

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІі НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2019. Т. 64, №4

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2019. Т. 64, №4

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, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

В. И. Парфенов (*заместитель главного редактора*) – Институт экспериментальной ботаники
имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

В. Г. Колосовская – *ведущий редактор журнала*

И. Д. Вологовский – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

А. Н. Евтушенко – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

А. В. Кильчевский – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Э. И. Коломиец – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск,
Республика Беларусь

- Н. А. Ламан** – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- А. Г. Лобанок** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- В. Е. Падутов** – Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь
- В. Н. Решетников** – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- В. В. Титок** – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- Л. В. Хотылева** – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- С. Н. Черенкевич** – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
- В. М. Шкуматов** – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Р е д а к ц и о н н ы й с о в е т

- В. Ф. Багинский** – Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь
- А. Баршевский** – Даугавпилсский университет, Даугавпилс, Латвийская Республика
- Я. Б. Блюм** – Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина
- В. Е. Гайдук** – Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, Брест, Республика Беларусь
- Ю. Ю. Дгебуадзе** – Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
- Н. А. Колчанов** – Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация
- В. В. Кузнецов** – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
- В. Олех-Пяэцка** – Варшавский университет естественных наук, Варшава, Республика Польша
- О. Н. Пугачев** – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- А. И. Рапопорт** – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвийская Республика
- И. А. Тихонович** – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- В. В. Швартау** – Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

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, № 4.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *А. В. Новик*

Подписано в печать 10.10.2019. Выход в свет 29.10.2019. Формат 60 × 84 ¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 84 экз. Заказ 245.
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. 4

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)*

E d i t o r - i n - C h i e f

Mikhail E. Nikiforov –

Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

E d i t o r i a l B o a r d

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

Valentina G. Kolosovskaya – *Managing Editor*

Sergey N. Cherenkevich – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Anatoli N. Evtushenkov – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

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

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

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

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

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

Vladimir E. Padutov – Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
Vladimir N. Reshetnikov – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir M. Shkumatov – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir V. Titok – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Igor D. Volotovskii – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E d i t o r i a l C o u n c i l

Vladimir F. Baginski – F. Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus
Arvids Barsevskis – Daugavpils University, Daugavpils, Republic of Lithuania
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, Russian Federation
Vasiliy E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus
Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Wanda Olech-Piasecka – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Republic of Poland
Oleg N. Pugachev – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation
Alexander I. Rapoport – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvian Republic
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, Russian Federation

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

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series. 2019, vol. 64, no. 4

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *A. V. Novik*

It is sent of the press 10.10.2019. Appearance 29.10.2019. Format 60 × 84 ¹/₈. Offset paper. The press digital.

Printed pages 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 84 copies. Order 245.

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 August 2, 2013. License for the press No. 02330/455 dated December 30, 2013. Address: 40, F. Scorina Str., Minsk, 220141, 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

Ковалевская А. И., Романовская Т. В. Эволюционная история генов семейства <i>MTG</i> у позвоночных	391
Рупасова Ж. А., Гаранович И. М., Шпитальная Т. В., Павловский Н. Б., Гончарова Л. В., Василевская Т. И., Криницкая Н. Б., Павловская А. Г., Пигуль М. Л., Фролова Л. В. Генотипическая изменчивость биохимического состава плодов интродуцированных видов семейств <i>Ericaceae</i> и <i>Actinidiaceae</i> в условиях Беларуси	403
Тюлькова Е. Г., Кабашникова Л. Ф. Влияние летучих органических соединений на перекисное окисление липидов овсяницы тростниковой <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	411
Фомина Е. Г., Григорьева Е. Е., Счесленок Е. П., Семижон П. А., Ткачев С. В., Владыко А. С. Использование внутреннего контрольного образца на основе рекомбинантных ретровирусных частиц для повышения достоверности ПЦР-исследования	420
Коваленко Н. А., Супиченко Г. Н., Ахрамович Т. И., Феськова Е. В., Леонтьев В. Н., Шутова А. Г. Антимикробные свойства эфирного масла <i>Pseudotsuga menziesii</i>	431
Исакова А. Л., Исаков А. В., Коваленко Н. А., Феськова Е. В., Супиченко Г. Н., Сачивко Т. В. Биохимический состав семян <i>Nigella sativa</i> L., выращенных в условиях Беларуси	440
Коломиец О. О., Глушен С. В. Суточный ритм роста листьев и пролиферации клеток у перца стручкового (<i>Capsicum annuum</i> L.)	448
Куделина Т. Н., Константинов А. В., Обуховская Л. В., Молчан О. В. Особенности формирования фотосинтетического аппарата микроклонов <i>Populus tremula</i> L. и <i>Betula pendula</i> Roth. при LED-освещении различного спектрального состава в процессе адаптации <i>ex vitro</i>	456
Сакович В. В., Груша А. М., Ревенько В. В., Жерносеков Д. Д. Хроматографическая очистка ферментного препарата из культуральной жидкости <i>Pleurotus ostreatus</i>	467
Черноморец А. В. Динамика численности, успешности размножения и территориального распределения белого аиста в центральной части Беларуси	472
Пышко А. С. Факторы, определяющие состав водно-болотных птиц при ренатурализации выработанных торфяников	478
Лянь Уян. Видовой состав жесткокрылых (Coleoptera) на посевах ярового рапса в Беларуси	484
Шабета М. С. Созологический анализ бриокомпонента листовых лесов Беларуси	488
Григорчик А. П. Морфометрическая характеристика пуголовки звездчатой <i>Benthophilus stellatus</i> (Sauvage, 1874) из реки Днепр (Беларусь)	492

АГЛЯДЫ

Волотовский И. Д. Резидентные стволовые и прогениторные клетки сердца: морфофункциональные свойства и перспективы практического использования	499
--	-----

CONTENTS

Kavaleuskaya A. I., Ramanouskaya T. V. Evolutionary history of the <i>MTG</i> gene family in vertebrates	391
Rupasova Zh. A., Garanovich I. M., Shpitalnaya T. V., Pavlovskiy N. B., Goncharova L. V., Vasilevskaya T. I., Krinitskaya N. B., Pavlovskaya A. G., Pigul M. L., Frolova L. V. Genotypic variability of biochemical composition of fruits of introduced species of Ericaceae and Actinidiaceae families in conditions of Belarus	403
Tulkova E. G., Kabashnikova L. F. Effect of volatile organic compounds on <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. lipid peroxidation	411
Fomina E. G., Grigorieva E. E., Scheslenok E. P., Semizhon P. A., Tkachev S. V., Vladyko A. S. Application of internal control based on recombinant retroviral particles for increasing the PCR assay reliability	420
Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Ahramovich T. I., Feskova A. V., Leontiev V. N., Shutova A. G. Antimicrobial properties of <i>Pseudotsuga menziesii</i> essential oil	431
Isakova A. L., Isakov A. V., Kovalenko N. A., Feskova A. V., Supichenko G. N., Sachivko T. V. Biochemical composition of seeds <i>Nigella sativa</i> L., grown in the conditions of Belarus	440
Kolomiets O. O., Gloushen S. V. The diel rhythm of leaf growth and cell proliferation in capsicum (<i>Capsicum annuum</i> L.)	448
Kudelina T. N., Konstantinov A. V., Obukhovskaya L. V., Molchan O. V. Feature of formation of photosynthetic apparatus of microcuttings of <i>Populus tremula</i> L. and <i>Betula pendula</i> Roth. at LED-lighting of various spectral composition during <i>ex vitro</i> adaptation	456
Sakovich V. V., Hrusha A. M., Revenko V. V., Zhernossekov D. D. Chromatographic purification of the enzyme preparation from the cultural liquid of <i>Pleurotus ostreatus</i>	467
Chernomorets A. V. Dynamics of number, success of reproduction and territorial distribution of White Stork in the central part of Belarus	472
Pyshko A. S. Factors determining the composition of the wetland community at renaturalization of the developed peatboards	478
Lian Wuyang. Species composition of beetles (Coleoptera) on the fields of spring rape in Belarus	484
Shabeta M. S. Sozological analysis of the biocomponent Belarusian forestry	488
Hryhorchuk A. P. Morphometric characteristics of stellate tabpole-goby <i>Benthophilus stellatus</i> (Sauvage, 1874) from the Dnieper River (Belarus)	492

