,80 (6,70; 7,40)	

Т а б л и ц а 3. Процент связывания олигопептидов с ИЛ-6 *in vitro*T a b l e 3. Percentage of binding of oligopeptides with IL-6 *in vitro*

Олигопептид	Энергия связывания, ккал/моль	% связывания
Ser-Phe-Tyr-Phe-Gln-Asn	6,40 (6,30; 6,60)	4,25 (2,07; 6,03)
Phe-Gln-Asn-Ser-Phe-Tyr	5,95 (5,72; 6,00)	0,35 (0,00; 1,18)
Ser-Thr-Val-Tyr-Phe-Val	6,20 (6,10; 6,30)	54,90 (48,96; 57,38)
Pro-Ala-Pro-Glu-Asp-Tyr	6,00 (5,85; 6,12)	0,65 (0,31; 1,06)
Met-Pro-Pro-Ala-Asp-Glu	5,50 (5,20; 5,80)	0,69 (0,22; 1,16)
Pro-Pro-Ala-Asp-Glu-Asp	6,25 (6,07; 6,42)	15,20 (11,81; 15,77)
Phe-Gly-Gln-Gly-Ser-Phe	6,80 (6,70; 7,40)	63,45 (55,76; 65,96)
Trp-Gly-His	6,55 (6,20; 6,80)	0,40 (0,10; 0,99)
Val-Asn-Gly-Arg	5,60 (5,30; 5,75)	0,53 (0,25; 0,80)
Ser-Lys-Ser	4,65 (4,50; 4,82)	10,40 (7,41; 10,55)
Glu-Gly-Leu-Phe	5,75 (5,57; 6,02)	10,24 (9,36; 10,57)
Lys-Tyr-Gly	5,75 (5,40; 6,02)	0,25 (0,00; 0,96)

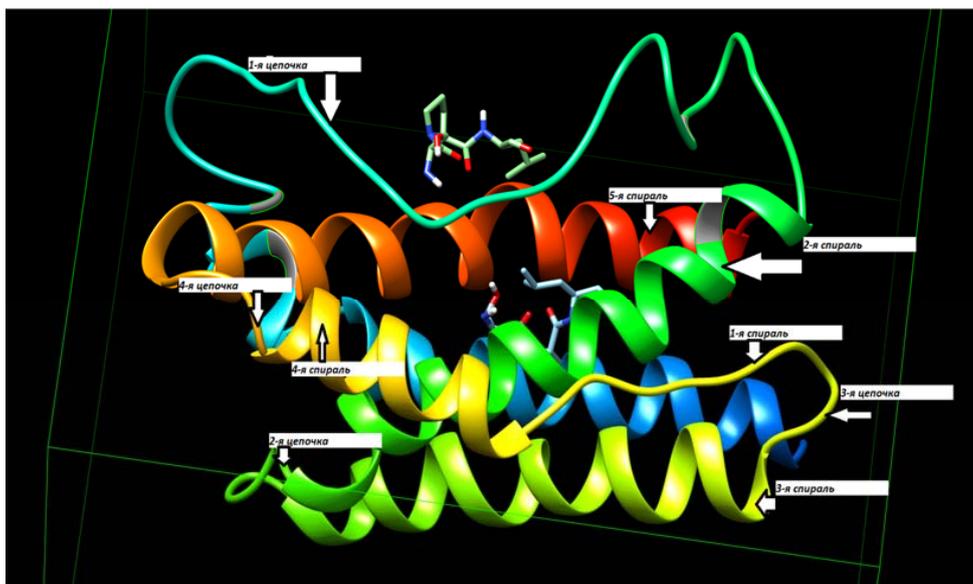
Таблица 4. Коэффициент корреляции свободной энергии и процента связывания ИЛ-6 *in vitro*Table 4. Correlation coefficient of free energy and the percentage of IL-6 binding *in vitro*

Показатель	% связывания	Энергия связывания	Общее число АК	Число ароматических АК	Число Phe	Число Tyr
% связывания	1,00	0,26	0,39	-0,01	0,21	-0,31
Энергия связывания	0,26	1,00	0,36	0,58*	0,37	0,14
Общее число АК	0,39	0,36	1,00	0,37	0,46	0,30
Число ароматических АК	-0,01	0,58	0,37	1,00	0,86*	0,66*
Число Phe	0,21	0,37	0,46	0,86	1,00	0,41
Число Tyr	-0,31	0,14	0,30	0,66	0,41	1,00

*Статистически значимая корреляция.

Обсуждение. Секретируемый ИЛ-6 состоит из 184 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 21 кД. В зависимости от степени гликозилирования наблюдается гетерогенность ИЛ-6 по молекулярному весу. Вторичное строение молекулы ИЛ-6 представлено в основном альфа-спиралью. Общая топология ИЛ-6 в растворе представляется как длинная цепочка, сложенная вверх-вниз-вверх-вниз, участки левозакрученной альфа-спирали (всего их 5) чередуются с цепочками (их 4), которые образуют «петли» [12, 13]. Первая альфа-спираль (А-спираль) начинается с Leu20 и заканчивается Asn46, затем следует цепочка от Lys47 до Glu81 (первая цепочка); вторая спираль (В-спираль) начинается с Glu82 и заканчивается Asn104, затем следует цепочка от Arg105 до Ser109 (вторая цепочка); третья спираль (С-спираль) начинается с Glu110 и заканчивается Lys130, затем следует цепочка от Ala131 до Asp141; четвертая спираль (D-спираль) начинается с Pro142 и заканчивается Gln153, затем следует цепочка от Ala154 до Asn156; пятая спираль (Е-спираль) начинается с Gln157 и заканчивается Gln184. Третичная структура поддерживается двумя дисульфидными связями по обе стороны молекулы, которые образуются при контакте Cys51 и Cys74 первой цепочки с Cys45 А-спирали и Cys84 В-спирали соответственно (см. рисунок).

Для выделения участков взаимодействия ИЛ-6 с растворимым рецептором и sgp130 анализировали пространственную структуру И1R и 1P9M, измеряли расстояние между атомами аминокислот в зоне взаимодействия ИЛ-6 с gp130 и растворимым рецептором. Область взаимодействия ИЛ-6 с gp130 предполагает четыре точки соприкосновения. Область взаимодействия ИЛ-6



Трёхмерная модель ИЛ-6 со встроенным олигопептидом (визуализация Chimera, AutodockVina)

Three-dimensional model IL-6 with oligopeptide embedded (Chimera, AutodockVina visualization)

с ИЛ-6Р предполагает шесть точек соприкосновения. Конструирование пептидов осуществляли на базе аминокислотных остатков рецепторов, наиболее близко расположенных (в диапазоне от 2 до 4 Å) к ИЛ-6. Учитывали также результаты наших предыдущих исследований, в которых изучалась способность отдельных протеиногенных аминокислот, фиксированных на твердой матрице, изменять концентрацию ИЛ-6. Показано, что из 20 протеиногенных аминокислот наилучшей энергией связывания обладают ароматические аминокислоты Phe, Trp, Tyr (–4,85 (4,55; 5,25) ккал/моль) и полярные положительно заряженные аминокислоты Lys, Arg, His (–3,85 (3,55; 4,10) ккал/моль).

С помощью программы PyMol было сконструировано 62 пептида для молекулярного виртуального докинга. Результаты вычисления энергии связывания сконструированных пептидов с ИЛ-6 с помощью метода жесткого докинга, программы Chimera и приложения AutodockVina представлены в табл. 1 (свободная энергия связывания указана в таблице со знаком «минус» (–ккал/моль!)).

Из полученных результатов следует, что энергия связывания дипептидов, в состав которых входит ароматическая аминокислота, меньше, чем у остальных (–5,30 (5,20; 5,57) ... –5,90 (5,70; 6,10) ккал/моль), что свидетельствует о лучшей их способности связываться с ИЛ-6. Наиболее эффективными дипептидами можно назвать Val-Tyr и Phe-Val. Аналогичная тенденция наблюдается и среди трипептидов – энергия связывания меньше у пептидов, содержащих ароматические аминокислоты Ser-Phe-Tyr, Phe-Gln-Asn, Trp-Gly-His, Tyr-Phe-Val. Энергия данных трипептидов находится в диапазоне от –6,15 (5,72; 6,47) до –6,60 (6,40; 6,80) ккал/моль. Среди тетра- и секстапептидов данная закономерность не ярко выражена, однако пептиды, эффективно связывающие ИЛ-6 с энергиями от –6,25 (6,02; 6,47) до –6,80 (6,70; 7,40) ккал/моль, содержат в составе ароматические аминокислоты. Что касается места взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6, то наиболее часто олигопептид был локализован в пространстве между первой цепочкой и пятой спиралью ИЛ-6 (см. рисунок). Эта локализация характерна для взаимодействия растворимого рецептора ИЛ-6 с ИЛ-6. Намного реже взаимодействие пептида отмечалось в торцах молекулы ИЛ-6, между второй и первой спиралью, а также между четвертой и второй цепочками. Мембраноассоциированный рецептор gp130, согласно 3D-модели, взаимодействует с первой и третьей спиралью ИЛ-6. Таким образом, возможно, взаимодействие олигопептида с ИЛ-6 не будет препятствовать контакту ИЛ-6 с мембраноассоциированным рецептором, но будет мешать контакту с растворимым рецептором к ИЛ-6.

Для экспериментов *in vitro* было синтезировано 7 секстапептидов, 2 тетрапептида и 3 трипептида. На данном этапе исследования синтез осуществляли без учета рассчитанной энергии связывания с целью изучения корреляции между рассчитанной энергией связывания и эффективностью влияния олигопептида на концентрацию ИЛ-6 в модельном растворе. Эффективность пептидов рассчитывали по снижению концентрации цитокина (в % от исходной) в растворе (см. табл. 2). Как показали результаты, самыми эффективными по снижению концентрации ИЛ-6 (уменьшение ИЛ-6 более чем на 50 %) оказались секстапептиды Ser-Thr-Val-Tyr-Phe-Val, Phe-Gly-Gln-Gly-Ser-Phe. Из 12 синтезированных пептидов 6 не оказали какого-либо заметного влияния на концентрацию ИЛ-6 в модельном растворе. Влияние же остальных на снижение концентрации ИЛ-6 было незначительным (10–15 %).

Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 3. Статистически значимая корреляция была обнаружена между свободной энергией связывания и числом ароматических аминокислот в олигопептиде. Корреляция между процентом связывания и свободной энергией невысокая ($K = 0,26$). Положительная корреляция процента связывания обнаружена также от числа аминокислот ($K = 0,39$) и от числа Phe в олигопептиде ($K = 0,21$), а вот число Tyr в олигопептиде с процентом связывания ИЛ-6 в растворе характеризовалось обратной корреляционной зависимостью – $K = -0,31$. Анализ полученных результатов показал, что метод молекулярного моделирования не является абсолютно эффективным для прогнозирования структуры олигопептида, однако может использоваться в качестве одной из предварительных ступеней анализа взаимодействия между молекулами и изучения оптимальных точек их соприкосновения для принятия решения о целесообразности синтеза и дальнейшего изучения лигандов.

Заклучение. Анализ пространственной структуры комплекса ИЛ-6 с рецепторами позволил определить их точки взаимодействия, на основании чего было сконструировано 62 олигопептида. Виртуальный докинг и статистическая оценка результатов оценки свободной энергии связывания олигопептидов с ИЛ-6 показали, что эффективность связывания увеличивается с возрастанием общего числа аминокислот, в частности ароматических, в олигопептиде. В результате оценки изменения концентрации ИЛ-6 после контакта с олигопептидами *in vitro* определены два олигопептида, наиболее перспективные для дальнейшего синтеза и разработки способов модификации с целью использования их в качестве лигандов для связывания ИЛ-6 в плазме крови человека.

Список использованных источников

1. Hunter, C. H. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease / C. H. Hunter, S. A. Jones // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, N 5. – P. 448–457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
2. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions / M. Mihara [et al.] // *Clin. Sci.* – 2012. – Vol. 122, N 4. – P. 143–159. <https://doi.org/10.1042/cs20110340>
3. LeMay, L. G. Role of interleukin 6 in fever in rats / L. G. LeMay, A. J. Vander, M. J. Kluger // *Am. J. Phys.-Regul., Integr. Comp. Phys.* – 1990. – Vol. 258, N 3. – P. R798–R803. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.3.R798>
4. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6 / R. E. Banks [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 1995. – Vol. 102, N 1. – P. 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb06659.x>
5. Ulich, T. R. *In vivo* hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs / T. R. Ulich, J. Castillo, K. Z. Guo // *Blood.* – 1989. – Vol. 73, N 1.
6. Lack of evidence for an increase in interleukin-6 expression in adult murine bone, bone marrow, and marrow stromal cell cultures after ovariectomy / S. J. Vargas [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 1996. – Vol. 11, N 12. – P. 1926–1934. <https://doi.org/10.1002/jbmr.565011214>
7. Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor / M. Hashizume [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69, N 4. – P. 741–746. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.104844>
8. Yuzaiful, M. Y. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis / M. Y. Yuzaiful, P. Emery // *Drugs.* – 2013. – Vol. 73, N 4. – P. 341–356. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0018-2>
9. Kang, S. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody / S. Kang, T. Tanaka, T. Kishimoto // *Int. Immunol.* – 2015. – Vol. 27, N 1. – P. 21–29. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu081>
10. Anti-TNF- α therapies: the next generation / M. A. Palladino [et al.] // *Nat. Rev. Drug Disc.* – 2003. – Vol. 2, N 9. – P. 736–753. <https://doi.org/10.1038/nrd1175>
11. Automated docking of ligands to antibodies: method and applications / C. A. Sotriffer [et al.] // *Methods.* – 2000. – Vol. 20, N 3. – P. 280–291. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0922>
12. Solution structure of recombinant human interleukin-6 / G.-Yi Xu [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 268, N 2. – P. 468–481. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0933>
13. Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor binding site: implications for its three-dimensional structure / R. Savino [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – Vol. 90, N 9. – P. 4067–4071. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4067>

References

1. Hunter C. H., Jones S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 2015, vol. 16, no. 5, pp. 448–457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
2. Mihara M., Hashizume M., Yoshida H., Suzuki M., Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 2012, vol. 122, no. 4, pp. 143–159. <https://doi.org/10.1042/cs20110340>
3. LeMay L. G., Vander A. J., Kluger M. J., Role of interleukin 6 in fever in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1990, vol. 258, no. 3, pp. R798–R803. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.3.R798>
4. Banks R. E., Forbers M. A., Storr M., Higginson J., Thompson D., Raynes J., Illingworth J. M., Perren T. J., Selby P. J., Whicher J. T. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clinical and Experimental Immunology*, 1995, no. 102, pp. 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb06659.x>
5. Ulich T. R., Castillo J., Guo K. Z. *In vivo* hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood*, 1989, vol. 73, no. 1, pp. 108–110.
6. Vargas S. J., Naprta A., Lee S. K., Kalinowski J., Kawaguchi H., Pilbeam C. C., Raisz L. G., Lorenzo J. A. Lack of evidence for an increase in interleukin-6 expression in adult murine bone, bone marrow, and marrow stromal cell cultures after ovariectomy. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1996, vol. 11, no. 12, pp. 1926–1934. <https://doi.org/10.1002/jbmr.565011214>
7. Hashizume M., Yoshida H., Koike N., Suzuki M., Mihara M. Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2010, vol. 69, no. 4, pp. 741–746. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.104844>

8. Yuzaiful M. Y., Emery P. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Drugs*, 2013, vol. 73, no. 4, pp. 341–356. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0018-2>
9. Kang S., Tanaka T., Kishimoto T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. *International Immunology*, 2015, vol. 27, no. 1, pp. 21–29. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu081>
10. Palladino M. A., Bahjat F. R., Theodorakis E. A., Moldawer L. L. Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nature Reviews*, 2003, vol. 2, no. 9, pp. 736–753. <https://doi.org/10.1038/nrd1175>
11. Sotriffer C. A., Flader W., Winger R. H., Rode B. M., Liedl K. R., Varga J. M. Automated docking of ligands to antibodies: method and applications. *Methods*, 2000, vol. 20, no. 3, pp. 280–291. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0922>
12. Xu G.-Yi, Yu H.-Ai, Hong J., Stahl M., McDonagh T., Kay L. E., Cumming D. A. Solution structure of recombinant human interleukin-6. *Journal of Molecular Biology*, 1997, no. 268, pp. 468–481. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0933>
13. Savino R., Lahm A., Giorgio M., Cabibbo A., Tramontano A., Ciliberto G. Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor binding site: implications for its three-dimensional structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, vol. 90, no. 9, pp. 4067–4071. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4067>

Информация об авторах

Рябцева Татьяна Владимировна – науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ta-yana@mail.ru

Макаревич Денис Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: demkarevich@yandex.ru

Ермола Евгений Михайлович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь).

Голубович Владимир Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: golubovich@iboch.bas-net.by

Кирковский Валерий Васильевич – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kirkovskv@mail.ru

Information about the authors

Tatiana V. Ryabzeva – Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ta-yana@mail.ru

Denis A. Makarevich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: demkarevich@yandex.ru

Eugeniy M. Ermola – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

Vladimir P. Golubovich – Ph. D. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: golubovich@iboch.bas-net.by

Valeriy V. Kirkovskiy – Ph. D. (Med.), Professor, Chief researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kirkovskv@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 634.738:581.16
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-359-363>

Поступила в редакцию 23.01.2019
Received 23.01.2019

А. Б. Горбунов¹, Т. В. Курлович², Т. И. Снакина¹, Т. А. Недовесова¹

¹Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН,
Новосибирск, Российская Федерация

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

РЕПРОДУКТИВНАЯ СПОСОБНОСТЬ ТЕТРАПЛОИДНОЙ БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.)

Аннотация. Создание аллотетраплоидных бруснично-голубичных гибридов является перспективным направлением в селекции брусничных. Однако получение таких гибридов затруднено из-за биологических особенностей тетраплоидной брусники обыкновенной. В связи с этим целью исследования было изучение жизнеспособности пыльцы тетраплоидной брусники обыкновенной, ее скрещиваемости с разными видами и межвидовым гибридом голубики в различные годы, а также подбор перспективных методов стимуляции роста пыльцевых трубок, завязывания гибридных семян и выращивания гибридных сеянцев.

В результате исследований установлено, что тетраплоидная брусника обыкновенная характеризуется низкой продуктивностью и жизнеспособностью пыльцы, хотя в отдельные годы ее жизнеспособность может достигать 10,7 %. Гибридные сеянцы в процессе роста постепенно погибали. На основе полученных данных предлагается применить ряд приемов для увеличения завязываемости гибридных плодов (опыление цветков смесью пыльцы, опыление в разные сроки жизни цветка, кастрация цветков без удаления венчика, реципрокные скрещивания, опрыскивание опыленных цветков растворами регуляторов роста и микроэлементов) и выращивания гибридных сеянцев (культура *in vitro*).

Ключевые слова: репродуктивная способность, жизнеспособность пыльцы, скрещиваемость, тетраплоидная брусника обыкновенная, голубика топяная, голубика высокорослая, голубика полувисокорослая, голубика узколистная

Для цитирования: Репродуктивная способность тетраплоидной брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) / А. Б. Горбунов [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 359–363. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-359-363>

А. В. Gorbunov¹, Т. V. Kurlovich², Т. I. Snakina¹, Т. A. Nedovesova¹

¹Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation

²Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

REPRODUCTIVE ABILITY OF TETRAPLOID COWBERRY (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.)

Abstract. Creation of allotetraploid cowberry-blueberry hybrids is a promising direction in *Vacciniaceae* breeding. However, obtaining such hybrids is difficult because of biological features of tetraploid cowberry. In this regard the aim of research was study of pollen viability of tetraploid cowberry, its crossing ability with different species and interspecific blueberry hybrid in various years, as well as based on the results obtained, selection of promising methods of growth stimulation of pollen tubes, hybrid seed setting and cultivation of hybrid seedlings.

As a result of research it has been established that tetraploid cowberry is characterized by low productivity and pollen viability, although its viability may reach 10.7 % in some years. Hybrid seedlings gradually died off with growth. On the base of the data obtained it is proposed that a special technique be used to increase hybrid fruit setting (pollination of flowers by a mixture of pollen, pollination in different life spans of a flower, castration of flowers without removing a corolla, reciprocal crosses, spraying pollinated flowers by solutions of growth regulators and microelements) and cultivation of hybrid seedlings (*in vitro* culture).

Keywords: reproductive ability, pollen viability, crossing ability, tetraploid cowberry, bog blueberry, highbush blueberry, half-high blueberry, lowbush blueberry

For citation: Gorbunov A. B., Kurlovich T. V., Snakina T. I., Nedovesova T. A. Reproductive ability of tetraploid cowberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 359–363 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-359-363>

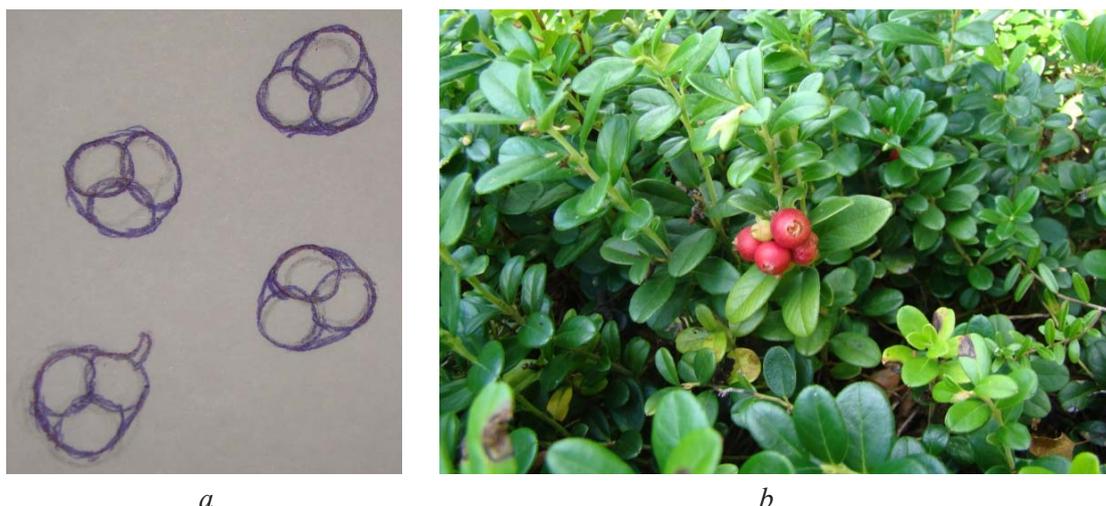
Введение. В 1992 г. в природных условиях Магаданской области О. В. Морозовым [1] обнаружен естественный тетраплоид брусники обыкновенной *Vaccinium vitis-idaea* L. ($2n = 48$), который интродуцирован на Ганцевичскую научно-экспериментальную базу «Журавинка» Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Использование тетраплоидной брусники обыкновенной для создания аллотетраплоида с аборигенной голубикой топяной *Vaccinium uliginosum* L. ($2n = 48$) могло бы привести к созданию гибрида с «углубленным расположением корневой системы, пространственно-структурной дискретностью жизненной формы, хорошим ростом и габитусом кустов, энергичной регенерацией надземных вегетативных органов, листопадностью» [2]. Однако из-за методических нарушений полученный О. В. Морозовым аллотетраплоидный гибрид оказался не бруснично-голубичными, а голубичным [3]. Тем не менее, исследования в этом направлении перспективны, так как тетраплоидная брусника имеет один уровень пloidности с перспективными для интродукции и селекции видами голубики, а гомоплоидные скрещивания более эффективны. Для выяснения причин плохой скрещиваемости тетраплоидной брусники с голубиками необходимо всесторонне изучить ее репродуктивные особенности и наметить эффективные пути создания бруснично-голубичных гибридов.

Цель исследования – изучение жизнеспособности пыльцы тетраплоидной брусники обыкновенной, ее скрещиваемости с разными видами и межвидовым гибридом голубики в различные годы, а также подбор перспективных методов стимуляции роста пыльцевых трубок, завязывания гибридных семян и выращивания гибридных сеянцев.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (г. Новосибирск) и на Ганцевичской экспериментальной базе Центрального ботанического сада НАН Беларуси (г. Ганцевичи). В работе использовали материал УНУ «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» ЦСБС СО РАН. Межвидовые скрещивания тетраплоидных ($2n = 48$) *Vaccinium uliginosum*, *V. corymbosum* L. (голубика щитковая, или высокорослая), *V. angustifolium* Aiton (голубика узколистная, или низкорослая) и межвидового гибрида *V. corymbosum* × *V. angustifolium* (полувысокорослая голубика) с тетраплоидной брусникой, а также тетраплоидной брусники с голубикой топяной проведены с кастрацией и изоляцией цветков в 2006–2018 гг. в ЦСБС и в 2018 г. на Ганцевичской экспериментальной базе. В ЦСБС выполнено 32 комбинации скрещивания. В каждой комбинации опыляли по 30–50 цветков. Всего опылено 1277 цветков. Пыльцу проращивали при 25 °С в парафиновой камере в висячей капле 15 %-ной сахарозы и в чашках Петри на капле раствора агар-агара с 15 %-ной сахарозой, нанесенной на предметное стекло [4, 5]. На Ганцевичской экспериментальной базе свежесобранную пыльцу проращивали в чашках Петри на капле 15 %-ного раствора сахарозы, нанесенной на предметное стекло. Жизнеспособность пыльцы определяли на свежесобранной и длительно (1 год) хранившейся пыльце. Статистическая обработка метрических данных выполнена с использованием пакета программ Statistica 5.0.

Результаты и их обсуждение. Тетраплоидная брусника обыкновенная характеризуется низкой жизнеспособностью пыльцы ($0,67 \pm 0,24$ %). В тетрадах прорастают лишь единичные зерна, и рост пыльцевых трубок часто заканчивается на стадии прорастания (см. рисунок, *a*). Максимальная длина трубок составила 150 мк. При использовании пыльцы тетраплоидной брусники из 32 комбинаций скрещивания результативными оказались 10 (табл. 1): 9 – с голубикой топяной, 1 – с полувысокорослой. Скрещивания тетраплоидной брусники с высокорослой голубикой и голубикой узколистной не дали положительного результата. Как отмечалось нами ранее [6], при использовании тетраплоидной брусники в качестве материнского растения ягоды также не завязались. Из 1277 опыленных цветков завязалось 80 недоразвитых ягод (6,3 %). Наибольшее количество завязавшихся ягод отмечено в 2013 и 2015 гг. Число выполненных семян в ягоде колебалось от 2 до 26 [3]. Всхожесть гибридных семян была низкой. Лишь в 2013 г. удалось получить 71 сеянец. В процессе роста сеянцы постепенно погибали, поэтому вырастить гибридное потомство не удалось. Перечисленные особенности тетраплоидной брусники затрудняют получение межвидовых гибридов брусники с голубиками.

Тетраплоидная брусника характеризовалась низкой продуктивностью, меньшим размером плодов и низкой урожайностью (см. рисунок, *b*, табл. 2). Однако цветков в ее кисти формировалось



Прорастание пыльцы (a) и плодоношение тетраплоидной брусники обыкновенной *Vaccinium vitis-idaea* L. (b)
 Pollen germination (a) and fruiting tetraploid cowberry *Vaccinium vitis-idaea* L. (b)

больше ($8,90 \pm 0,49$), чем у диплоидной брусники. По размерам и массе ягод, количеству выполненных и недоразвитых семян в ягоде и урожайности она значительно уступала диплоидной бруснике. Но получение межвидового аллотетраплоидного бруснично-голубичного гибрида позволит существенно улучшить морфобиологические и биохимические параметры нового представителя подсемейства брусничных.

Таблица 1. Завязываемость плодов при отдаленных скрещиваниях тетраплоидной брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea*, $2n = 48$) с тетраплоидными голубиками

Table 1. Fruit sticking at distant crossings of tetraploid lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*, $2n = 48$) with tetraploid blueberries

Комбинация скрещивания	Год скрещивания	К-во опыленных цветков	К-во комбинаций скрещивания		К-во завязавшихся ягод	К-во гибридных семян
			всего	результативных		
<i>Vaccinium uliginosum</i> × <i>V. vitis-idaea</i>	2006	46	7	0	0	0
	2007	158	4	0	0	0
	2009	90	3	2	6	0
	2010	49	2	2	4	0
	2011	165	2	2	2	0
	2013	271	2	2	29	71
	2015	49	1	1	38	0
	2017	46	3	0	0	0
	2018	137	2	0	0	0
<i>(V. corymbosum</i> × <i>V. angusti-folium)</i> × <i>V. vitis-idaea</i>	2010	92	2	1	1	0
	2018	42	1	0	0	0
<i>V. corymbosum</i> × <i>V. vitis-idaea</i>	2018	60	1	0	0	0
<i>V. angustifolium</i> × <i>V. vitis-idaea</i>	2018	39	1	0	0	0
<i>V. vitis-idaea</i> × <i>V. uliginosum</i>	2009	33	1	0	0	0

Возможными путями решения этой проблемы могут быть опыление цветков смесью пыльцы, опыление в разные сроки жизни цветка, кастрация цветков без удаления венчика, реципрокные скрещивания, опрыскивание опыленных цветков растворами регуляторов роста и микроэлементов, выращивание завязавшихся семян в культуре *in vitro* [4, 5, 8]. По нашему мнению, перспективными смесями пыльцы при опылении голубик будут: 1) 1/4 часть материнской голубичной пыльцы + 3/4 части тетраплоидной брусники; 2) 1/4 часть пыльцы клюквы крупноплодной *Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh + 3/4 части тетраплоидной брусники. В связи с тем что

продолжительность цветения одного цветка голубики составляет в среднем 7 дней [9], опыление необходимо проводить в три приема – в начале раскрытия бутона, через 2 и через 4 дня после его раскрытия. При опрыскивании опыленных цветков представляется наиболее перспективным опрыскивание раствором 0,0001 %-ной гибберелловой кислоты, приготовленной на растворе 0,003 %-ной борной кислоты на 15 %-ной сахарозе.

Т а б л и ц а 2. Характеристика растений тетраплоидной ($2n = 48$) и диплоидной ($2n = 24$) брусники обыкновенной

Table 2. Characteristics of plants tetraploid ($2n = 48$) and diploid ($2n = 24$) lingonberry

Параметр	Брусника обыкновенная		
	тетраплоидная ($2n = 48$)	диплоидная ($2n = 24$)	диплоидная (сорт Коралл)
К-во побегов с кистями на 0,1 м ²	25,60 ± 1,82	–	–
К-во кистей на побеге	1,75 ± 0,16	1,84 ± 0,37*	2,32 ± 0,52*
К-во цветков в кисти	8,90 ± 0,49	6,92 ± 0,61*	6,51 ± 0,82
К-во побегов с завязью на 0,1 м ²	1,40 ± 1,06	–	–
К-во завязей на 1 побег	2,11 ± 1,51	–	–
К-во созревших ягод на 1 побег	2,04 ± 1,23	–	–
К-во созревших ягод в кисти	–	3,73 ± 0,11	4,32 ± 0,11
Длина ягоды, мм	6,40 ± 0,35	7,40 ± 0,65	9,20 ± 0,62
Диаметр ягоды, мм	5,40 ± 0,57	8,50 ± 0,57	7,60 ± 0,47
Масса одной ягоды, г	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,25 ± 0,05
К-во выполненных семян в 1 ягоде	1,60 ± 1,10	6,70 ± 1,45	21,10 ± 4,32
К-во недоразвитых семян в 1 ягоде	4,40 ± 1,27	15,90 ± 2,29	17,60 ± 3,99
Урожайность, г/м ²	2,12 ± 0,11*	36,23 ± 12,76*	73,38 ± 11,21*

*Данные Н. Б. Павловского, Н. Н. Рубана, 2000 [7].