REVIEWS

Volotovskii I. D. Resident and progenitor stem cells of the heart: morphology and function properties and prospects for practical application	499
--	-----

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 575.852

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-391-402>

Поступила в редакцию 04.12.2018

Received 04.12.2018

А. И. Ковалевская¹, Т. В. Романовская²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИСТОРИЯ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *MTG* У ПОЗВОНОЧНЫХ

Аннотация. Высококонсервативное генное семейство *MTG* у позвоночных включает три гомолога – *MTG8*, *MTGR1*, *MTG16*, которые кодируют транскрипционные корепрессоры, играющие важную роль в гемопоэзе, нейрогенезе и дифференцировке эпителиальных стволовых клеток. Эти гены являются чрезвычайно важными, потому что они способны вовлекаться в транслокации, ассоциированные с различными типами рака. Изучение эволюции этого семейства способно пролить свет на то, как происходила их структурно-функциональная дивергенция. Для изучения эволюции этого генного семейства был проведен филогенетический анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, выяснена доменная организация продуктов генов семейства *MTG*, определен механизм появления первого гена *MTG* и таксон – родоначальник этого гена. Кроме того, установлен механизм экспансии генного семейства, проведен анализ скоростей эволюции, действующей на отдельные домены белков семейства *MTG*, и определены консервативные позиции внутри каждого гена.

Ключевые слова: генное семейство *MTG*, филогенетический анализ, доменная организация, эволюция

Для цитирования: Ковалевская, А. И. Эволюционная история генов семейства *MTG* у позвоночных / А. И. Ковалевская, Т. В. Романовская // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 391–402. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-391-402>

A. I. Kavaleuskaya¹, T. V. Ramanouskaya²

¹Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

EVOLUTIONARY HISTORY OF THE *MTG* GENE FAMILY IN VERTEBRATES

Abstract. The highly conserved *MTG* gene family includes three homologs in vertebrates (*MTG8*, *MTGR1*, *MTG16*) encoding transcriptional corepressors, which are important in haemopoiesis, neurogenesis and epithelial stem cell differentiation. These genes are of particular interest because they are involved in translocations, associated with different types of cancer. Looking at how this gene family evolved might provide insights into history of its structural and functional diversification. We have performed a phylogenetic analysis of *MTG* nucleotide and protein sequences to examine the evolutionary events. The domain organization of *MTG* gene products was clarified, the mechanism of appearance of the first *MTG* gene was revealed and the ancestor taxon was determined. Also the mechanism of *MTG* gene family emergence was established. In addition, analysis of the rates of evolution acting on individual domains was made, and conservative positions within each gene of *MTG* family were determined.

Keywords: *MTG* gene family, phylogenetic analysis, domain organization, evolution

For citation: Kavaleuskaya A. I., Ramanouskaya T. V. Evolutionary history of the *MTG* gene family in vertebrates. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 391–402 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-391-402>

Введение. Высококонсервативное семейство генов *MTG* (myeloid translocation gene) у мыши и у человека включает три гена, продукты которых являются транскрипционными корепрессорами: *CBFA2T1* (синонимы *MTG8*, *RUNX1T1*, *ETO*), *CBFA2T2* (синоним *MTGR1*) и *CBFA2T3* (синонимы *MTG16*, *ETO-2*). Представители этого семейства регулируют транскрипцию генов-мишеней, образуя комплексы с ДНК-связывающими белками, и рекрутируют другие корепрессоры и гистоновые деацетилазы [1].

Семейство *MTG* было открыто при изучении острого миелоидного лейкоза [2, 3]. Тогда же было показано, что одной из базовых мутаций, приводящих к этой неоплазии, является транслокация t(8;21), затрагивающая гомолог гена *runt* дрозофилы (*AML1*, 21-я хромосома) и ген на

8-й хромосоме, который назвали *MTG8* (myeloid translocation gene on chromosome 8). Позже было выяснено, что все три гена семейства могут вовлекаться в транслокации, ассоциированные со злокачественными заболеваниями: *MTG16* – в образование гибридного гена *AML1-MTG16* t(16;21) у пациентов с индуцированным терапией лейкозом, *MTGR1* – в образование гена *AML1-MTGR1* t(20;21) при колоректальном раке [4].

У дрозофилы в геноме обнаруживается единственный ген, имеющий высокий процент сходства и идентичную с белками семейства *MTG* позвоночных доменную организацию. Высокая консервативность указывает на функциональную значимость белка. Действительно, гены данного семейства задействованы в генетическом контроле морфогенеза различных тканей на этапе эмбрионального развития. Нокаут этих генов в эксперименте приводит к гибели эмбрионов мышей [5].

Как известно, семейства генов формируются вследствие дупликаций с последующей дивергенцией генов по структуре и функции. Наше исследование эволюционной истории генов семейства *MTG* основывалось на представленных в базах данных последовательностях геномов животных.

Цель работы – детальное изучение эволюции структуры и функции генов данного семейства для углубления понимания процессов, связанных как с дифференцировкой тканей, так и с их злокачественной трансформацией у позвоночных.

Материалы и методы исследования. Последовательности генов и кодируемых ими белков были получены из баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), UniProt (<https://www.uniprot.org>), Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Домены были аннотированы с помощью скрытых марковских моделей (HMMs) в Pfam (<http://pfam.xfam.org>); домен NHR3 был аннотирован в COILS (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html).

Полученный набор последовательностей выравнивали, используя алгоритм MUSCLE из пакета MEGA7, и редактировали с помощью Gblocks (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) с минимальной жесткостью селекции позиций. Отредактированные последовательности использовали для построения деревьев программой BEAST2. Достоверность филогенетических реконструкций оценивали по апостериорной вероятности узлов.

Результаты и их обсуждение. Все белки семейства *MTG* характеризуются наличием 4 консервативных доменов, названных на основании гомологии с доменами белка *nevvy* у дрозофилы (рис. 1): NHR1 (nervy homology region 1), NHR2, NHR3, NHR4. Домен NHR1 (TAFH, от англ. TATA-box associated factor homology), гомологичный TAF4-субъединице TFIID, обеспечивает избирательное связывание белка с некоторыми транскрипционными факторами, определяющими в норме спектр генов-мишеней репрессорной активности белков *MTG* [6]. Домен NHR2 содержит гидрофобный гептадный повтор и обеспечивает гомо- и гетероолигомеризацию белков семейства *MTG*, что многократно повышает их сродство к корепрессорам и транскрипционным факторам и является критичным для реализации их регуляторной функции. Вместе с тем совместно NHR1 и NHR2 образуют платформу для других белок-белковых взаимодействий [7].