Заклучение. Тетраплоидная брусника обыкновенная характеризуется низкой продуктивностью и жизнеспособностью пыльцы. Ее гибридные с голубиками сеянцы маложизнеспособны и постепенно погибают в процессе роста. На основе полученных данных предлагается применить ряд приемов для увеличения завязываемости гибридных плодов (опыление цветков смесью пыльцы, опыление в разные сроки жизни цветка, кастрация цветков без удаления венчика, реципрокные скрещивания, опрыскивание опыленных цветков растворами регуляторов роста и микроэлементов) и выращивания гибридных сеянцев (культура *in vitro*).

Список использованных источников

1. Марозаў, А. У. Аўтатэтраплоіды *Vaccinium vitis-idaea* L. у прыродных умовах / А. У. Марозаў // Вес. Акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 1995. – № 2. – С. 5–11.
2. Морозов, О. В. Научные основы культуры и селекции брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) в условиях Беларуси : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.05 / О. В. Морозов. – Минск, 2005. – 274 л.
3. Происхождение бруснично-голубичного гибрида селекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси / А. Б. Горбунов [и др.] // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2017. – Т. 47, № 2. – С. 13–21.
4. Селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур / А. С. Татаринцев [и др.] ; под ред. А. С. Татаринцева. – М. : Сельхозгиз, 1960. – 408 с.
5. Голубинский, И. Н. Биология прорастания пыльцы / И. Н. Голубинский. – Киев : Наук. думка, 1974. – 368 с.
6. Горбунов, А. Б. Голубика / А. Б. Горбунов, Т. И. Снакина // Интродукция нетрадиционных плодовых, ягодных и овощных растений в Западной Сибири / А. Б. Горбунов [и др.] ; отв. ред. : И. Ю. Коропачинский, А. Б. Горбунов. – Новосибирск, 2013. – С. 109–127.
7. Павловский, Н. Б. Сортовая брусника в Белорусском Полесье / Н. Б. Павловский, Н. Н. Рубан. – Минск : Тэхналогія, 2000. – 230 с.
8. Татаринцев, А. С. Курс лекций по генетике / А. С. Татаринцев. – Воронеж : Гл. упр. высш. и сред. с.-х. образования Мичурин. плодовоощ. ин-т, 1971. – 252 с.
9. Горбунов, А. Б. Селекция брусничных (клюквы, брусника, голубика) / А. Б. Горбунов, А. Ф. Черкасов, Н. С. Левгерова // Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Всерос. НИИ селекции плодовых культур ; Е. Н. Седов [и др.]. – Орел, 1995. – С. 468–477.

References

1. Marozau A. U. Avtatetraploidy *Vaccinium vitis-idaea* L. in natural conditions. *Vestsi Akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 1995, no. 2, pp. 5–11 (in Belarusian).
2. Morozov O. V. *Scientific basis for the culture and breeding of cowberry (Vaccinium vitis-idaea L.) in Belarus*. Ph. D. Thesis. Minsk, 2005. 274 p. (in Russian).
3. Gorbunov A. B., Kurlovich T. V., Asbaganov S. V., Snakina T. I. The origin of the cowberry-blueberry hybrid breeding of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* [Siberian journal of agricultural science], 2017, vol. 47, no. 2, pp. 13–21 (in Russian).
4. Tatarintsev A. S., Zaets V. K., Kuz'min A. Ya., Ul'yanishchev M. M., Abramov N. A., Lobanov G. A. *Selection and cultivation of fruit and berry crops*. Moscow, State Publishing House of Agricultural Literature, 1960. 408 p. (in Russian).
5. Golubinskii I. N. *Pollen germination biology*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1974. 368 p. (in Russian).
6. Gorbunov A. B., Snakina T. I. Blueberry. *Introduktsiya netraditsionnykh plodovykh, yagodnykh i ovoshchnykh rastenii v Zapadnoi Sibiri* [Introduction of not traditional fruit, berry and vegetable plants in West Siberia]. Novosibirsk, 2013, pp. 109–127 (in Russian).
7. Pavlovskii N. B., Ruban N. N. *Varietal cowberries in the Belarusian Polesie*. Minsk, Tehkhnalogiya Publ., 2000. 230 p. (in Russian).
8. Tatarintsev A. S. *Course of lectures on genetics*. Voronezh, Main Department of Higher and Secondary Agricultural Education Michurinsky Fruit and Vegetable Institute, 1971. 252 p. (in Russian).
9. Gorbunov A. B., Cherkasov A. F., Levgerova N. S. Cowberry selection (cranberry, cowberry, blueberry). *Programma i metodika selektsii plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kul'tur* [Program and methods of selection of fruit, berry and nut crops]. Orel, 1995, pp. 468–477 (in Russian).

Информация об авторах

Горбунов Алексей Борисович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук (ул. Золотодолинская, 101, 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: gab_2002ru@ngs.ru

Курлович Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vaccinium@mail.ru

Снакина Татьяна Ивановна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук (ул. Золотодолинская, 101, 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: snakina@list.ru

Недовесова Татьяна Анатольевна – ст. лаборант. Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук (ул. Золотодолинская, 101, 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: TatjanaNedovesova@yandex.ru

Information about the authors

Aleksey B. Gorbunov – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (101, Zolotodolinskaya Str., 630090, Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: gab_2002ru@ngs.ru

Tatsiana V. Kurlovich – 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: vaccinium@mail.ru

Tat'yana I. Snakina – Ph. D. (Biol.), Researcher. Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (101, Zolotodolinskaya Str., 630090, Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: snakina@list.ru

Tat'yana A. Nedovesova – Senior laboratory assistant. Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (101, Zolotodolinskaya Str., 630090, Novosibirsk, Russian Federation).

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 504.064.36
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-364-373>

Поступила в редакцию 23.01.2019
Received 23.01.2019

О. В. Лозинская¹, С. Б. Мельнов², Т. П. Сергеева¹, В. Н. Кипень³

¹Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова БГУ,
Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет физической культуры, Минск, Республика Беларусь

³Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

БИОИНДИКАЦИОННЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ТЕРРИТОРИЙ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ РАСТЕНИЙ

Аннотация. Изучено состояние территорий в условиях заповедности, действия крупных промышленных центров и загрязнения радионуклидами путем оценки изменения морфометрических и цитогенетических показателей вегетативных органов трех модельных видов-фитоиндикаторов. С помощью многомерного шкалирования выделено три кластера: первый объединяет территории крупных урбоценозов (г. Гомель + г. Минск), второй включает территорию, расположенную в зоне радиоактивного загрязнения (г. Хойники + зона отчуждения Полесского государственного радиационно-экологического заповедника), третий служит эталоном состояния среды (Березинский биосферный заповедник). Показано, что растения различной систематической принадлежности (*Betula pendula* Roth., *Trifolium repens* L., *Allium cepa* L.) могут выступать качестве биоиндикаторов состояния природной среды благодаря их чувствительности.

Ключевые слова: антропогенная нагрузка, комплексная оценка, биоиндикация, фитоиндикаторы, морфометрические показатели, цитогенетические показатели, многомерное шкалирование

Для цитирования: Биоиндикационный подход к оценке экологического статуса территорий по морфологическим и цитогенетическим показателям растений / О. В. Лозинская [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 364–373. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-364-373>

O. V. Lozinskaya¹, S. B. Melnov², T. P. Sergeeva¹, V. N. Kipen³

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University of Physical Education, Minsk, Republic of Belarus

³Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

BIOINDICATION APPROACH TO THE ECOLOGICAL STATUS OF THE TERRITORIES BY MORPHOLOGICAL AND CYTOGENETIC INDICATORS OF PLANTS

Abstract. The ecological status of the technologically transformed and natural territories of Belarus has been ranked by changing the morphometric and cytogenetic indices of separate vegetative organs (lamina and root) in three model species of phytoindicators. Based on the results of multidimensional scaling (bootstrap (1000)), 3 clusters have been identified: the first combines the territories of large urban cenoses (Gomel + Minsk), the second includes part of the republic territory most exposed to radiation pollution (Khoyniki + PSRER exclusion zone), and the third acts as a standard of the state of the environment (Berezinsky Biosphere Reserve). The suitability of plants of various taxonomic groups (*Betula pendula* Roth., *Trifolium repens* L., *Allium cepa* L.) as bioindicators for assessing the state of the natural environment has been shown.

Keywords: anthropogenic load, complex assessment, bioindication, phytoindicators, morphometric indicators, cytogenetic indicators, multidimensional scaling

For citation: Lozinskaya O. V., Melnov S. B., Sergeeva T. P., Kipen V. N. Bioindication approach to the ecological status of the territories by morphological and cytogenetic indicators of plants. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 364–373 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-364-373>

Введение. Возрастающее антропогенное воздействие на естественные и техногенно измененные экосистемы определяет актуальность проведения мониторинговых исследований.

Для комплексной оценки состояния окружающей среды успешно применяют биоиндикаторы, в частности фитоиндикаторы. Воздействие различных по своей природе и силе факторов, вызванных деятельностью человека, заключается в изменении показателей состояния развития живых организмов, в том числе морфологических, физиологических, биохимических и цито-

генетических [1]. В настоящее время наряду с традиционными (физическими и химическими) методами оценки качества среды используются морфологические и цитогенетические, позволяющие выявить степень антропогенной нагрузки на популяционном и организменном уровнях.

Для оценки качества среды техноценозов и естественных территорий используются фитоиндикаторы береза повислая (*Betula pendula* Roth.) [2], клевер ползучий (*Trifolium repens* L.) [3] и лук репчатый (*Allium cepa* L.) [4], которые реагируют на химические загрязнители наряду с биотическими и абиотическими факторами. О степени антропогенного влияния, в частности загрязнения тяжелыми металлами [5, 6], судят по изменению морфологических, фенотипических и цитогенетических параметров этих фитоиндикаторов.

Анализ временной динамики экологической обстановки необходим для корректировки природоохранных мероприятий [7], в частности, в районе Белорусской АЭС.

Цель работы – биоиндикационная оценка территорий, различающихся уровнем антропогенной нагрузки, по показаниям тест-критериев у растений разной систематической принадлежности (*Betula pendula*, *Trifolium repens*, *Allium cepa*).

Объекты и методы исследования. Сбор материала проведен в процессе полевых исследований (июнь–август) 2008–2012 гг. в урбаноценозах, различающихся по степени антропогенного воздействия: в городах Минск, Гомель, Хойники; в зоне радиационного загрязнения – Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике (ПГРЭЗ), где радиационный фон поверхности почв составлял до 5,8 мк Зв/ч; в Березинском биосферном заповеднике. Пробы отбирали в реперных точках, включающих промышленные, рекреационные и парковые зоны, автомагистрали и естественные территории.

В районе исследований было отобрано 495 образцов почвы, собрано и проанализировано более 74 000 образцов листовых пластинок березы (г. Минск – 42 000, г. Гомель – 11 250, г. Хойники – 8250, ПГРЭЗ – 3750, Березинский заповедник – 9000) и более 75 000 листовых пластинок клевера (г. Минск – 44 800, г. Гомель – 12 000, г. Хойники – 8800, ПГРЭЗ – 4000, Березинский заповедник – 9600).

Уровень загрязнения среды устанавливали с помощью интегрального показателя величины флуктуирующей асимметрии (ФА) листовой пластинки *Betula pendula*, для получения основных морфологических параметров которой (длина жилки первого порядка, угол между жилками и ширина правой и левой сторон листа) использовали программное обеспечение для автоматизированного компьютерного анализа *Pendula v.1.0*. Качество среды оценивали с помощью балльной шкалы Захарова [8].

Наличие фенотипов *Trifolium repens* в каждой изученной популяции из неравнозначных экологических условий устанавливали по таблице Брюбейкера, содержащей 36 фенотипов, соответствующих вариантам аллелей гена *V*. Частоту их встречаемости (в %) рассчитывали как долю соответствия определенному генотипу в данной выборке.

Для проведения цитогенетического анализа использовали клетки корневой меристемы *Allium cepa*, пророщенных на водных вытяжках почв изучаемых территорий путем смешивания одной части просеянной через сито почвы с двумя частями деионизированной воды [9]. Полученную смесь через сутки центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 1500 об/мин. Затем на бумажный фильтр в чашках Петри, смоченный почвенной вытяжкой, помещали семена в количестве 50 штук, которые проращивали в течение 2–4 сут. Контролем служили проростки семян на водопроводной воде. С помощью микроскопа Nikon Eclipse 50-i, видеокамеры Nikon DS-Fi1 и компьютера с программным обеспечением проанализировано 1000 клеток апикальной меристемы корешка *Allium cepa*. Мутагенное воздействие химического состава почв определяли по показателям митотического индекса (МИ, %), частоте хромосомных aberrаций (ЧА), рассчитанных как отношение суммы ана-телофазных клеток с нарушениями к общему числу ана-телофаз [10].

Содержание химических элементов Cr, Pb, Zn, Mn, Fe, Ba, Ni, Hg, Cu и Cd в почве и растительном материале (*Betula pendula*) определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа на спектрометре CEP-01 (ElvaX, Россия) с применением оригинального программного обеспечения Elvatech MCA.

Для статистического анализа данных применяли программное обеспечение SPSS v.20.0 (IBM, США), для обработки количественных данных – метод вариационной статистики, с помощью которого получали средние значения и стандартное отклонение для каждого количественного параметра.

Сравнение количественных данных (тест Левена) и нормальность распределения (критерий согласия Колмогорова) проводили с помощью метода дисперсионного анализа ANOVA, сравнение более двух переменных – с использованием точного критерия Фишера, расчет точного значения показателя статистической значимости (p) – с помощью метода Монте-Карло. Взаимосвязь между каждым из показателей (коэффициентом флуктуирующей асимметрии (КФА), индексом соотношения фенотипов (ИСФ), ЧА, МИ) и микроэлементным составом оценивали с помощью корреляционного (коэффициент Спирмена) и регрессионного анализа.

Для классификации территорий использовали метод кластерного анализа и многомерного шкалирования полученных данных (КФА, ИСФ, ЧА и МИ) трех модельных видов-фитоиндикаторов всех исследованных территорий за период исследований. На основании рассчитанных матриц близостей в программном обеспечении PAST v.3.17 построены деревья кластеризации методом UPGMA (бутстреп 1000) и графики PCA (главных компонент).

Результаты и их обсуждение. Экологический статус изучаемых территорий по морфометрическим показателям листовой пластинки березы повислой *Betula pendula*. Исследования, проведенные на урбанизированных территориях, загрязненных радионуклидами, и естественных [11], позволили дать интегрированную оценку влияния химического состава почв, основываясь на изменении морфометрических показателей листовой пластинки *B. pendula*.

На протяжении всего периода исследования в экологически разнотипных точках (56) г. Минска выявлены значительные отличия (более чем в 1,5 раза) значений КФА листовой пластинки, по которым можно судить (по шкале Захарова) о степени отклонения этого вегетативного органа от нормального развития.

Средние годовые значения КФА в течение 5 лет представлены в табл. 1. Наибольшие значения, соответствующие V классу чистоты (высокая степень загрязнения), характерны для 2010 г., значительно меньшие, соответствующие IV классу (также высокая степень загрязнения), – для 2012 г. Как видно из табл. 1, самое высокое среднее значение этого показателя (0,056) за весь период исследования, соответствующее V классу чистоты, отмечено для г. Минска, что характеризует территорию данного урбаноценоза как испытывающую наибольшее антропогенное воздействие [12].

Таблица 1. Коэффициент флуктуирующей асимметрии листовой пластинки популяций березы повислой антропогенно трансформированных и естественных территорий Беларуси

Table 1. Indicators of fluctuating asymmetry of the leaf plate of birch populations of the anthropogenically transformed and natural territories of Belarus

Период исследований	г. Минск	г. Гомель	г. Хойники	ПГРЭЗ	ББЗ
2008 г.	0,056 ± 0,008	0,052 ± 0,003	0,052 ± 0,004	0,057 ± 0,003	0,048 ± 0,004
2009 г.	0,056 ± 0,010	0,048 ± 0,002	0,048 ± 0,006	0,055 ± 0,003	0,047 ± 0,003
2010 г.	0,059 ± 0,010	0,058 ± 0,003	0,060 ± 0,005	0,060 ± 0,005	0,046 ± 0,003
2011 г.	0,056 ± 0,008	0,049 ± 0,003	0,049 ± 0,004	0,050 ± 0,002	0,047 ± 0,001
2012 г.	0,053 ± 0,005	0,053 ± 0,003	0,049 ± 0,006	0,048 ± 0,010	0,046 ± 0,003
Среднее значение	0,056 ± 0,008	0,052 ± 0,003	0,052 ± 0,005	0,053 ± 0,004	0,047 ± 0,003*

Примечание. В табл. 1–3: ПГРЭЗ – Государственное природоохранное научно-исследовательское учреждение «Полесский государственный радиационно-экологический заповедник»; ББЗ – Березинский биосферный заповедник. * – статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) от других исследуемых территорий.

Изменения коэффициента ФА листовой пластинки березы, произрастающей на территории г. Гомеля, по данным табл. 1, сопоставимы с его значениями по г. Минску. Однако отмечено, что в отдельные годы (2009 г.) значение показателя КФА (0,049), соответствующее III классу, свидетельствует о меньшей антропогенной нагрузке на территорию г. Гомеля по сравнению с г. Минском.

Значения КФА листовой пластинки популяций березы территории г. Хойники за исследуемый период находились в диапазоне 0,048–0,060 (III–V классы чистоты). Необходимо учитывать

наличие радионуклидного загрязнения данной территории, что в целом характеризует ее как достаточно неблагоприятную, несмотря на небольшое число расположенных на ней промышленных предприятий.

Как следует из табл. 1, значения интегрального показателя КФА листовой пластинки популяций березы, произрастающей на территории зоны отчуждения ЧАЭС, а также на других исследованных территориях, колеблются по годам, что свидетельствует о влиянии не только фактора загрязнения почвы. Средние значения этого показателя (0,53) идентичны таковым по городам Гомель и Хойники (0,52 в обоих случаях).

Анализ полученных данных по Березинскому биосферному заповеднику показал, что, судя по минимальным отклонениям морфометрических показателей листовой пластинки, эта территория экологически стабильная (табл. 1). Так, значения КФА в отдельных местах заповедника (д. Домжерицы) иногда соответствовали III классу, что можно объяснить близостью автострады, потоком туристов, наличием лесопилки; в остальных случаях – II, редко – I классу чистоты. Отсутствие за весь период исследований территории заповедника статистически значимых различий средних показателей КФА свидетельствует о минимальном антропогенном воздействии, что характеризует среду обитания как стабильную, в том числе и для березы повислой [13, 14].

Полученные данные КФА листовой пластинки популяций березы исследуемых территорий позволили выявить отклонения от ее нормального развития в зависимости от условий произрастания (промышленные центры, загрязнение радионуклидами), что характеризует этот вегетативный орган как чувствительный тест-критерий и подтверждает пригодность данного фитоиндикатора для оценки качества среды.

Оценка антропогенно измененных и естественных территорий по состоянию фенетической структуры фитоиндикатора клевера ползучего. Использование апробированной нами методики изучения наследственного полиморфизма по признаку «седого пятна» (ИСФ) листовой пластинки *Trifolium repens* позволило установить возрастание этого показателя в условиях усиления антропогенной нагрузки [15]. В результате дальнейших исследований выявлены также различия по частоте встречаемости отдельных фенов в зависимости от условий произрастания клевера ползучего.

Анализ полученных данных показал, что популяции клевера ползучего в исследованных урбоценозах обладают различным числом фенотипов (17–23), что обусловлено гораздо большим влиянием антропогенных факторов (выкашивание, вытаптывание), чем в естественной среде (11). Таким образом, значительно меньшее число фенотипов клевера ползучего, произрастающего на территории биосферного заповедника, характеризует условия среды как наиболее благоприятные.

По количеству и разнообразию фенотипов, встреченных на изучаемых территориях, рассчитаны показатели ИСФ (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Индексы соотношения фенов (%) «седого пятна» листовой пластинки популяций клевера ползучего антропогенно трансформированных и естественных территорий Беларуси

Table 2. Indicators of the ratio index of fens (%) of the “gray spot” leaf clover blade populations of anthropogenically transformed and natural areas of Belarus

Период исследований	г. Минск	г. Гомель	г. Хойники	ПГРЭЗ	ББЗ
2009 г.	60,6 ± 12,5	65,6 ± 12,7	52,5 ± 6,7	31,4 ± 5,3	27,7 ± 6,5
2010 г.	54,2 ± 15,2	75,5 ± 14,1	47,7 ± 10,0	32,1 ± 3,5	24,5 ± 3,0
2011 г.	60,6 ± 12,8	68,6 ± 7,6	39,4 ± 7,6	32,3 ± 8,0	24,9 ± 1,9
2012 г.	62,3 ± 11,6	62,7 ± 8,8	43,0 ± 7,2	28,4 ± 6,8	23,3 ± 2,5
Среднее значение	59,4 ± 11,9	68,1 ± 10,3	45,7 ± 7,6	31,0 ± 5,7	25,1 ± 3,4*

Как следует из табл. 2, высокие значения показателя ИСФ (60–70 %) свойственны для экстремальных условий произрастания клевера ползучего на территории крупных урбоценозов. По ИСФ популяций клевера за весь период исследования эти урбоценозы (по 4-балльной системе Ашихминой) можно отнести к III классу чистоты (загрязненные). Таким образом, значения ИСФ служат показательным тест-критерием повышенного риска для клевера ползучего в городской

среде [16], поскольку его популяции в условиях города испытывают разнофакторное воздействие: антропогенное, биотическое и абиотическое.

Изучение фенотипической структуры клевера ползучего, произрастающего на территории Березинского биосферного заповедника, показало, что за весь период исследований эта территория (по значениям ИСФ и отсутствию статистически значимых различий по годам) экологически благополучная. Сравнение же Березинского биосферного заповедника с другими исследованными территориями по ИСФ показало наличие статистически достоверных различий ($p < 0,05$), что свидетельствует о разном экологическом статусе этих территорий.

Таким образом, фенотипическая структура популяций клевера ползучего позволяет ранжировать все обследованные территории в соответствии с различным уровнем антропогенной нагрузки.

Оценка влияния загрязнителей почв на цитогенетические показатели корневой меристемы Allium cepa. Для исключения многофакторного влияния на растения-индикаторы по методике Allium-тест проведен лабораторный эксперимент с одним заданным фактором – элементарным составом почв.

Результаты цитотоксичности отобранных образцов почв по значениям МИ и ЧА в клетках корневой меристемы лука *Allium cepa*, культивируемого на водных вытяжках почв, представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Митотический индекс и частота aberrаций клеток корневой меристемы *Allium cepa* в вытяжках почв антропогенно трансформированной и естественной территорий

Table 3. Mitotic index and frequency of aberrations of root meristem cells of *Allium cepa* in soil extracts of anthropogenically transformed and natural territories

Период исследования	г. Минск	г. Гомель	г. Хойники	ПГРЭЗ	ББЗ	Контроль (водопроводная вода)
<i>Митотический индекс, %</i>						
2009 г.	12,2 ± 2,2	8,8 ± 2,4	9,1 ± 1,4	10,5 ± 1,6	9,0 ± 1,3	12,8
2010 г.	11,0 ± 2,6	7,8 ± 0,9	10,7 ± 1,9	8,3 ± 1,2	9,3 ± 1,0	10,7
2011 г.	13,1 ± 3,1	8,1 ± 1,8	10,4 ± 2,7	9,9 ± 0,3	8,5 ± 1,4	9,7
2012 г.	9,0 ± 2,0	9,3 ± 2,6	9,0 ± 1,8	8,1 ± 1,6	7,9 ± 1,6	9,5
Среднее значение	11,3 ± 1,4*	8,5 ± 1,0	9,8 ± 0,9	9,2 ± 0,5	8,7 ± 0,7	10,7
<i>Частота aberrаций, %</i>						
2009 г.	22,5 ± 6,9	26,6 ± 9,2	25,7 ± 6,2	27,9 ± 5,4	9,9 ± 4,5	0,0
2010 г.	26,7 ± 10,5	32,6 ± 6,6	24,6 ± 6,6	25,8 ± 5,7	12,0 ± 1,8	2,7
2011 г.	29,0 ± 9,1	26,8 ± 5,3	23,8 ± 6,7	24,6 ± 5,1	11,7 ± 1,6	8,1
2012 г.	24,3 ± 7,1	23,9 ± 7,5	23,2 ± 10,3	22,1 ± 2,2	12,5 ± 2,2	0,0
Среднее значение	25,6 ± 4,2	27,5 ± 3,7	24,32 ± 3,6	25,1 ± 2,3	11,5 ± 1,8*	2,7*

Как видно из табл. 3, наиболее высокие показатели МИ, рассчитанные за весь период исследования, характерны для территории г. Минска, при этом они статистически значимо ($p < 0,05$) отличаются от значений, рассчитанных для остальных территорий. Колебания значений МИ имеют широкий диапазон – от 4,0 % (ул. Маяковского, Хладокомбинат) до 19,0 % (ул. Славинского, Севастопольский парк).

Показано, что уровень митостимулирующего и митотоксического эффектов на растительные организмы обусловлен особенностями состава загрязнителей, их концентрацией и сочетанием, что было показано нами ранее [17, 18]. Судя по показателю митотической активности, влияние элементарного состава почв в биосферном заповеднике меньше, чем на техногенно измененных территориях [19].

Усредненные данные цитогенетических нарушений (мутагенная активность) в клетках корневой меристемы *Allium cepa* отражают значительную, а в некоторых случаях даже критическую, частоту aberrаций (25–28 %) по сравнению с эталонной территорией – 11,5 %, что подтверждено статистически (рис. 1).

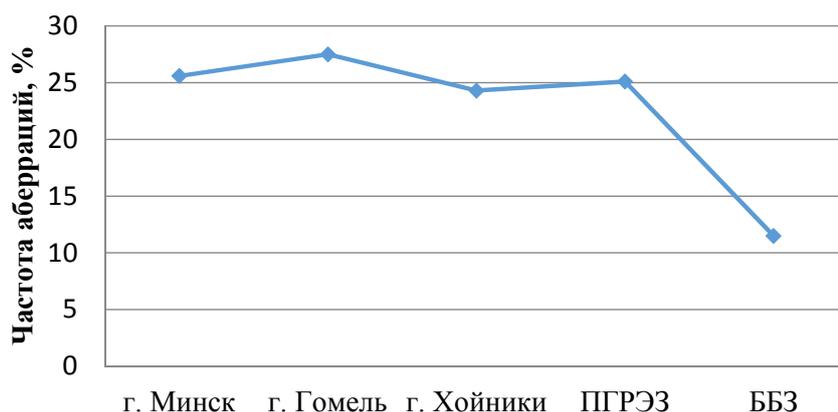


Рис. 1. Частота абerraций в клетках корневой меристемы *A. sepa* в зависимости от химического состава почв

Fig. 2. The frequency of aberrations in the cells of the root meristem *A. sepa* depending on the chemical composition of the soil

Таким образом, уровень отклонений от нормального развития *A. sepa* по цитогенетическим показателям свидетельствует о присутствии загрязнителей (в том числе и наиболее токсичных) и об их влиянии, что проявляется в виде митомодифицирующего и генотоксического эффектов.

Тест-показатели у трех модельных видов в зависимости от степени загрязненности почв. Влияние загрязнителей почв техногенно измененных территорий (по полученным ранее данным) в условиях многофакторного антропогенного воздействия [20] проявилось в отклонении от нормы морфологических и фенетических показателей модельных видов. Проявление же однофакторного влияния (по результатам лабораторного эксперимента), отразившегося на цитогенетических показателях, явилось убедительным доказательством мутагенности почвенных загрязнителей.

Т а б л и ц а 4. Коэффициенты корреляции между загрязнителями почв и показателями морфологических, фенетических и цитогенетических отклонений у модельных видов

Table 4. Correlation coefficients between pollutantss and morphological, phenetic and cytogenetic indices in model species

Химический элемент	Отклонение от нормального развития							
	КФА		ИСФ		ЧА		МИ	
	R	p-value	R	p-value	R	p-value	R	p-value
Ba	-0,1107	>0,05	-0,3220	0,0011	-0,2820	>0,05	-0,3720	0,0001
Cd	0,1122	>0,05	-0,0756	>0,05	0,1185	>0,05	-0,0657	>0,05
Cr	-0,1636	>0,05	0,0405	>0,05	0,0144	>0,05	0,2260	>0,05
Cu	0,3810	0,0001	0,4900	>0,05	0,3380	0,0006	0,4600	0,0001
Fe	0,5020	0,0001	0,4790	0,0001	0,3280	0,0009	0,4820	0,0001
Hg	-0,2340	>0,05	-0,2420	>0,05	-0,1348	>0,05	0,0803	>0,05
Mn	-0,6230	0,0001	0,3250	0,0010	0,1691	>0,05	0,3450	0,0005
Ni	0,1032	>0,05	0,4280	0,0001	0,3400	0,0006	0,3700	0,0002
Pb	0,4620	0,0001	-0,0308	>0,05	0,2000	>0,05	0,1627	>0,05
Zn	0,4560	0,0001	0,5110	0,0001	0,3560	0,0003	0,3280	0,0009

П р и м е ч а н и е. КФА – коэффициент флуктуирующей асимметрии, ИСФ – индекс соотношения фенотипов, ЧА – частота абerraций, МИ – митотический индекс.

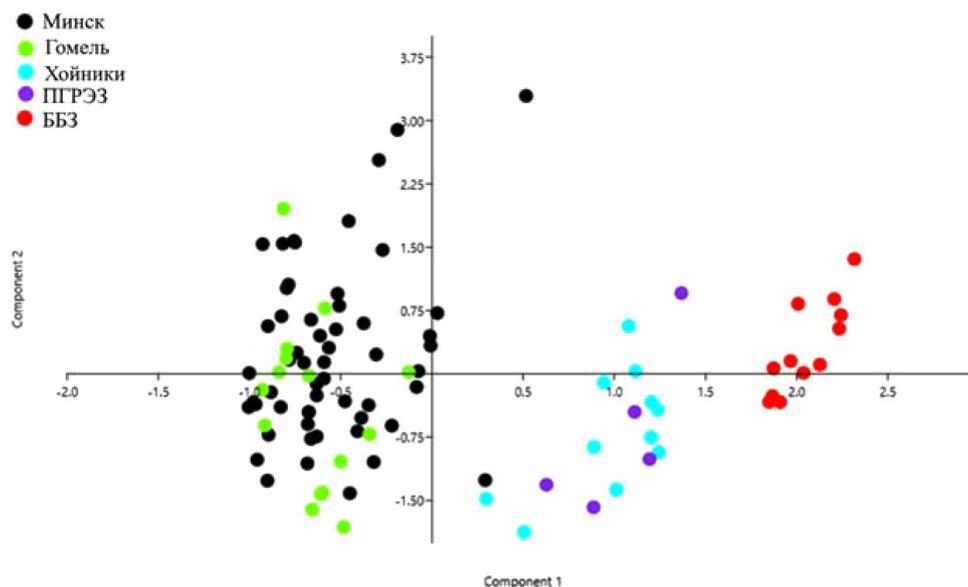


Рис. 2. График PCA (главных компонент) по данным КФА, ИСФ, МИ, ЧА за период 2009–2012 гг.