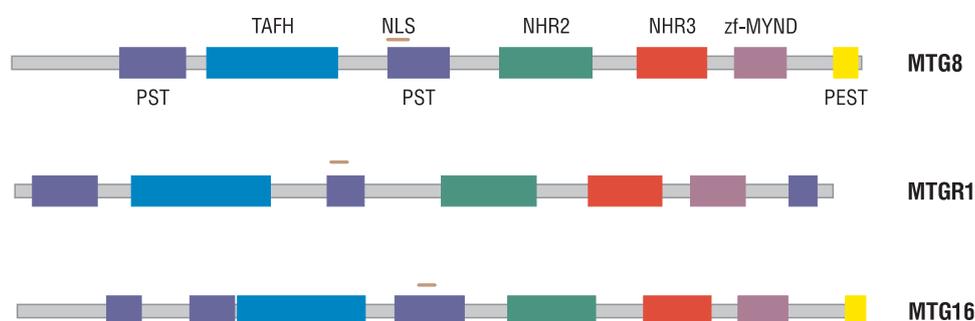


Рис. 1. Доменная структура трех белков семейства *MTG* человека. NHR1, NHR2, NHR3, zf-MYND – консервативные домены, PST – пролин/серин/треонин-богатый тракт, PEST – пролин/глутаминовая кислота/серин/треонин-богатый тракт, NLS – сигнал ядерной локализации

Fig. 1. Domain structure of three proteins of the human *MTG* family. NHR1, NHR2, NHR3, zf-MYND – conservative domains, PST – proline/serine/threonine-rich tract, PEST – proline/ glutamic acid/serine/threonine-rich tract, NLS – nuclear localization signal

Домен NHR3 образует специфическую структуру типа суперскрученных α -спиралей, а также участвует в олигомеризации белка и рекрутировании белков-корепрессоров [8]. Домен NHR4 (zf-MYND, zinc fingers of Myeloid translocation protein, Nervy, Deaf1) содержит два высококонсервативных мотива цинковых пальцев типа SxxSxxxxxxxSxxC и SxxSxxxxxxxHxxC. Несмотря на то что обычно цинковые пальцы связываются с ДНК и регулируют экспрессию генов, у белков семейства *MTG* домен zf-MYND осуществляет только белок-белковые взаимодействия и является центром рекрутирования белков-корепрессоров N-CoR и SMRT [9].

Специфической характеристикой генов семейства *MTG* является сочетание в определенном порядке четырех основных доменов (TAFH, NHR2, NHR3 и zf-MYND). Ни у одного из представителей одноклеточных гена с таким сочетанием доменов не встречается, однако уже у *Cnidaria* есть полный ген, продукт которого содержит все четыре домена. Следовательно, вероятный момент формирования гена-родоначальника приходится на эволюцию наиболее ранних представителей *Metazoa*. Таковыми являются губки (*Porifera*), гребневники (*Ctenophora*) и *Placozoa* (таксон, представленный в настоящее время несколькими видами трихоплаксов). К сожалению, до настоящего времени нет однозначного решения вопроса о том, в каком порядке происходило формирование и обособление данных групп. Нами проанализированы геномы некоторых представителей этих таксонов на наличие генов-гомологов семейства *MTG*.

Было установлено, что у представителей каждого таксона имеется ген, содержащий как минимум два домена (TAFH и zf-MYND), первый из которых также присутствует в составе транскрипционного фактора TFIIID, а второй – в белке DEAF-1, имеющихся у многих одноклеточных организмов, включая хоанофлагеллят – предковый для *Metazoa* таксон. Можно предположить, что объединение этих доменов в одной общей рамке считывания произошло вследствие хромосомной перестройки, породившей новый ген с регуляторной функцией.

Домены NHR2 и NHR3 по гомологии последовательностей у примитивных *Metazoa* не выявляются, равно как и в геномах одноклеточных, однако у *Amphimedon queenslandica* и *Trichoplax adhaerens* участок с соответствующей структурой расположен как раз там, где у более высокоорганизованных животных располагается домен NHR3. Один из вероятных сценариев появления гена семейства *MTG* показан на рис. 2. Альтернативный сценарий может предполагать утрату ранее сформированных доменов: NHR2 – у *Porifera* и *Placozoa*, NHR2 и NHR3 – у *Ctenophora*.

Для изучения истории семейства *MTG* и раскрытия основных эволюционных процессов, приведших к его образованию, нами были выбраны виды позвоночных и беспозвоночных с наиболее полно прочитанными и аннотированными геномами. Представителями базальных ветвей были выбраны губка *Amphimedon queenslandica*, гребневник *Mnemiopsis leydi*, трихоплакс *Trichoplax belcheri* и морской анемон *Nematostella victensis*. Клада первичноротых представлена *Lophotrochozoa*

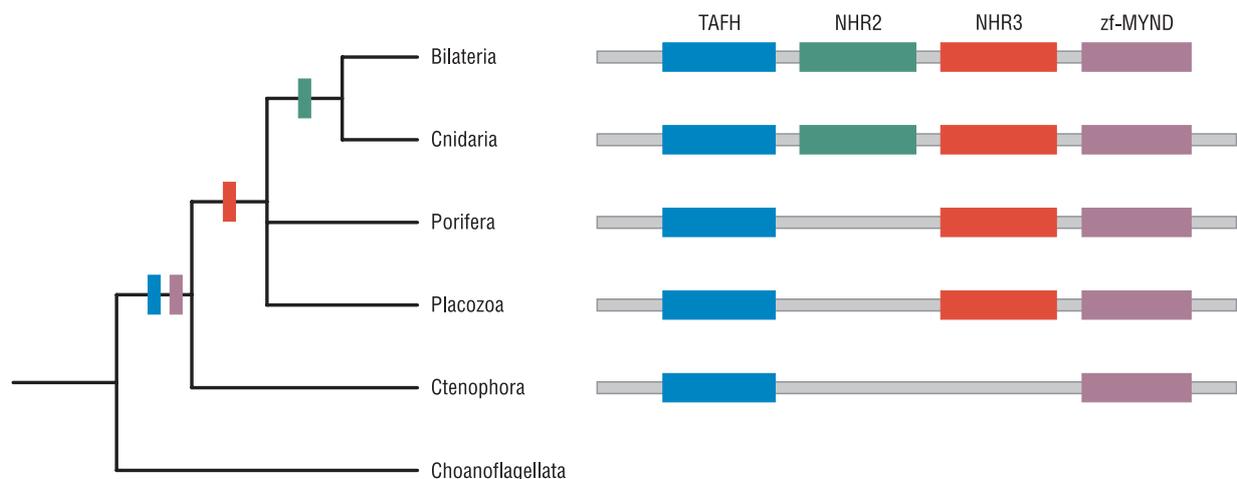


Рис. 2. История появления гена – родоначальника семейства *MTG* у ранних *Metazoa*. Вертикальные цветные метки обозначают моменты включения новых доменов в структуру белка

Fig. 2. Origin history of the ancestral *MTG* family gene in basal *Metazoa*. Colored bars indicate the domain incorporation in the protein structure

(моллюски *Aplysia californica*, *Lottia gigantea* и *Mizuhopecten yessoensis*) и *Ecdysozoa* (*Drosophila arizonae*, *Atta cephalotes*, *Dufourea novaengliae*, *Galendromus occidentalis*); клада вторичноротых – головохордовыми (ланцетник *Branchiostoma floridae*), иглокожими (морской еж *Strongylocentrotus purpurea*, морская звезда *Patiria miniata*) и позвоночными (полный список см. в таблице).