Fig. 2. Graph PCA (main component) according to the CFA, RFI, GOALS for the period 2009–2012

Зависимости между КФА и содержанием тяжелых металлов в растительном материале, а также между ИСФ, МИ и ЧА и содержанием тяжелых металлов в почве отражены в табл. 4. Таким образом, выявленные отклонения от нормального развития растений по показаниям выбранных параметров служат критерием оценки экологического статуса территорий.

Следует отметить, что установленные для всех обследованных территорий зависимости не показали постоянной связи изучаемых параметров с уровнем загрязнения тяжелыми металлами. Эти колебания можно объяснить особенностями элементного состава, а также колебаниями климатических факторов. Из табл. 4 видно, что каждый из изученных параметров связан с определенными элементами, а Fe и Zn – со всеми параметрами.

На основании полученных нами данных за период 2008–2012 гг. в SPSS v.20.0 были рассчитаны матрицы близостей, реализованные в виде двумерного графика главных компонент в программном обеспечении PAST v.3.17 (рис. 2).

На графике, представленном на рис. 1, отражены результаты многомерного шкалирования (бутстреп 1000), по которым можно судить о суммарном эффекте ответных реакций трех видов-фитоиндикаторов различной систематической и экологической принадлежности.

На основании данных по трем модельным видам-фитоиндикаторам (в пределах всех 99 точек) выделено три кластера, различающихся степенью антропогенного влияния. Так, первый объединяет крупные промышленные центры – г. Гомель + г. Минск; второй – территорию с умеренно развитой промышленностью (совместно с радионуклидным загрязнением) – г. Хойники + ПГРЭЗ, третий представляет естественную территорию (Березинский биосферный заповедник) с минимальным уровнем загрязнения.

Заключение. В результате проведенных исследований выявлены нарушения нормального развития растений-индикаторов по изменению их морфометрических, феногенетических и цитогенетических показателей.

Установлена корреляция между КФА листовой пластинки *Betula pendula*, ИСФ *Trifolium repens* и содержанием загрязнителей в ней и в почве при многофакторном воздействии, а также между цитогенетическими показателями *Allium cepa* в условиях действия одного заданного фактора (химического состава загрязнителей почв).

Результаты многомерного шкалирования подтвердили возможность использования апробированных методик на трех модельных видах-фитоиндикаторах для демонстрации различий в качестве среды обитания растений на различных по уровню антропогенной нагрузки территориях.

Список использованных источников

1. Bai, X. Industrial ecology and the global impacts of cities / X. Bai // J. Industr. Ecol. – 2007. – Vol. 11, N 2. – P. 1–6. <https://doi.org/10.1162/jie.2007.1296>
2. Зорина, А. А. Характеристика флуктуирующей асимметрии и листа двух видов берез в Карелии / А. А. Зорина, А. В. Коросов // Экология. Эксперим. генетика и физиология : тр. Карел. науч. центра Рос. акад. наук. – 2007. – Вып. 11. – С. 28–36.
3. Шарыгина, Н. В. Изучение наследственного полиморфизма рисунка седых пятен на листьях растений в популяциях клевера *Trifolium repens* / Н. В. Шарыгина, А. В. Авдушева // Экологические проблемы Севера : межвуз. сб. науч. тр. / Арханг. гос. техн. ун-т ; отв. ред. П. А. Феклистов. – Архангельск, 2010. – Вып. 13. – С. 122–125.
4. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of *Allium*-test / S. Geras'kin [et al.] // Chemosphere. – 2011. – Vol. 83, N 8. – P. 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.008>
5. Зазнобина, Н. И. Интегральные оценки антропогенной нагрузки на городскую среду как гетеротрофную экосистему (на примере городов Нижегородской области) : автореф. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Н. И. Зазнобина. – Н. Новгород, 2008. – 24 с.
6. Шадманова, Т. Х. Экологические основы биоиндикационных исследований / Т. Х. Шадманова, Ю. С. Чуйков // Астрахан. вест. экол. образования. – 2012. – № 2. – С. 157–164.
7. Мандра, Ю. А. Растения как индикаторы экологического состояния среды курортного региона (на примере города Кисловодска) : автореф. ... канд. биол. наук : 03.02.08 / Ю. А. Мандра. – М., 2010. – 22 с.
8. Здоровье среды: практика оценки / В. М. Захаров [и др.]. – М. : Центр экол. политики России, 2000. – 317 с.
9. Уфимцева, М. Д. Экспрессный фитоиндикационный метод оценки экологического состояния городской среды / М. Д. Уфимцева, Н. В. Терехина ; С.-Петерб. гос. ун-т. – СПб. : Изд-во СПбГУ, 2000. – 29 с.
10. Прохорова, И. М. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды / И. М. Прохорова, М. И. Комарова, А. Н. Фомичева. – Ярославль : Изд-во Яросл. гос. ун-т, 2003. – 32 с.
11. Лозинская, О. В. Сравнительный анализ состояния ценопопуляций березы повислой (*Betula pendula* Roth), произрастающей в условиях с разным уровнем антропогенной нагрузки / О. В. Лозинская, А. И. Крижевская, С. Б. Мельнов // Экол. вестн. – 2013. – № 4. – С. 103–108.
12. Melnov, S. Integrated assessment of heavy metal pollution in big industrial center / S. Melnov, O. Lozinskaya, N. Krapivina // Materials of the «Experts Workshop» on Environmental forensics (12–16 September 2011, Tbilisi, Georgia). – Tbilisi, 2011. – P. 53–58.
13. Влияние радиационного фактора на степень выраженности флуктуирующей асимметрии у *Betula pendula* / В. Н. Кипень [и др.] // Радиация и экосистемы : материалы междунар. науч. конф., Гомель, 2008 г. / НАН Беларуси, Ин-т радиобиологии, Междунар. гос. эколог. ун-т им. А. Д. Сахарова ; под общ. ред. Е. Ф. Конопки. – Гомель, 2008. – С. 222–225.
14. Кулинич, А. В. Использование морфологических и цитогенетических параметров растительных тест-систем для оценки качества среды (на примере Березинского биосферного заповедника) / А. В. Кулинич, О. В. Лозинская // Современное состояние и перспективы развития особо охраняемых природных территорий Республики Беларусь : материалы Междунар. науч.-практ. конф., п. Домжерицы, 24–26 сент. 2012 г. / Упр. делами Президента Респ. Беларусь. – Минск, 2012. – С. 164–167.
15. Лозинская, О. В. Оценка экологического состояния урбоценозов на основе полиморфизма листовой пластинки *Trifolium repens* L. / О. В. Лозинская, Н. Ю. Русак, С. Б. Мельнов // Экол. вестн. – 2014. – № 2. – С. 102–108.
16. Хох, А. Н. Оценка качества среды с использованием клевера лугового (*Trifolium pratense*) / А. Н. Хох, О. В. Лозинская, С. Б. Мельнов // Вестн. Полес. гос. ун-та. Сер. природовед. наук. – 2011. – № 2. – С. 3–7.
17. Клопова, Е. О. Оценка качества городской среды с помощью *Allium*-теста / Е. О. Клопова, А. Н. Хох, О. В. Лозинская // Сахаровские чтения 2012 года: экологические проблемы XXI века : материалы 12-й Междунар. науч. конф., Минск, 17–18 мая 2012 г. / М-во образования Респ. Беларусь ; под общ. ред. С. П. Кундаса, С. С. Позняка, Н. А. Лысухо. – Минск, 2012. – С. 324–325.
18. Игнатюк, Д. С. Использование *Allium*-test для оценки качества среды крупных промышленных центров на примере г. Минска / Д. С. Игнатюк, О. В. Лозинская // Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века : материалы 14-й Междунар. науч. конф., Минск, 29–30 мая 2014 г. / М-во образования Респ. Беларусь [и др.] ; под общ. ред. В. И. Дуная, С. С. Позняка, Н. А. Лысухо. – Минск, 2014. – С. 237.
19. Исаченко, Е. В. Использование цитогенетических показателей *Allium cepa* для оценки экологического состояния заповедных территорий Республики Беларусь / Е. В. Исаченко, О. В. Лозинская // Материалы 6-го Молодежного экологического конгресса «Северная Пальмира», Санкт-Петербург, 2–3 дек. 2014 г. / С.-Петерб. науч.-исслед. центр экол. безопасности Рос. акад. наук. – СПб., 2014. – С. 71–75.
20. Лозинская, О. В. Оценка содержания солей тяжелых металлов в почве и листьях березы повислой из естественных и антропогенно-измененных ландшафтов / О. В. Лозинская // Экол. вестн. – 2017. – № 2. – С. 43–51.

References

1. Bai X. Industrial ecology and the global impacts of cities. *Journal of Industrial Ecology*, 2007, vol. 11, no. 2, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1162/jie.2007.1296>
2. Zorina A. A., Korosov A. V. Characterization of a fluctuating asymmetry and a sheet of two types of birch trees in Karelia. *Ekologiya. Eksperimental'naya genetika i fiziologiya: trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Ecology. Experimental genetics and physiology: works of the Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences], 2007, vol. 11, pp. 28–36 (in Russian).
3. Sharygina N. V., Avdusheva A. V. Study of hereditary polymorphism of gray spots pattern on plant leaves in clover populations of *Trifolium repens*. *Ekologicheskie problemy Severa: mezhvuzovskii sbornik nauchnykh trudov* [Environmental problems of the North: intercollegiate collection of scientific papers]. Arkhangelsk, 2010, iss. 13, pp. 122–125 (in Russian).
4. Geras'kin S., Oudalova A., Michalik B., Dikareva N., Dikarev V. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of *Allium*-test. *Chemosphere*, 2011, vol. 83, iss. 8, pp. 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.008>
5. Zaznobina N. I. *Integral estimates of anthropogenic load on the urban environment as a heterotrophic ecosystem (on the example of cities of Nizhny Novgorod region)*. Abstract of Ph. D. diss. Nizhny Novgorod, 2008. 24 p. (in Russian).
6. Shadmanova T. Kh., Chuikov Yu. S. Ecological basis of bioindicative studies. *Astrakhanskii vestnik ekologicheskogo obrazovaniya* [Astrakhan bulletin of environmental education], 2012, no. 2, pp. 157–164 (in Russian).
7. Mandra Yu. A. *Plants as indicators of the ecological state of the resort region (on the example of the city of Kislovodsk)*. Abstract of Ph. D. diss. Moscow, 2010. 22 p. (in Russian).
8. Zakharov V. M., Chubinishvili A. T., Dmitriev S. G., Baranov A. S., Borisov V. I., Valetskii A. V., Krysanov E. Yu., Kryazheva N. G., Pronin A. V., Chistyakova E. K. *Environment health: practice of an assessment*. Moscow, Center for environmental policy of Russia, 2000. 317 p. (in Russian).
9. Ufimtseva M. D., Terekhina N. V. *The express phytoindication method for assessing the ecological state of the urban environment*. St. Petersburg State University, Publishing house of St. Petersburg State University, 2000. 29 p. (in Russian).
10. Prokhorova I. M., Komarova M. I., Fomicheva A. N. *Assessment of the mitotoxic and mutagenic action of environmental factors*. Yaroslavl, Publishing House of Yaroslavl State University, 2003. 32 p. (in Russian).
11. Lozinskaya O. V., Krizhevskaya A. I., Mel'nov S. B. Comparative analysis of the condition of copepopped birch (*Betula pendula* Roth.) growing in conditions with different levels of anthropogenic load. *Ekologicheskii vestnik* [Environmental bulletin], 2013, no. 4, pp. 103–108 (in Russian).
12. Melnov S., Lozinskaya O., Krapivina N. Integrated assessment of heavy metal pollution in big industrial. Materials of the «Experts Workshop» on Environmental forensics (12–16 September 2011, *Tbilisi, Georgia*). Tbilisi, 2011, pp. 53–58.
13. Kipen' V. N., Krapivina N. S., Sinevich E. A., Baranov A. S., Mel'nov S. B., Lozinskaya O. V. Influence of radiation factor on the degree of fluctuating asymmetry in *Betula pendula*. *Radiatsiya i ekosistemy: Materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii* [Radiation and Ecosystems: Materials of International scientific conference]. Gomel, 2008, pp. 222–225 (in Russian).
14. Kulinich A. V., Lozinskaya O. V. Application of morphological and cytogenetic parameters of plant test systems for evaluating the quality of the environment (for example, the Berezinsky biosphere reserve). *Sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya osobo okhranyaemykh prirodnykh territorii Respubliki Belarus': materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (poselok Domzheritsy, 24–26 sentyabrya 2012 goda)* [The current state and prospects for the development of specially protected natural territories of the Republic of Belarus: materials of the International scientific-practical conference (Domzheritsy village, September 24–26, 2012)]. Minsk, 2012, pp. 164–167 (in Russian).
15. Lozinskaya O. V., Rusak N. Yu., Mel'nov S. B. Estimation of ecological state of urbocenoses on the basis of polymorphism of leaf blades *Trifolium repens* L. *Ekologicheskii vestnik* [Environmental bulletin], 2014, no. 2, pp. 102–108 (in Russian).
16. Khokh A. N., Lozinskaya O. V., Mel'nov S. B. Assessment of the quality of the environment with the use of red clover (*Trifolium pratense*). *Vestnik Poleskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskikh nauk* [Bulletin of Polesye State University. Series of Natural Sciences], 2011, no. 2, pp. 3–7 (in Russian).
17. Klopova E. O., Khokh A. N., Lozinskaya O. V. Evaluation of the quality of the urban environment with *Allium*-test. *Sakharovskie chteniya 2012 goda: ekologicheskie problemy XXI veka: materialy 12-i Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, Minsk, 17–18 maya 2012 goda* [Sakharov Readings 2012: Environmental problems of the 21st century: proceedings of the 12th International scientific conference, Minsk, May 17–18, 2012]. Minsk, 2012, pp. 324–325 (in Russian).
18. Ignatyuk D. S., Lozinskaya O. V. The use of *Allium*-test to assess the quality of the environment of large industrial centers on the example of Minsk. *Sakharovskie chteniya 2014 goda: ekologicheskie problemy XXI veka: materialy 14-i Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, Minsk, 29–30 maya 2014 goda* [Sakharov Readings 2014: Environmental problems of the 21st century: proceedings of the 14th International scientific conference, Minsk, May 29–30, 2014]. Minsk, 2014, p. 237 (in Russian).
19. Isachenko, E. V., Lozinskaya O. V. The use of cytogenetic indicators *Allium cepa* to assess the ecological status of reserved areas of the Republic of Belarus. *Materialy 6-go Molodezhnogo ekologicheskogo kongressa «Severnaya Pal'mira», Sankt-Peterburg, 2–3 dekabrya 2014 goda* [Proceedings of the 6th Youth ecological congress “Northern Palmira”, St. Petersburg, 2–3 December. 2014]. St. Petersburg, 2014, pp. 71–75 (in Russian).
20. Lozinskaya O. V. Assessment of the content of heavy metal salts in the soil and birch leaves from natural and anthropogenically altered landscapes. *Ekologicheskii vestnik* [Environmental bulletin], 2017, no. 2, pp. 43–51 (in Russian).

Информация об авторах

Лозинская Ольга Владиславовна – ст. преподаватель. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aromia@ Rambler.ru

Мельнов Сергей Борисович – д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный университет физической культуры (пр. Победителей, 105, 220020, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sbmelnov@ Rambler.ru

Сергеева Татьяна Павловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sergeeva.t57@gmail.com

Кипень Вячеслав Николаевич – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: slavakipen@ Rambler.ru

Information about the authors

Olga V. Lozinskaya – Senior lecturer. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aromia@ Rambler.ru

Sergey B. Melnov – D. Sc. (Biol.), Professor. Belarusian State University of Physical Education (105, Pobeditelei Ave., 220020, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sbmelnov@ Rambler.ru

Tatyana P. Sergeeva – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sergeeva.t57@gmail.com

Vyacheslav N. Kipen – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: slavakipen@ Rambler.ru

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

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.3; 577.113.8
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-374-384>

Поступила в редакцию 23.01.2019
Received 23.01.2019

**В. М. Абашкин¹, И. В. Галец-Буй¹, О. Г. Дмитрук¹, М. Брышевска², Д. Г. Щербин¹,
М. Одабаши³, О. Ацет³, Б. Онал³, Н. Оздемир⁴**

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

²*Лодзьский университет, Лодзь, Польша*

³*Университет Аксарай, Аксарай, Турция*

⁴*Университет Эрцйие, Кайсери, Турция*

**ГИБРИДНЫЕ МЕТАЛЛ-ОРГАНИЧЕСКИЕ НАНОЦВЕТЫ
И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

Аннотация. Среди всего разнообразия современных наноматериалов можно выделить особый класс – наноцветы. Интерес ученых к данным наноструктурам обусловлен наличием у последних специфической топографии нанослоев, особое расположение которых позволяет получить значительно большее отношение площади поверхности к объему, чем у классических сферических наночастиц, что существенно увеличивает эффективность реакций на поверхности наноцветов. Основной способ применения наноцветов – использование их в качестве стабилизаторов ферментов. Последние представляют собой биосистемы с высокой активностью и субстратной специфичностью, но их использование ограничено высокой чувствительностью к среде, низкой воспроизводимостью экспериментальных результатов и наличием требований к комплексной очистке составляющих. Чтобы улучшить функционирование ферментов в различных условиях, разработаны органико-неорганические гибридные наноматериалы (название отражает связь неорганических компонентов в наночастицах с органическими материалами). Указанные наночастицы могут быть использованы в катализе, в качестве биосенсоров, а также для доставки лекарств. Это дало толчок развитию новой отрасли химии – химии гибридных наноматериалов, бурно развивающейся в настоящее время. Таким образом, изучение органико-неорганических гибридных нанокристаллов в области химии ферментных систем будет способствовать быстрому развитию бионаноматериалов и новых отраслей биотехнологии.

Ключевые слова: гибридные наноцветы, синтез, катализ, биосенсоры

Для цитирования: Гибридные металл-органические наноцветы и их применение в биотехнологии / В. М. Абашкин [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 374–384. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-374-384>

**V. M. Abashkin¹, I. V. Halets-Bui¹, V. G. Dzmitruk¹, M. Bryszewska², D. G. Shcharbin¹,
M. Odabaşı³, Ö. Acet³, B. Önal³, N. Özdemir⁴**

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

²*University of Lodz, Lodz, Poland*

³*Aksaray University, Aksaray, Turkey*

⁴*Erciyes University, Kayseri, Turkey*

HYBRIDE METALL-ORGANIC NANOFLOWERS AND THEIR APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY

Abstract. Among the variety of modern nanomaterials a special class – nanoflowers can be distinguished. These new nanostructures have induced the interest of scientists due to the topographic features of nanolayers, the special location of which allows a higher surface-to-volume ratio compared to classical spherical nanoparticles. Such topographic structure significantly increases the efficiency of surface reactions for nanoflowers. The main purpose of this type of nanomaterials is their use as enzyme stabilizers. Enzymes are biosystems with high activity and substrate specificity, but their use is limited by certain disadvantages, such as high sensitivity to the environment, low reproducibility of experimental results and requirements for complex purification of the components. To facilitate the functioning of enzymes in various conditions, organic-inorganic hybrid nanomaterials have been developed, the name of which indicates that all components of inorganic nanoparticles are associated with organic materials. These nanoparticles have numerous promising applications in catalysis,

as biosensors, and for drug delivery. Organic-inorganic hybrid nanoflowers have led to the development of a new branch of chemistry – the chemistry of hybrid nanomaterials, whose research is currently undergoing rapid development. Thus, the study of organic-inorganic hybrid nanocrystals can lead to new creative solutions in the field of chemistry of enzyme systems and the rapid development of bionanomaterials and new branches of biotechnology.

Keywords: hybride nanoflowers, synthesis, catalysis, biosensors

For citation: Abashkin V. M., Halets-Bui I. V., Dzmitruk V. G., Bryszewska M., Shcharbin D. G., Odabasi M., Acet O., Onal B., Ozdemir N. Hybride metall-organic nanoflowers and their applications in biotechnology. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 374–384 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-374-384>

Введение. Наноцветы – особый класс наноматериалов, которые в последние годы привлекают все большее внимание благодаря своим уникальным топографическим особенностям. Нанослои таких наночастиц представляют своего рода лепестки (благодаря чему наноцветы и получили свое название), особое расположение которых, в отличие от классических сферических наночастиц, позволяет получить большую площадь поверхности при малом объеме (рис. 1). Данное свойство существенно увеличивает эффективность возможных реакций на поверхности наноцветов.

Несмотря на растущий интерес к наноцветам, им пока не уделяется должного внимания, что обусловлено в первую очередь сложным, многоэтапным синтезом, сопряженным с работой в условиях высоких температур и давления, и необходимостью использования высокотоксичных органических растворителей. К тому же морфологические особенности наноцветов трудно контролировать, что в настоящее время также является препятствием для их широкого применения в биохимии. Основным способом применения наноцветов является их использование в качестве стабилизаторов ферментов. Последние представляют собой биосистемы с высокой активностью и субстратной специфичностью, но их использование ограничено высокой чувствительностью к среде, низкой воспроизводимостью экспериментальных результатов и наличием требований к комплексной очистке составляющих. Чтобы улучшить функционирование ферментов в различных условиях, разработаны органико-неорганические гибридные наноматериалы (название отражает связь неорганических компонентов в наночастицах с органическими материалами). Такие нанобиоматериалы могут найти широкое применение: в катализе [1–4], в качестве биосенсоров [5–8], а также для доставки лекарств [9–12]. Ферменты имеют сильное сродство к металлам ионов в качестве кофактора, и, таким образом, стабильность белков обычно усиливается при иммобилизации на поверхности металла путем таких взаимодействий, как аффинность заряда,

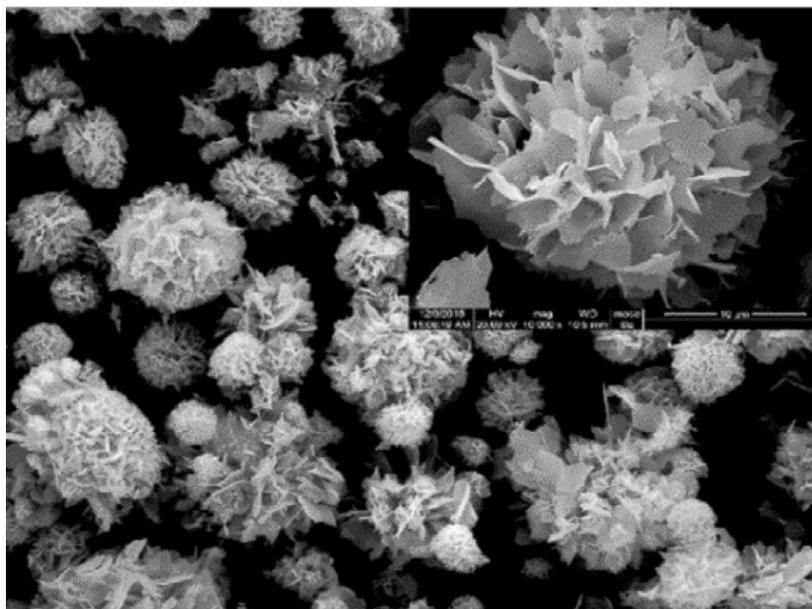


Рис. 1. Внешний вид наноцветов

Fig. 1. Appearance of nanoflowers

ковалентные и структурные связи [13, 14]. Однако иммобилизованные белки проявляют более низкую активность, чем свободные ферменты, в первую очередь из-за потери их активности вследствие изменения ориентации во время процесса иммобилизации и ограничения ферментативной активности [15–18]. С целью решения данной проблемы предложены наночастицы и наногели с иммобилизованными белками [19]. Эффективность функционирования ферментов в этих наночастицах и наногелях может составлять 60–90 % по сравнению с таковой у свободных ферментов, а в некоторых случаях даже превышать ее. Установлено, что активность фермента, адсорбированного на наночастице, выше, чем у свободного фермента, только у фосфорорганической гидролазы в мезопористом кремнеземе. В сочетании со данной наночастицей гидролаза показала активность в 2 раза более высокую по сравнению со свободной гидролазой в растворе [19]. У трипсина, который представляет собой гидролизующий фермент, иммобилизация на твердой основе увеличивает его каталитическую эффективность в тысячи раз по сравнению со свободным трипсином [20]. Однако для данных сложных систем характерна такая проблема, как потеря ферментных свойств.

Для преодоления указанных выше недостатков в последнее время разработан новый подход к легкому и безопасному синтезу гибридных наноматериалов [21]. Последние можно изготовить путем добавления белков в раствор ионов металлов, что не требует использования каких-либо токсичных элементов или создания экстремальных жестких условий синтеза. При этом органическое вещество, участвующее в синтезе, потребует меньшего количества манипуляций, чем при использовании других традиционных методов для поддержания активности иммобилизованного фермента. Цветоподобные гибридные наноматериалы, генерируемые при таком синтезе, называются органико-неорганическими гибридными наночетками или гибридными наночетками. Механизм их синтеза, физические свойства, активность белка, стабильность и воспроизводимость в настоящее время активно изучаются. Предметом исследования является также возможность их применения *in vivo* в белковых комплексах, для серологических исследований, в качестве биосенсоров.

Биокатализаторы на основе наночеток из меди и белков. Поскольку разработка гибридных наночеток началась с использования меди и белков, именно эти типы наночеток были изучены в первую очередь [21–25]. Результаты исследований гибридных наночеток, которые впервые были синтезированы Ge с соавт. [21], подтвердили, что с помощью ионов меди и белков может быть создан новый вид наночеток. Впоследствии авторы синтезировали четыре типа гибридных наночеток, используя α -лактальбумин, лакказы, карбоангидразу и липазу соответственно. Синтезированные гибридные нанокристаллы использовали для обнаружения фенолов и окисления катехоламинов. Ферментативная активность наночеток оказалась равной активности свободных ферментов в растворе или превосходила ее (95–650 %). Увеличение эффективности катализа было обусловлено следующими факторами: (i) большей площадью поверхности нанослоя, которая не вызывает ограничений массопереноса; (ii) кооперативным взаимодействием захваченных ферментных молекул; (iii) взаимным влиянием фермента и микроокружения наночетки, который содержит ионы металлов (например, ионы Cu^{2+} в наночетках могут усилить активность лакказы). Кроме того, исследователи разработали упрощенный фенольный детектор, содержащий фильтр-шприц с адсорбированными гибридными наночетками лакказы [22]. Смесь водного фенола и 4-аминоантипирина вводили в фильтр с нанослойным покрытием, используя шприц, и хранили в фильтровальной камере в течение 5 мин. Высокая активность лакказы в составе наночеток обеспечивала быстрое окислительное взаимодействие фенола с 4-аминоантипирином для получения антипириновых красителей. Продукт далее выталкивали из шприца и анализировали, используя спектрофотометр UV/Vis. Обнаружение фенола с помощью этого метода происходило быстрее, чем при применении газовой хроматографии или жидкостной хроматографии. Кроме того, применение данного метода облегчало повторное использование фильтра в течение примерно 1 мес. из-за высокой стабильности фермента в наночетках. Sun с соавт. [23] синтезировали мультиферментные гибридные наночетки, используя глюкозооксидазу и пероксидазу хрена, что продемонстрировало возможность включения двух и более ферментов в единую гибридную наносистему (рис. 2).

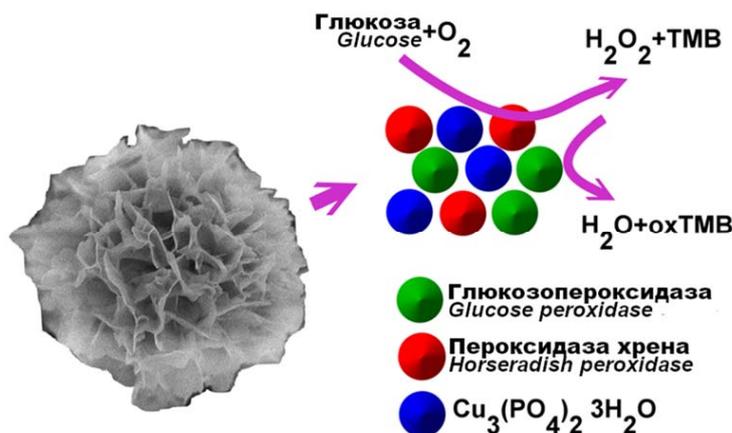


Рис. 2. Гибридные наночастицы на основе меди, глюкозооксидазы и пероксидазы хрена. TMB – 3,3',5,5' – тетраметилбензидин, oxTMB – окисленный 3,3',5,5'-тетраметилбензидин [23]

Fig. 2. Hybrid nanoflowers based on copper, glucose oxidase and horseradish peroxidase. TMB – 3,3',5,5' – tetramethylbenzidine, oxTMB – oxidized 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine [23]

В более поздних работах описана совместная иммобилизация нескольких ферментов с помощью таких сравнительно сложных процессов, как ковалентное шивание [26], инкапсулирование [27], формирование гибридных генов [28] и последующая конъюгация посттрансляционного фермента [29].

Как известно, в настоящее время для эффективной идентификации полученных после синтеза белков предпочтение отдают методам, основанным на протеолизе данных белков. Как правило, протеолиз проводят, используя свободные ферменты (трипсин, хемотрипсин и др.), однако такой анализ имеет ограничения, такие как длительное время гидролиза, аутолиз, низкая стабильность под воздействием факторов окружающей среды, разнообразие полученных пептидов, трудности идентификации аминокислотных последовательностей. Для преодоления этих барьеров предложено использовать трипсин, иммобилизованный на наночастицах. Гибридный наночастица на основе трипсина, выступающего в роли иммобилизованного фермента, впервые был предложен Lin с соавт. [24] с целью получения высокой протеолитической эффективности, хорошей стабильности фермента и повторного использования, а также короткого времени ферментации. Кроме того, активность ферментного компонента гибридного наночастица была сравнима с таковой у свободных ферментов. В работе [25] приведено описание синтеза гибридного наночастица с помощью ионов меди и пероксидазы хрена для обнаружения перекиси водорода и фенола. Гибридный наночастица был использован в качестве катализатора в реакции перекиси водорода и фенола в присутствии 4-аминоантипирина. Установлено, что изменение цвета продукта можно обнаружить при минимальных концентрациях перекиси водорода (0,5 мкМ) и фенола (1 мкМ). Таким образом, предел обнаружения, установленный с использованием гибридного наночастица, соответствовал таковому при определении загрязнения воды. Напротив, предел обнаружения для перекиси водорода и фенола с использованием свободной пероксидазы хрена составлял 20 и 10 мкМ соответственно. Ферментативная активность гибридного наночастица усиливалась за счет большой площади поверхности, что облегчало контакт с реагентами. Кроме того, скорость ферментативного окисления тетраметилбензидина при помощи гибридного наночастица на основе пероксидазы хрена была в 5 раз выше, чем у свободной пероксидазы (5 и 25 мин соответственно). Полученные результаты показали, что изучение гибридных наночастица позволит разработать способы высокочувствительного колориметрического зондирования [25].

Стабилизация активной формы амилазы на основе кальциевых гибридных наночастица.