У большинства беспозвоночных выявлен только один гомолог генов семейства *MTG*, в то время как у всех позвоночных обнаружено по три гомологичных гена. Однако в геноме четырех представителей хелицерных присутствуют два гомолога (у клещей родов *Galendromus* и *Varroa*, паука *Stegodyphus* и мечехвоста *Limulus*). Мы построили филогенетическое дерево, которое включало гены семейства *MTG* нескольких позвоночных и нескольких беспозвоночных, имеющих один или два гена-гомолога. Результаты анализа отображены на рис. 3.

Исходя из топологии дерева, можно сделать заключение, что дубликации, сформировавшие семейства генов у позвоночных, произошли независимо в группе вторичноротых после обособления ветви хордовых от ветви иглокожих. Что касается представителей хелицерных, то ввиду достаточно сильной дивергенции последовательностей сложно сказать однозначно, имела ли место одна дубликация, произошедшая в основании хелицерных (недавнее исследование показало, что обособление данной группы сопровождалось полногеномной дубликацией [10]), или две независимые дубликации в каждой из ветвей. Следует отметить, что в базе данных по геномам

**Виды вторичноротых, чьи последовательности белков *MTG* использовались для построения филогении
Species of Deuterostomes used to reconstruct *MTG* proteins phylogeny**

Название (рус.)	Название (лат.)	Таксономия
Ланцетник	<i>Branchiostoma belcheri</i>	Chordata, Cephalochordata
Данио	<i>Danio rerio</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Teleostomi, Actinopterygii
Латимерия	<i>Latimeria chalumnae</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Teleostomi, Sarcopterygii
Ксенопус	<i>Xenopus laevis</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Amphibia
Анолис	<i>Anolis carolinensis</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Sauropsida, Lepidosauria, Squamata, Bifurcata, Unidentata, Episquamata, Iguania
Зеленая черепаха	<i>Chelonia mydas</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Sauropsida, Archelosauria, Testudines
Острочешуйная куфия	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Sauropsida, Lepidosauria, Squamata, Bifurcata, Unidentata, Episquamata, Serpentes
Гребнистый крокодил	<i>Crocodylus porosus</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Sauropsida, Archelosauria, Archosauria, Crocodylia
Банкивская джунглевая курица	<i>Gallus gallus</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Sauropsida, Archelosauria, Archosauria, Aves
Африканский слон	<i>Loxodonta africana</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Afrotheria
Косатка	<i>Orcinus orca</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Laurasiatheria, Cetartiodactyla, Cetacea
Дикая свинья	<i>Sus scrofa</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Laurasiatheria, Cetartiodactyla, Suina
Гималайский листонос	<i>Hipposideros armiger</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Laurasiatheria, Chiroptera
Собака	<i>Canis lupus familiaris</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Laurasiatheria, Carnivora
Норвежская крыса	<i>Rattus norvegicus</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Euarchontoglires, Glires, Rodentia
Домовый опоссум	<i>Monodelphis domestica</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Metatheria
Обыкновенный шимпанзе	<i>Pan troglodytes</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Euarchontoglires, Primates, Catarrhini
Человек	<i>Homo sapiens</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Euarchontoglires, Primates, Catarrhini
Боливийский саймири	<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	Chordata, Vertebrata, Gnathostomata, Tetrapoda, Mammalia, Theria, Eutheria, Boreoeutheria, Euarchontoglires, Primates, Platyrrhini

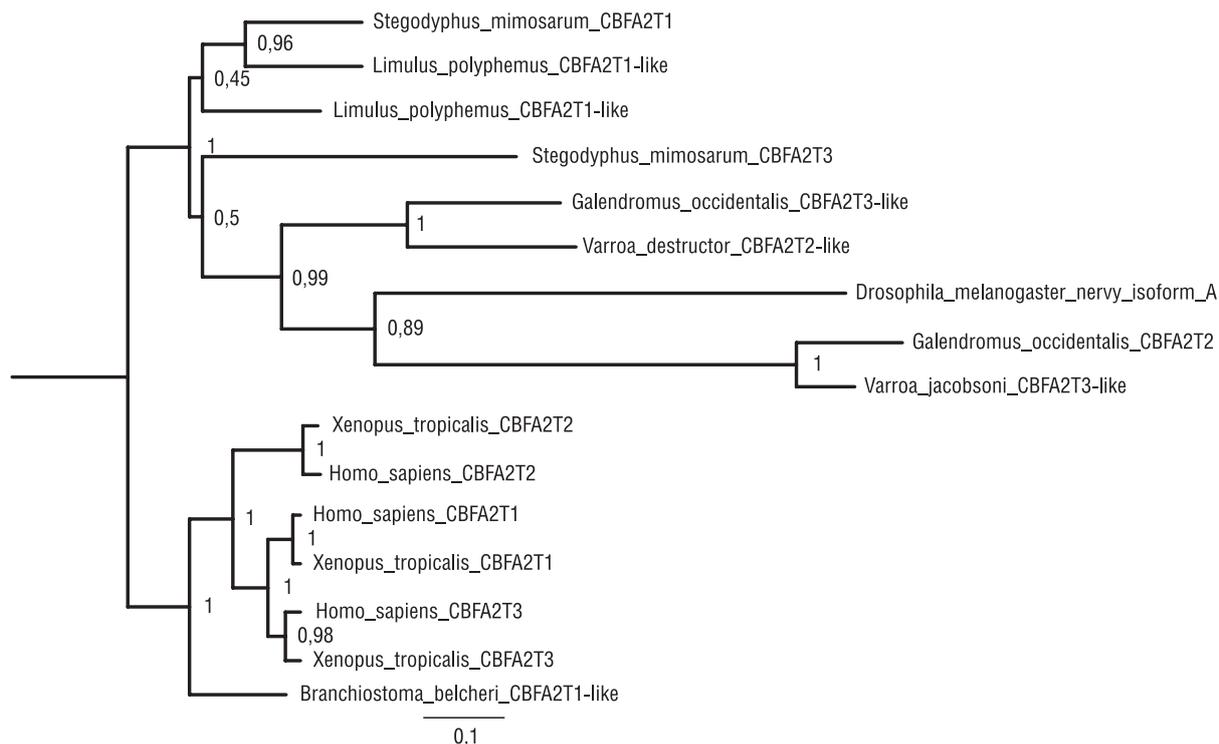


Рис. 3. Филогенетическое дерево белков *MTG* у членистоногих и позвоночных. Длина ветвей пропорциональна количеству аминокислотных замен, шкала соответствует 1 аминокислотной замене на 10 сайтов. Указаны апостериорные вероятности узлов

Fig. 3. Phylogenetic tree of *MTG* proteins of arthropods and chordates. Branch length are proportional to the number of amino acid substitutions, scale bar corresponds to 1 amino acid substitution per 10 sites. Numbers at nodes indicate posterior probability

различных беспозвоночных для гомологов генов семейства *MTG* необоснованно используют названия *CBFA2T1-like*, *CBFA2T2-like* и *CBFA2T3-like*, что вносит путаницу, поскольку это не соответствует истинному ходу эволюции.