Синтез наночастица на основе кальция описывается в литературе гораздо реже, чем синтез аналогичных структур на основе меди [30, 31]. Гибридный нанокристалл на основе фосфата кальция был синтезирован Vang с соавт. [30] с помощью того же метода, который применялся для синтеза медных наночастица. В качестве органической компоненты в работе использовали фермент

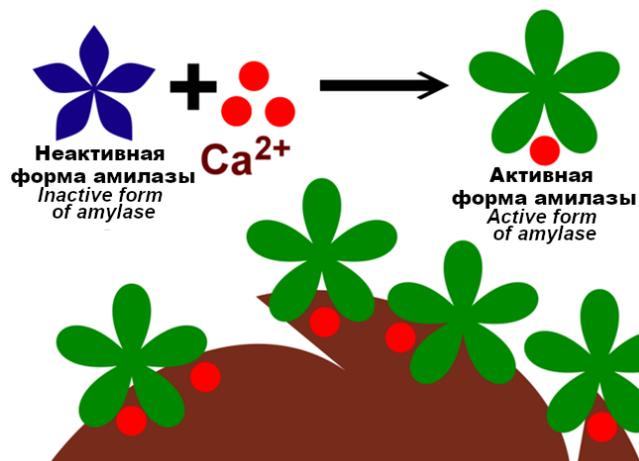


Рис. 3. Аллостерический эффект α -амилазы: α -амилаза переходит из неактивной формы в активную после связывания ионов кальция. Имобилизация на нанокристалле CaHPO_4 активует амилазу [30]

Fig. 3. Allosteric effect of α -amylase: α -amylase goes from inactive to active form after binding calcium ions. Immobilization on a CaHPO_4 nanocrystal activates amylase [30]

α -амилазу, которая в отсутствие ионов кальция обычно находится в неактивном состоянии (функциональный сайт ингибируется) (рис. 3). При наличии в растворе ионов кальция они занимают аллостерический сайт α -амилазы, что влияет на структуру функционального сайта. При синтезе гибридного наноцветка на основе кальция альфа-амилазы осуществляется связывание ионов кальция с амилазой, что приводит к активности последней в течение более длительного времени, чем фермента в свободном виде. Таким образом, показано, что химическое взаимодействие между белком и наноматериалами может улучшить функциональность белка в данной среде [30]. Результаты изучения гибридного наноцветка на основе кальция представлены также в работе [31], где исследователи использовали для синтеза раствор, содержащий хитозан и триполифосфат, из которых затем изготавливали гелевый композит, формирующийся за счет иотропного гелеобразования. После этого к полученному гелю добавляли ионы кальция, что вызывало биоминерализацию и способствовало окончательному формированию структуры наноцветков. Этот метод основан на новом подходе, обеспечивающем генерирование нанослоев с помощью разнообразных органических веществ. При добавлении каталазы на втором этапе синтеза вместе с ионами кальция каталаза успешно иммобилизовалась на поверхности наноцветков и сохраняла ферментативную активность на том же уровне.

Биосенсоры на основе наноцветков из марганца и белков. Как компонент нового электрохимического биосенсора для обнаружения рактопамина, способного вызвать острое отравление, были синтезированы гибридные нанокристаллы на основе фосфата марганца [32]. На сегодняшний день имеется множество аналитических методов, позволяющих обнаружить рактопамин. Это, например, жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия [33, 34], газовая хроматография и тандемная масс-спектрометрия [35], высокоэффективная жидкостная хроматография [36] и биоанализ [37]. Однако все эти методы довольно дорогостоящи вследствие высокой стоимости оборудования и расходных материалов, а сам анализ занимает продолжительное время. В качестве альтернативы применяют электрохимические методы, которые предполагают использование фенольной гидроксильной группы, для того чтобы рактопамин был электрохимически активным [38]. Тем не менее, низкая реакционная активность рактопамина на поверхности электродов также накладывает ограничения на использование данных методов. С помощью гибридного наноцветка как нового электрохимического биосенсора указанные выше недостатки могут быть преодолены. Представленная наночастица состоит из нанослоев марганца и одного из трех белков: иммуноглобулина G, рактопаминового антитела и бычьего сывороточного альбумина. Пределы обнаружения разработанных электрохимических биосенсоров – 4,6, 9,3 и 26 мкг/мл соответственно [38–40].

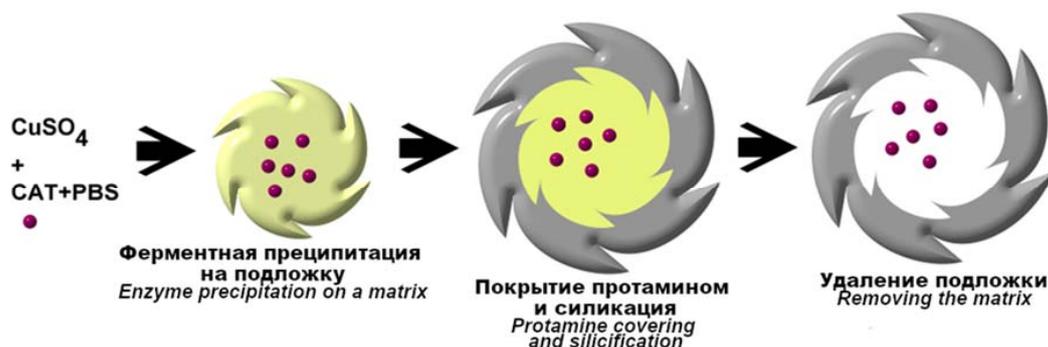


Рис. 4. Схема приготовления гибридных нанокapsул. CAT – каталаза; PBS – буфер

Fig. 4. The scheme of preparation of hybrid nanocapsules. CAT – catalase; PBS – buffer

Наноцветы на основе меди и ДНК. Ни с соавт. [41] использовали в качестве органического компонента гибридных наноцветов не белок, а ДНК. Поскольку ДНК хорошо растворима в водной среде и имеет высокое содержание атомов азота, она может быть использована для связывания наноцветов ионами металлов. Гибридная морфология поверхности, конъюгированной с ДНК, была применена для создания наночастиц, что позволило при помощи эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) получать изображения клеток с высоким разрешением, а также отслеживать доставку лекарственных средств в клетки. Исследователи создали структуру на основе произвольной последовательности ДНК, лекарственного средства и трех флуоресцентных красителей, а затем синтезировали медный гибридный наноцветок, конъюгированный с указанной выше ДНК. За счет того, что выбранные исследователями красители при облучении одной и той же длиной волны возбуждения флуоресцировали на разных длинах волн, полученная структура была способна давать так называемое мультифлуоресцентное излучение в результате резонансного переноса, при этом частота возбуждения приходилась на длинноволновую область, что позволило минимизировать влияние возбуждающего излучения на клетки. В результате исследователям удалось получить изображения клеток с высоким разрешением на основе FRET между красителями. Кроме того, с помощью этой системы при включении в нее исследуемого лекарственного препарата можно отслеживать путь его доставки в живые клетки.

Нанослойные ферментные капсулы. В отличие от гибридных наноцветов, нанослойные ферментные капсулы (рис. 4) были синтезированы Jiang с соавт. [42, 43] при помощи покрытия исходного наноцветка протамином и диоксидом кремния и последующего удаления металла из ядра полученной наночастицы. Поскольку шероховатая поверхность капсулы облегчает адсорбцию субстратов, ферментативная активность у нанослойных капсул значительно более высокая, а их стабильность в экстремальных условиях (высокая температура, широкий диапазон pH, длительное хранение) гораздо выше по сравнению с обычными гибридными наноцветами. Эти свойства обеспечивают высокую практическую значимость капсул для катализа и создания лекарственных средств доставки.

Заклучение. Бурное развитие нанотехнологии и наноматериалов привело к их глубокому проникновению в традиционные отрасли наук, в частности в химию ферментных систем. Если ранее иммобилизация ферментов, как правило, приводила к потере активности, то в настоящее время применение наноматериалов для их стабилизации не только не приводит к снижению их активности, но может даже существенно ее увеличивать. Целый ряд исследований направлен на применение гибридных наноматериалов для разработки лекарств, биосенсоров, биокатализаторов и бионанопустройств. Активно разрабатываются новые принципы синтеза нанокристаллов, новые виды гибридных наноцветов и новые способы их применения. Изучение органико-неорганических гибридных наноцветов дало толчок развитию новой отрасли химии – химии гибридных наноматериалов, что будет способствовать новым разработкам в области химии ферментных систем и быстрому развитию бионаноматериалов и новых отраслей биотехнологии.

В связи с обозначенными свойствами наночастиц интересно их сравнение с дендримерами [44–46]. Оба вида наночастиц представляют собой сферические структуры, имеющие гиперразветвленную (дендримеры) или гиперпластинчатую (наноцветы) морфологию, способствующую высокой сорбционной активности. У дендримеров, в отличие от наноцветов, имеется активное ядро, которое может влиять на их функциональность. Эти свойства позволяют использовать дендримеры в тех же областях, что и наноцветы, а именно при создании биосенсоров, в системах катализа или доставки лекарств. Уже сегодня на основе дендримеров разработаны новые контрастные агенты для магнитнорезонансной терапии и новые дендритные контейнеры для лекарств [46–48]. Кроме того, проводятся многочисленные исследования, позволяющие использовать дендримеры в ферментативном катализе, тканевой инженерии и при разработке высокочувствительных био- и наносенсоров. Все вышеперечисленное свидетельствует о том, что дендримеры и наноцветы имеют много точек соприкосновения в плане применимости данных типов наночастиц в различных областях биотехнологий.

В Республике Беларусь уже на протяжении длительного времени изучением дендримеров как инструмента нанобиотехнологической отрасли занимаются в лаборатории нанобиотехнологий Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Совместно с исследователями из Аксарайского университета (Турция) в лаборатории нанобиотехнологий проводятся исследования медных и цинковых нанокристаллов с целью изучения биосовместимости, механизмов действия, а также выяснения возможностей применения данных наночастиц в медицинской химии и биотехнологических приложениях.

Благодарности. Данная работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, гранты Б18ТЮБ-001, Б18ПЛШГ-004, Технологическим научным советом Турции (TUBITAK) номер гранта 118Z037, NAWA IAP, грант EUROPARTNER, No. PPI/APM/2018/1/00007/U/001, Государственной программой РБ “Инновационные биотехнологии – 2020”, мероприятие 43.

Acknowledgements. This work was supported by grants Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (B18TUB-001, B18PLSHG-004, NAWA IAP, grant EUROPARTNER, No. PPI/APM/2018/1/00007/U/001, State Program “Innovative Biotechnologies-2020” grant number 43); by grant Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) number 118Z037.

Список использованных источников

1. Kouassi, G. K. Examination of cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles / G. K. Kouassi, J. Irudayaraj, G. McCarty // *J. Nanobiotechnol.* – 2005. – Vol. 3, N 1. – P. 1. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-1>
2. Nickelimpregnated silica nanoparticle synthesis and their evaluation for biocatalyst immobilization / R. S. Prakasham [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 160, N 7. – P. 1888–1895. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8726-5>
3. Ding, H. Porous silica nano-tube as host for enzyme immobilization / H. Ding, L. Wen, J. Chen // *China Particuol.* – 2004. – Vol. 2, N 6. – P. 270–273. [https://doi.org/10.1016/S1672-2515\(07\)60073-6](https://doi.org/10.1016/S1672-2515(07)60073-6)
4. Ansari, S. A. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review / S. A. Ansari, Q. Husain // *Biotechnol. Adv.* – 2012. – Vol. 30, N 3. – P. 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>
5. Wang, R. Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds / R. Wang, Z. Tian, L. Chen // *Int. J. Pharm.* – 2011. – Vol. 406, N 1–2. – P. 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.039>
6. Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-coglycolide) insulin nanoparticles / P. S. Kumar [et al.] // *Pharmazie.* – 2006. – Vol. 61, N 7. – P. 613–617.
7. Nano-inside-micro: disease-responsive microgels with encapsulated nanoparticles for intracellular drug delivery to the deep lung / P. Wanakule [et al.] // *J. Control. Release.* – 2012. – Vol. 162, N 2. – P. 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.026>
8. Self-assembling peptide amphiphile-based nanofiber gel for bioresponsive cisplatin delivery / J.-K. Kim [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2009. – Vol. 6, N 3. – P. 978–985. <https://doi.org/10.1021/mp900009n>
9. Njagi, J. Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au-polypyrrole nanocomposites / J. Njagi, S. Andreescu // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – Vol. 23, N 2. – P. 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.03.028>
10. Lin, J. Disposable biosensor based on enzyme immobilized on Au-chitosan-modified indium tin oxide electrode with flow injection amperometric analysis / J. Lin, W. Qu, S. Zhang // *Anal. Biochem.* – 2007. – Vol. 360, N 2. – P. 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.10.030>
11. An enzyme immobilization platform for biosensor designs of direct electrochemistry using flower-like ZnO crystals and nano-sized gold particles / Y. W. Zhang [et al.] // *J. Electroanal. Chem.* – 2009. – Vol. 627, N 1–2. – P. 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.12.010>
12. Takhistov, P. Electrochemical synthesis and impedance characterization of nano-patterned biosensor substrate / P. Takhistov // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – Vol. 19, N 11. – P. 1445–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.08.015>

13. Sassolas, A. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors / A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier // *Biotechnol. Adv.* – 2012. – Vol. 30, N 3. – P. 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
14. Datta, S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials / S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram // *3 Biotech.* – 2013. – Vol. 3, N 1. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
15. Kim, J. Nanobiocatalysis and its potential applications / J. Kim, J. W. Grate, P. Wang // *Trend Biotechnol.* – 2008. – Vol. 26, N 11. – P. 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.009>
16. Recent advances in nanostructured biocatalysts / J. Ge [et al.] // *Biochem. Eng. J.* – 2009. – Vol. 44, N 1. – P. 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.01.002>
17. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support / H. R. Luckarift [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22, N 2. – P. 211–213. <https://doi.org/10.1038/nbt931>
18. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports / C. Mateo [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2007. – Vol. 2, N 5. – P. 1022–1033. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.133>
19. Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support / C. Lei [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124, N 38. – P. 11242–11243. <https://doi.org/10.1021/ja026855o>
20. Dulay, M. T. Enhanced proteolytic activity of covalently bound enzymes in photopolymerized sol gel / M. T. Dulay, Q. J. Baca, R. N. Zare // *Anal. Chem.* – 2005. – Vol. 77, N 14. – P. 4604–4610. <https://doi.org/10.1021/ac0504767>
21. Ge, J. Protein–inorganic hybrid nanoflowers / J. Ge, J. Lei, R. N. Zare // *Nat. Nanotechnol.* – 2012. – Vol. 7, N 7. – P. 428–432. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.80>
22. Rapid detection of phenol using a membrane containing laccase nanoflowers / L. Zhu [et al.] // *Chem. Asian J.* – 2013. – Vol. 8, N 10. – P. 2358–2360. <https://doi.org/10.1002/asia.201300020>
23. Multi-enzyme coembedded organic–inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor / J. Sun [et al.] // *Nanoscale.* – 2014. – Vol. 6, N 1. – P. 255–262. <https://doi.org/10.1039/C3NR04425D>
24. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion / Z. Lin [et al.] // *RSC Adv.* – 2014. – Vol. 4, N 27. – P. 13888–13891. <https://doi.org/10.1039/C4RA00268G>
25. Facile synthesis of enzyme–inorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol / Z. Lin [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interf.* – 2014. – Vol. 6, N 13. – P. 10775–10782. <https://doi.org/10.1021/am502757e>
26. One-pot construction of mediatorless bi-enzymatic glucose biosensor based on organic–inorganic hybrid / K. M. Manesh [et al.] // *Biosens Bioelectron.* – 2010. – Vol. 25, N 7. – P. 1579–1586. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.11.015>
27. Cascade reactions in an all-enzyme nanoreactor / G. Delaittre [et al.] // *Chem. Eur. J.* – 2009. – Vol. 15, N 46. – P. 12600–12603. <https://doi.org/10.1002/chem.200902063>
28. Multimeric hemicellulases facilitate biomass conversion / Z. Fan [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75, N 6. – P. 1754–1757. <https://doi.org/10.1128/AEM.02181-08>
29. Intramolecular electron transfer in a cytochrome P450cam system with a site-specific branched structure / H. Hirakawa [et al.] // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2007. – Vol. 20, N 9. – P. 453–459. <https://doi.org/10.1093/protein/gzm045>
30. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance / L. B. Wang [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135, N 4. – P. 1272–1275. <https://doi.org/10.1021/ja3120136>
31. Facile one-pot preparation of chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers / X. Wang [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interf.* – 2014. – Vol. 6, N 16. – P. 14522–14532. <https://doi.org/10.1021/am503787h>
32. Manganese(II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine / Z. Zhang [et al.] // *Sens Actuat B Chem.* – 2015. – Vol. 211. – P. 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.106>
33. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry / J. Blanca [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 529, N 1–2. – P. 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.061>
34. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry / E. Shishani [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – Vol. 483, N 1–2. – P. 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00120-X)
35. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography–mass spectrometry / L. He [et al.] // *Anim. Feed Sci. Technol.* – 2007. – Vol. 132, N 3–4. – P. 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.013>
36. Shelver, W. L. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA / W. L. Shelver, D. J. Smith // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51, N 13. – P. 3715–3721. <https://doi.org/10.1021/jf021175q>
37. Development of indirect competitive immunoassay for highly sensitive determination of ractopamine in pork liver samples based on surface plasmon resonance sensor / M. Liu [et al.] // *Sens Actuat B Chem.* – 2012. – Vol. 161, N 1. – P. 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.09.078>
38. Electrochemical sensor for toxic ractopamine and clenbuterol based on the enhancement effect of graphene oxide / C. Wu [et al.] // *Sens Actuat B Chem.* – 2012. – Vol. 168. – P. 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.084>
39. Glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles for ractopamine and metaproterenol sensing / J. H. Duan [et al.] // *Chem. Phys. Lett.* – 2013. – Vol. 574. – P. 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.04.057>
40. A label-free impedimetric immunosensor for detection of 1-aminohydantoin residue in food samples based on sol–gel embedding antibody / W. Jin [et al.] // *Food Control.* – 2014. – Vol. 39. – P. 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.001>
41. DNA nanoflowers for multiplexed cellular imaging and traceable targeted drug delivery / R. Hu [et al.] // *Angew Chem. Int. Ed.* – 2014. – Vol. 53, N 23. – P. 5821–5826. <https://doi.org/10.1002/ange.201400323>