Далее мы провели более детальное исследование филогении членов семейства в пределах позвоночных, в том числе представителей группы амфибий, рептилий и разных отрядов млекопитающих. В качестве представителя внешней группы при построении дерева был включен ланцетник, который имеет только один гомолог для генов семейства *MTG* (рис. 4). По результатам анализа было получено дополнительное подтверждение того, что генное семейство *MTG*, члены которого имеются у всех позвоночных, появилось в ходе двух раундов дупликаций, предшествовавших дивергенции данной клады. Топология оставалась устойчивой при выборе в качестве представителя внешней группы других беспозвоночных, таких как полип *Nematostella victensis* или морской еж *Strongylocentrotus purpuratus*.

Проведенный анализ согласуется с аннотацией семейства генов *MTG* как онологов, образованных в результате двух раундов полногеномной дупликации, предшествовавших появлению позвоночных, в базе данных OHNOLOGS (<http://ohnologs.curie.fr/cgi-bin/SearchPage.cgi>).

Известно, что разные участки генов и, соответственно, их белковых продуктов эволюционируют с разной скоростью, что в большинстве случаев определяется различиями в отборе, действующем на данные участки последовательностей. Действие движущего отбора ускоряет накопление несинонимичных замен, что проявляется в удлинении ветвей дерева. Движущий отбор подразумевает изменение функциональной нагрузки и белков-партнеров у изучаемого белка. Для анализа скорости эволюции каждого индивидуального домена белков семейства *MTG* нами было использовано дерево с фиксированной топологией. Информация о филогенетических взаимоотношениях организмов, включенных в анализ, была получена из проекта Taxonomy базы NCBI. Ланцетник служил в качестве представителя внешней группы. Филогенетические построения по каждому домену представлены на рис. 5–8 соответственно. Дерево по домену TAFH не

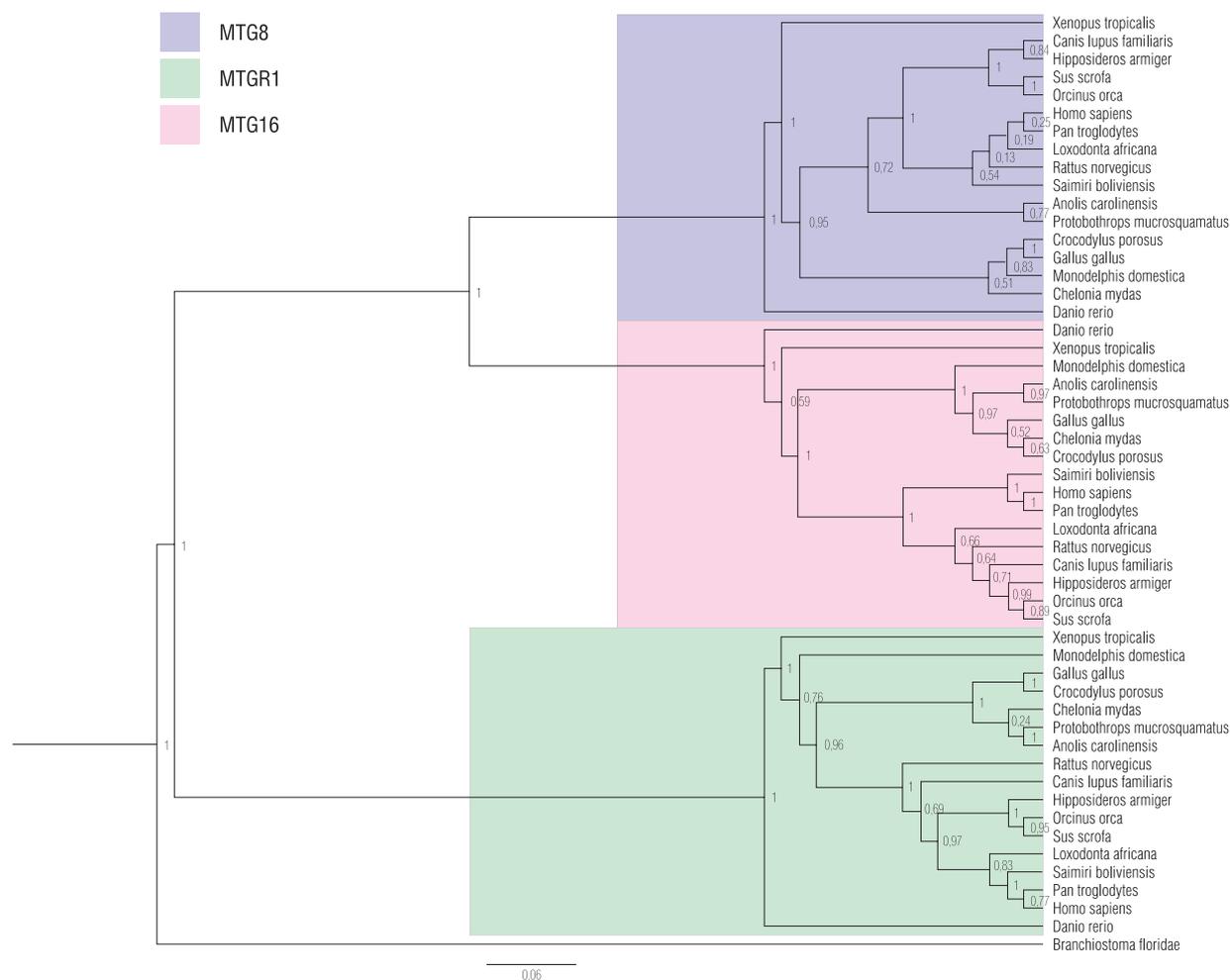


Рис. 4. История дупликаций гена семейства *MTG* у Vertebrata с ланцетником *Branchiostoma belcheri* в качестве внешней группы. Указаны апостериорные вероятности узлов. Шкала соответствует 6 аминокислотным заменам на 100 сайтов

Fig. 4. Duplication history of the *MTG* gene family in the Vertebrata with *Branchiostoma floridae* as an outgroup. Numbers at nodes indicate posterior probability. Scale bar corresponds to 6 amino acid substitutions per 100 sites

включает этот домен в гене *CBFA2T3* латимерии из-за содержащейся в нем крупной делеции, которая сильно нарушает топологию дерева.

Полученные результаты позволяют предположить действие движущего отбора по домену NHR1 (TAFH) в гене *CBFA2T2* до начала дивергенции позвоночных и в несколько меньшей степени по этому же домену в гене *CBFA2T1* (см. рис. 5).

Второй домен не претерпевал значимых замен и эволюционировал довольно стабильно, хотя большая длина ветви к предшественнику генов *MTG8* и *MTG16* свидетельствует о слабом движущем отборе. В целом, домен NHR2 эволюционировал с более высокой скоростью, чем все остальные домены, при этом во всех ветвях дерева эта скорость оставалась более или менее равномерной. Это может указывать на то, что домен NHR2 в меньшей степени подвергся действию стабилизирующего отбора, вероятно, из-за того, что способность к олигомеризации зависит скорее от общих физико-химических свойств включенных аминокислот, чем от наличия конкретных последовательностей. У ланцетника домен NHR2 претерпел масштабные перестройки, поэтому он был исключен из набора последовательностей для данного домена.

В эволюции домена NHR3 интерес представляет значительное изменение аминокислотной последовательности в ветви, предшествовавшей дивергенции плацентарных млекопитающих. Наблюдаемое далее резкое замедление эволюции, очевидно, указывает скорее на включение стабилизирующего отбора после некоторого эпизода движущего отбора, чем на ослабление стабилизирующего отбора в связи с потерей функции.

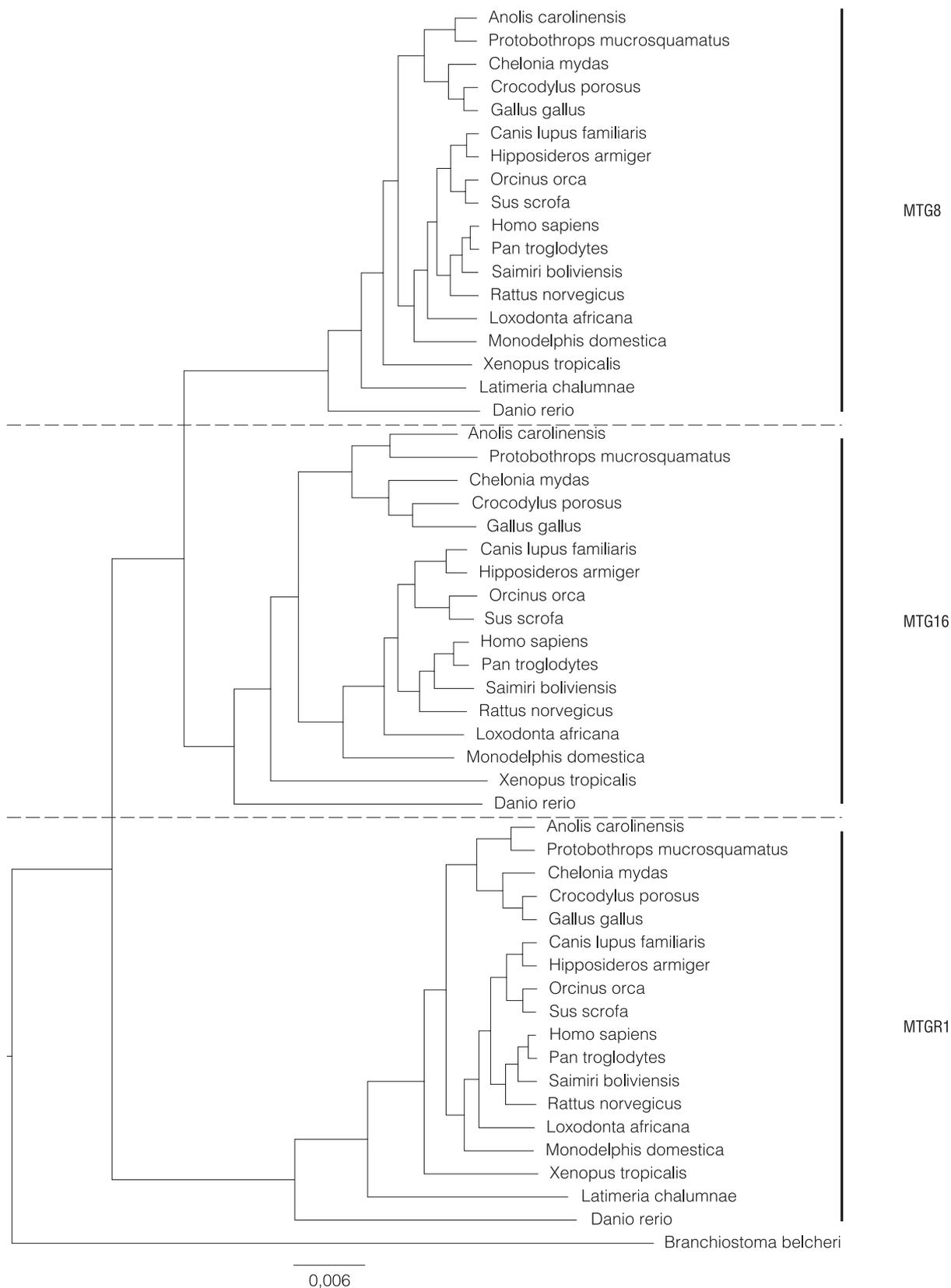


Рис. 5. Эволюция домена TAFH генов семейства *MTG* позвоночных с ланцетником *Branchiostoma belcheri* в качестве внешней группы. Длина ветвей пропорциональна количеству аминокислотных замен, шкала соответствует 6 аминокислотным заменам на 1000 сайтов

Fig. 5. Evolution of the TAFH domain of vertebrate *MTG* family genes with *Branchiostoma belcheri* as an outgroup. Branch length are proportional to the number of amino acid substitutions, scale bar corresponds to 6 amino acid substitutions per 1000 sites