42. Preparation and enzymatic application of flower-like hybrid microcapsules through a biomimetic mineralization approach / J. F. Shi [et al.] // *J. Mater. Chem. B*. – 2014. – Vol. 2, N 27. – P. 4289–4296. <https://doi.org/10.1039/C4TB00507D>
43. Constructing inorganic shell onto LBL microcapsule through biomimetic mineralization: a novel and facile method for fabrication of microbioreactors / J. Li [et al.] // *Soft Matter*. – 2010. – Vol. 6, N 3. – P. 542–550. <https://doi.org/10.1039/B918218G>
44. Cytotoxicity, haematotoxicity and genotoxicity of high molecular arborescent polyoxyethylene with polyglycidol block containing shell / B. Klajnert [et al.] // *Cell Biol. Inter.* – 2006. – Vol. 30, N 3. – P. 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.10.026>
45. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action / V. Dzmitruk [et al.] // *Inter. J. Pharm.* – 2015 – Vol. 485, N 1–2. – P. 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.034>
46. Shcharbin, D. Poly(amidoamine) dendrimer complexes as a platform for gene delivery / D. Shcharbin, A. Shakhbazau, M. Bryszewska // *Expert Opinion Drug Delivery*. – 2013. – Vol. 10, N 12. – P. 1687–1698. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.853661>
47. Dendrimers show promise for siRNA and microRNA therapeutics / V. Dzmitruk [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 10, N 3. – P. 126. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030126>
48. Dendrimer-protein interactions versus dendrimer-based nanomedicine / D. Shcharbin [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2017. – Vol. 152. – P. 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.041>

References

1. Kouassi G. K., Irudayaraj J., McCarty G. Examination of cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 2005, vol. 3, no. 1, p. 1. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-1>
2. Prakasham R. S., Devi G. S., Rao C. S., Sivakumar V. S., Sathish T., Sarma P. N. Nickelimpregnated silica nanoparticle synthesis and their evaluation for biocatalyst immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, vol. 160, no. 7, pp. 1888–1895. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8726-5>
3. Ding H., Wen L., Chen J. Porous silica nano-tube as host for enzyme immobilization. *China Particuology*, 2004, vol. 2, no. 6, pp. 270–273. [https://doi.org/10.1016/S1672-2515\(07\)60073-6](https://doi.org/10.1016/S1672-2515(07)60073-6)
4. Ansari S. A., Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnology Advances*, 2012, vol. 30, no. 3, pp. 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>
5. Wang R., Tian Z., Chen L. Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, vol. 406, no. 1–2, pp. 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.039>
6. Kumar P. S., Ramakrishna S., Saini T. R., Diwan P. V. Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-coglycolide) insulin nanoparticles. *Pharmazie*, 2006, vol. 61, no. 7, pp. 613–617.
7. Wanakule P., Liu G. W., Fleury A. T., Roy K. Nano-inside-micro: disease-responsive microgels with encapsulated nanoparticles for intracellular drug delivery to the deep lung. *Journal of Controlled Release*, 2012, vol. 162, no. 2, pp. 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.026>
8. Kim J.-K., Anderson J., Jun H.-W., Repka M. A., Jo S. Self-assembling peptide amphiphile-based nanofiber gel for bioresponsive cisplatin delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, vol. 6, no. 3, pp. 978–985. <https://doi.org/10.1021/mp900009n>
9. Njagi J., Andreescu S. Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au-polypyrrole nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, vol. 23, no. 2, pp. 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.03.028>
10. Lin J., Qu W., Zhang S. Disposable biosensor based on enzyme immobilized on Au-chitosan-modified indium tin oxide electrode with flow injection amperometric analysis. *Analytical Biochemistry*, 2007, vol. 360, no. 2, pp. 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.10.030>
11. Zhang Y. W., Zhang Y., Wang H., Yan B., Shen G. L., Yu R. Q. An enzyme immobilization platform for biosensor designs of direct electrochemistry using flower-like ZnO crystals and nano-sized gold particles. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2009, vol. 627, no. 1–2, pp. 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.12.010>
12. Takhistov P. Electrochemical synthesis and impedance characterization of nano-patterned biosensor substrate. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, vol. 19, no. 11, pp. 1445–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.08.015>
13. Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 2012, vol. 30, no. 3, pp. 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
14. Datta S., Christena L.R., Rajaram Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
15. Kim J., Grate J. W., Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*, 2008, vol. 26, no. 11, pp. 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.009>
16. Ge J., Lu D. N., Liu Z. X., Liu Z. Recent advances in nanostructured biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, vol. 44, no. 1, pp. 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.01.002>
17. Luckarift H. R., Spain J. C., Naik R. R., Stone M. O. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology*, 2004, vol. 22, no. 2, pp. 211–213. <https://doi.org/10.1038/nbt931>
18. Mateo C., Grazu V., Palomo J. M., Lopez-Gallego F., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, no. 5, pp. 1022–1033. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.133>

19. Lei C., Shin Y., Liu J., Ackerman E. J. Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, vol. 124, no. 38, pp. 11242–11243. <https://doi.org/10.1021/ja026855o>
20. Dulay M. T., Baca Q. J., Zare R. N. Enhanced proteolytic activity of covalently bound enzymes in photopolymerized sol gel. *Analytical Chemistry*, 2005, vol. 77, no. 14, pp. 4604–4610. <https://doi.org/10.1021/ac0504767>
21. Ge J., Lei J., Zare R. N. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology*, 2012, vol. 7, no. 7, pp. 428–432. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.80>
22. Zhu L., Gong L., Zhang Y., Wang R., Ge J., Liu Z., Zare R. N. Rapid detection of phenol using a membrane containing laccase nanoflowers. *Chemistry – an Asian Journal*, 2013, vol. 8, no. 10, pp. 2358–2360. <https://doi.org/10.1002/asia.201300020>
23. Sun J., Ge J., Liu W., Lan M., Zhang H., Wang P. Multi-enzyme coembedded organic–inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale*, 2014, vol. 6, no. 1, pp. 255–262. <https://doi.org/10.1039/C3NR04425D>
24. Lin Z., Xiao Y., Wang L., Yin Y., Zheng J., Yang H. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion. *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no. 27, pp. 13888–13891. <https://doi.org/10.1039/C4RA00268G>
25. Lin Z., Xiao Y., Yin Y., Hu W., Liu W., Yang H. Facile synthesis of enzyme–inorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2014, vol. 6, no. 13, pp. 10775–10782. <https://doi.org/10.1021/am502757e>
26. Manesh K. M., Santhosh P., Uthayakumar S., Gopalan A. I., Lee K.-P. One-pot construction of mediatorless bi-enzymatic glucose biosensor based on organic–inorganic hybrid. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, vol. 25, no. 7, pp. 1579–1586. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.11.015>
27. Delaittre G., Reinhout I. C., Cornelissen J. J., Nolte R. J. Cascade reactions in an all-enzyme nanoreactor. *Chemistry – a European Journal*, 2009, vol. 15, no. 46, pp. 12600–12603. <https://doi.org/10.1002/chem.200902063>
28. Fan Z., Wagschal K., Chen W., Montross M. D., Lee C. C., Yuan L. Multimeric hemicellulases facilitate biomass conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, vol. 75, no. 6, pp. 1754–1757. <https://doi.org/10.1128/AEM.02181-08>
29. Hirakawa H., Kamiya N., Tanaka T., Nagamune T. Intramolecular electron transfer in a cytochrome P450cam system with a site-specific branched structure. *Protein Engineering Design and Selection*, 2007, vol. 20, no. 9, pp. 453–459. <https://doi.org/10.1093/protein/gzm045>
30. Wang L. B., Wang Y. C., He R., Zhuang A., Wang X., Zeng J. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, vol. 135, no. 4, pp. 1272–1275. <https://doi.org/10.1021/ja3120136>
31. Wang X., Shi J., Li Z., Zhang S., Wu H., Jiang Z. Facile one-pot preparation of chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2014, vol. 6, no. 16, pp. 14522–14532. <https://doi.org/10.1021/am503787h>
32. Zhang Z., Zhang Y., Song R., Wang M., Yan F., He L. Manganese(II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, vol. 211, pp. 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.106>
33. Blanca J., Munoz P., Morgado M., Mendez N., Aranda A., Reuvers T., Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 529, no. 1–2, pp. 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.061>
34. Shishani E., Chai S. C., Jamokha S., Aznar G., Hoffman M. K. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography–fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 483, no. 1–2, pp. 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00120-X)
35. He L., Su Y., Zeng Z., Liu Y., Huang X. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography–mass spectrometry. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, vol. 132, no. 3–4, pp. 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.013>
36. Shelver W. L., Smith D. J. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no. 13, pp. 3715–3721. <https://doi.org/10.1021/jf021175q>
37. Liu M., Ning B. A., Qu L. J., Peng Y., Dong J. W., Gao N. Development of indirect competitive immunoassay for highly sensitive determination of ractopamine in pork liver samples based on surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, vol. 161, no. 1, pp. 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.09.078>
38. Wu C., Sun D., Li Q., Wu K. B. Electrochemical sensor for toxic ractopamine and clenbuterol based on the enhancement effect of graphene oxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, vol. 168, pp. 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.084>
39. Duan J. H., He D. W., Wang W. S., Liu Y. C., Wu H. P., Wang Y. S. Glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles for ractopamine and metaproterenol sensing. *Chemical Physics Letters*, 2013, vol. 574, pp. 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.04.057>
40. Jin W., Yang G., Shao H., Qin A. A label-free impedimetric immunosensor for detection of 1-aminohydantoin residue in food samples based on sol–gel embedding antibody. *Food Control*, 2014, vol. 39, pp. 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.001>
41. Hu R., Zhang X., Zhao Z., Zhu G., Chen T., Fu T. DNA nanoflowers for multiplexed cellular imaging and traceable targeted drug delivery. *Angewandte Chemie*, 2014, vol. 53, no. 23, pp. 5821–5826. <https://doi.org/10.1002/ange.201400323>
42. Shi J. F., Zhang S. H., Wang X. L., Yang C., Jiang Z. Y. Preparation and enzymatic application of flower-like hybrid microcapsules through a biomimetic mineralization approach. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, vol. 2, no. 27, pp. 4289–4296. <https://doi.org/10.1039/C4TB00507D>

43. Li J., Jiang Z. Y., Wu H., Zhang L., Long L. H., Jiang Y. J. Constructing inorganic shell onto LBL microcapsule through biomimetic mineralization: a novel and facile method for fabrication of microbioreactors. *Soft Matter*, 2010, vol. 6, no. 3, pp. 542–550. <https://doi.org/10.1039/B918218G>

44. Klajnert B., Walach W., Bryszewska M., Dworak A., Shcharbin D. Cytotoxicity, haematotoxicity and genotoxicity of high molecular arborescent polyoxyethylene with polyglycidol block containing shell. *Cell Biology International*, 2006, vol. 30, no. 3, pp. 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.10.026>

45. Dzmitruk V., Szulc A., Shcharbin D., Janaszewska A., Shcharbina N., Lazniewska J. [et al.]. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, vol. 485, no. 1–2, pp. 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.034>

46. Shcharbin D., Shakhbazau A., Bryszewska M. Poly(amidoamine) dendrimer complexes as a platform for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013, vol. 10, no. 12, pp. 1687–1698. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.853661>

47. Dzmitruk V., Apartsin E., Ihnatsyeu-Kachan A., Abashkin V., Shcharbin D., Bryszewska M. Dendrimers show promise for siRNA and microRNA therapeutics. *Pharmaceutics*, 2018, vol. 10, no. 3, p. 126. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030126>

48. Shcharbin D., Shcharbina N., Dzmitruk V., Pedziwiatr-Werbicka E., Ionov M., Mignani S., [et al.]. Dendrimer-protein interactions versus dendrimer-based nanomedicine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, vol. 152, pp. 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.041>

Информация об авторах

Абашкин Виктор Михайлович – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: viktar.abashkin@gmail.com

Галец-Буй Инесса Веславовна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: inessahalets@gmail.com

Дмитрук Ольга Геннадьевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dmitruk.olga@gmail.com

Брышевская Мария – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Лодзинский университет (ул. Поморска, 141/143, 90-236, г. Лодзь, Польша). E-mail: maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl

Шербин Дмитрий Григорьевич – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shcharbin@gmail.com

Одабаси Мехмет – д-р хим. наук, профессор, заведующий кафедрой. Университет Аксарай (68100, Аксарай, Турция). E-mail: modabasi@aksaray.edu.tr

Ацет Омур – аспирант. Университет Аксарай (68100, Аксарай, Турция). E-mail: omuracetbio@gmail.com

Онал Буриу – аспирант. Университет Аксарай (68100, Аксарай, Турция). E-mail: brconl33@gmail.com

Оздемир Налан – д-р хим. наук, профессор. Университет Эрциие (38280, Талас, Кайсери, Турция). E-mail: ozdemirn@erciyes.edu.tr

Information about the authors

Viktar M. Abashkin – 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: viktar.abashkin@gmail.com

Inessa V. Halets-Bui – 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: inessahalets@gmail.com

Volha G. Dzmitruk – 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: dmitruk.olga@gmail.com

Maria Bryszewska – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. University of Lodz (141/143, Pomorska Str., 90-236, Lodz, Poland). E-mail: maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl

Dzmitry G. Shcharbin – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shcharbin@gmail.com

Mehmet Odabaşı – D. Sc. (Chem.), Professor, Head of the Department. Aksaray University (68100, Aksaray, Turkey). E-mail: modabasi@aksaray.edu.tr

Ömür Acet – Postgraduate student. Aksaray University (68100, Aksaray, Turkey). E-mail: omuracetbio@gmail.com

Burcu Önal – Postgraduate student. Aksaray University (68100, Aksaray, Turkey). E-mail: brconl33@gmail.com

Nalan Özdemir – D. Sc. (Chem.), Professor. Erciyes University (Yenidoğan Mahallesi Turhan Baytop Sokak No. 1, 38280, Talas, Kayseri, Turkey). E-mail: ozdemirn@erciyes.edu.tr