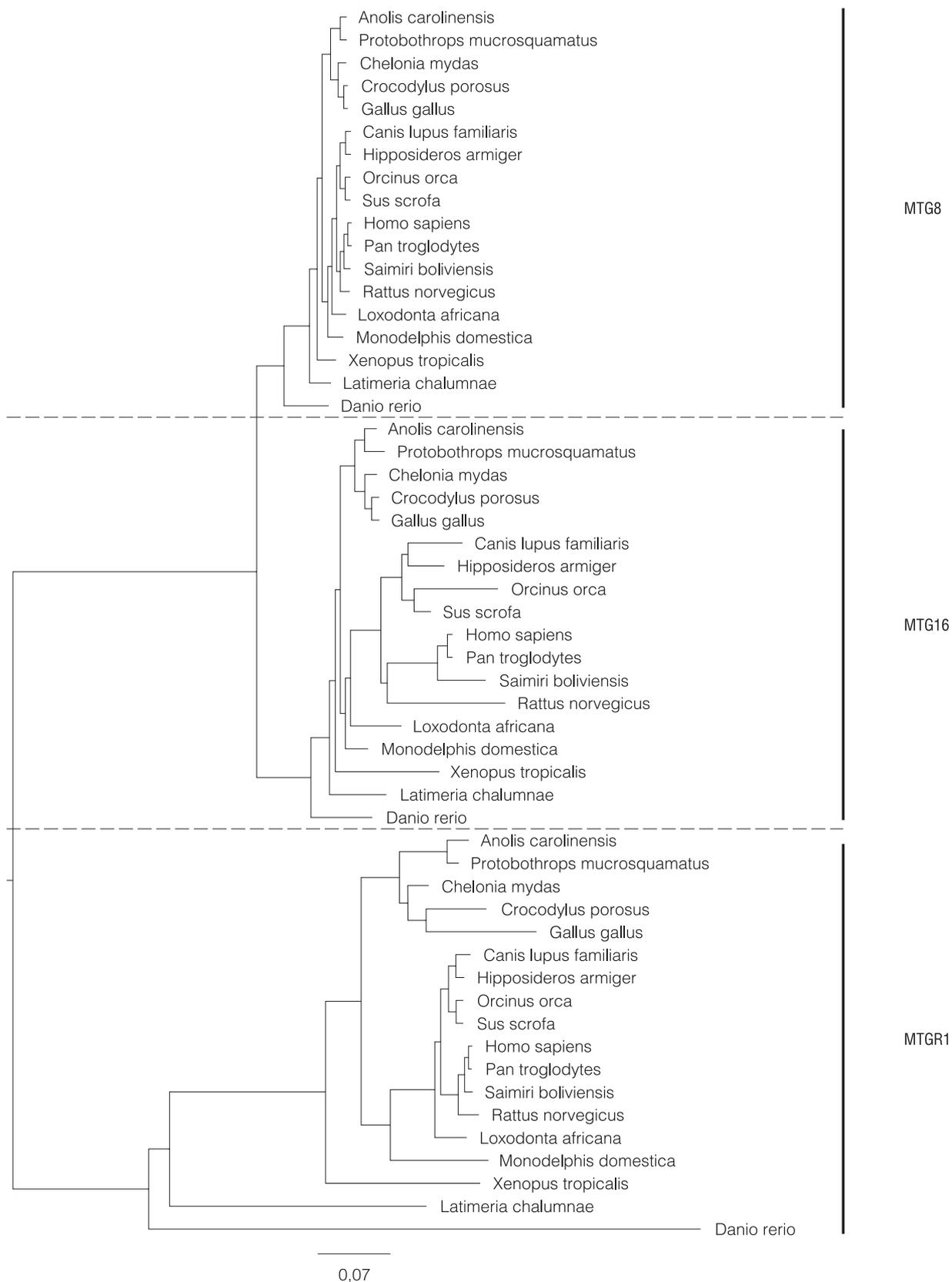


Рис. 6. Эволюция домена NHR2 генов семейства *MTG* позвоночных с ланцетником *Branchyostoma belcheri* в качестве внешней группы. Длина ветвей пропорциональна количеству аминокислотных замен, шкала соответствует 7 аминокислотным заменам на 100 сайтов

Fig. 6. Evolution of the NHR2 domain of vertebrate *MTG* family genes with *Branchyostoma belcheri* as an outgroup. Branch length are proportional to the number of amino acid substitutions, scale bar corresponds to 7 substitutions per 100 sites

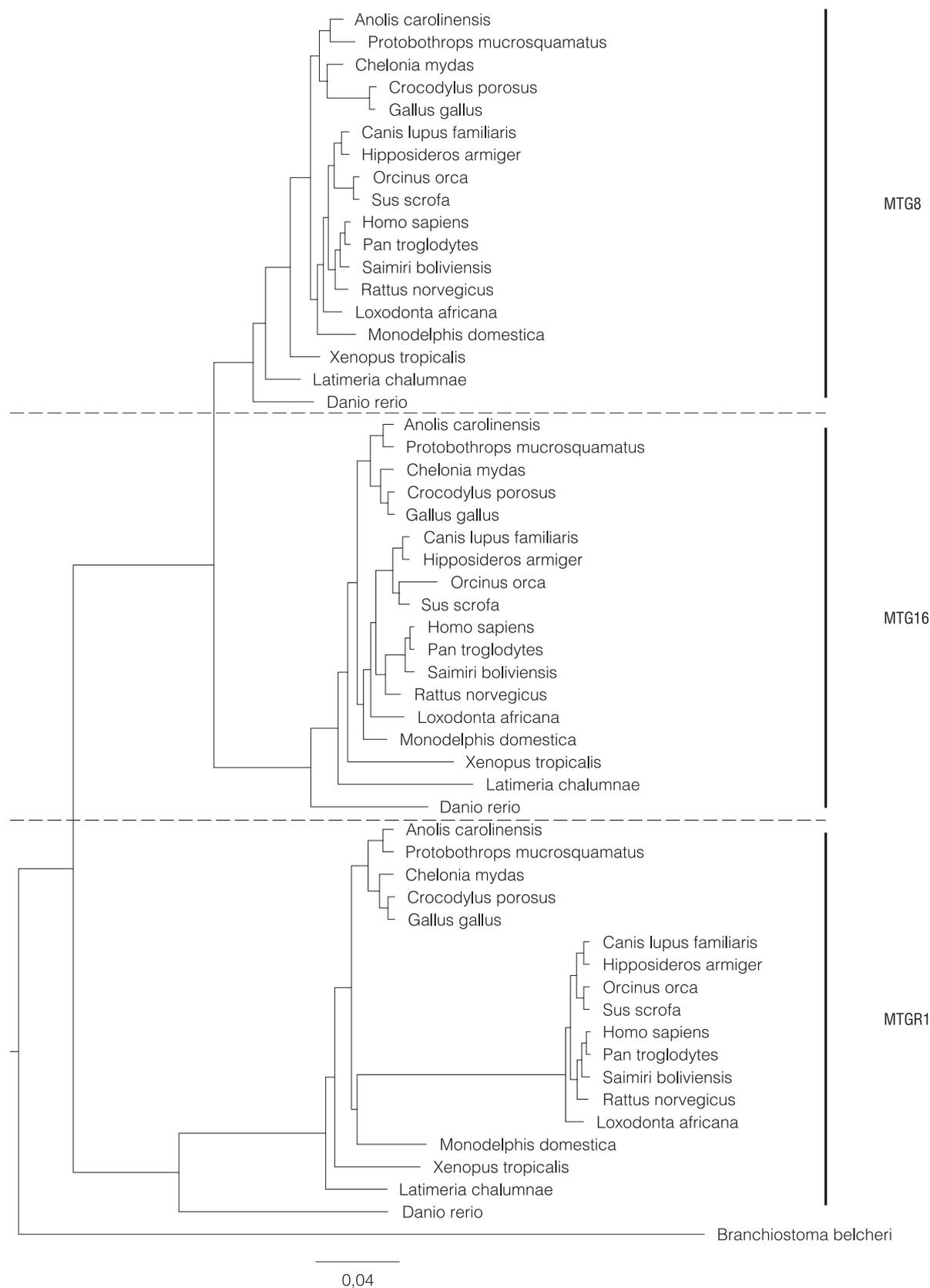


Рис. 7. Эволюция домена NHR3 генов семейства *MTG* позвоночных с ланцетником *Branchiostoma belcheri* в качестве внешней группы. Длина ветвей пропорциональна количеству аминокислотных замен, шкала соответствует 4 аминокислотным заменам на 100 сайтов

Fig. 7. Evolution of the NHR3 domain of vertebrate *MTG* family genes with *Branchiostoma belcheri* as an outgroup. Branch length are proportional to the number of amino acid substitutions, scale bar corresponds to 4 substitutions per 100 sites

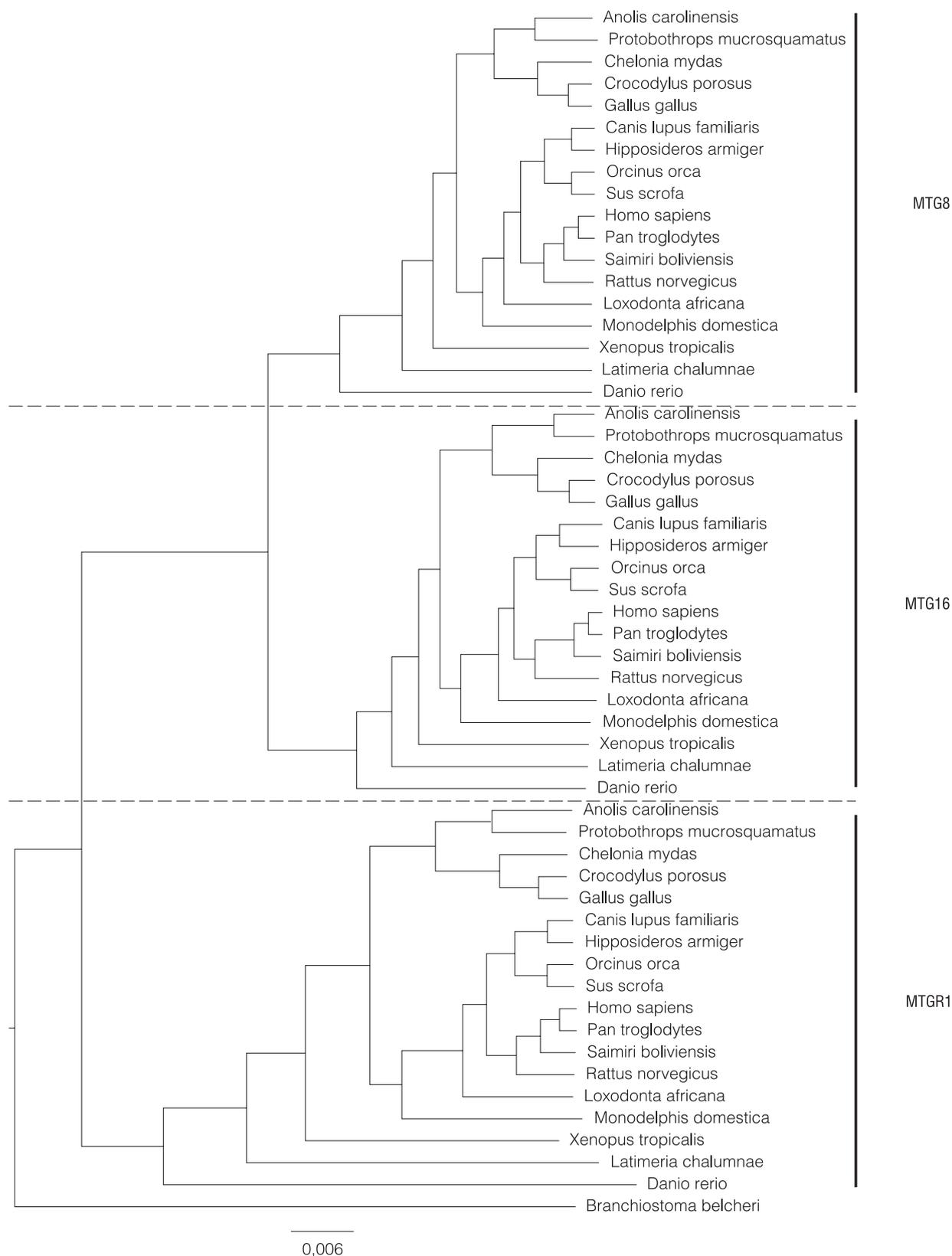


Рис. 8. Эволюция домена NHR4 (zf-MYND) генов семейства *MTG* позвоночных с ланцетником *Branchiostoma belcheri* в качестве внешней группы. Длина ветвей пропорциональна количеству аминокислотных замен, шкала соответствует 6 аминокислотным заменам на 1000 сайтов

Fig. 8. Evolution of the NHR4 (zf-MYND) domain of vertebrate *MTG* family genes with *Branchiostoma belcheri* as an outgroup. Branch length are proportional to the number of amino acid substitutions, scale bar corresponds to 6 substitutions per 1000 sites

Наконец, в эволюции домена NHR4 наблюдается существенное ускорение эволюции в ветви, которая дала ген-родоначальник для *CBFA2T1* и *CBFA2T3*. Таким образом, можно предположить, что движущий отбор по данному домену действовал в промежутке между первой и второй дубликациями, сформировавшими данное генное семейство. Одновременно этот домен сохранял крайне высокую консервативность для каждого из членов семейства, что указывает на важность выполняемых им функций.

Следует отметить, что окончательное заключение о влиянии отбора на белковые последовательности не может быть сделано исключительно на основании анализа скоростей эволюции. В дальнейшем планируется провести дополнительную оценку пропорции синонимичных и несинонимичных замен, что не только даст более ясное представление о влиянии отбора на разные участки белка, но и позволит предсказать наиболее критичные сайты, определяющие функциональность каждого домена. В сочетании с анализом паттернов коэволюции это даст возможность уточнить список белков-партнеров для генов семейства *MTG* и механизмы реализации их регуляторной функции.

Заключение. Первый ген, кодирующий характерный для семейства *MTG* кор доменов TAFH+zf-MYND, появился у предков первых многоклеточных – Placozoa, Stenophora и Porifera. Его формирование происходило из последовательностей, кодирующих TAFH-домен транскрипционного фактора TFIIID и высококонсервативный древний домен zf-MYND, который у эукариот входит в состав гена *DEAF-1*. Объединение этих двух доменов инициировало дальнейшее насыщение последовательности мутациями и формирование доменов NHR2 и NHR3, участвующих в гомо- и гетероолигомеризации и рекрутировании корепрессоров и гистоновых деацетилаз. Несмотря на то что обычно домены цинковых пальцев участвуют в связывании с ДНК, домен zf-MYND белков семейства *MTG* выступает «платформой» для белок-белковых взаимодействий между многочисленными белками репрессирующего комплекса. У некоторых организмов домен NHR3 не имеет гомологии с ортологами других организмов, однако программа-анализатор находит его по сохраняющемуся паттерну гидрофобных и полярных остатков, необходимых для формирования структуры суперскрученных α -спиралей. Из-за не очень хорошего прочтения и сборки генов базальных Metazoa, а также из-за их древнего происхождения невозможно установить точную филогению и, соответственно, определить, в какой последовательности появлялись домены в белках *MTG*, однако вероятнее всего, что ген, кодирующий кор белков семейства, появился у общего предка всех Metazoa. Он сформировал домен NHR3, вслед за чем произошли линиеспецифические перестройки и потеря этого домена домена у гребневика, а также мутационное насыщение в этом же домене у трихоплакса, из-за чего стало невозможным определить гомологию. У более совершенных Bilateria стал формироваться домен NHR2, после чего произошла окончательная фиксация относительных границ экзонов и доменов. В линии Protostomia ген остался в единственном числе. У нескольких хелицероных удалось найти по два гена семейства, которые являются паралогами: у клещей *Galendromus occidentalis* и *Varroa destructor*, мечехвоста *Limulus polyphemus* и у паука *Stegodyphus mimosarum*, в базе проходящих под названиями *CBFA2T1-like*, *CBFA2T2-like* и *CBFA2T3-like*. Однако филогенетические построения показали, что эти паралоги не имеют общего происхождения с паралогами позвоночных. В кладе Vertebrata генное семейство остается очень консервативным, несмотря на редкие различия между более древними таксонами.

Кроме того, нами проанализированы скорости эволюции отдельных доменов, а также действие отбора на эти домены. Показано, что в ходе эволюции гены *MTG8* и *MTG16* быстрее эволюционировали по доменам NHR2 и zf-MYND, а ген *MTGR1* – по домену TAFH у всех позвоночных и по домену NHR3 у плацентарных млекопитающих. Анализ скоростей эволюции отдельных доменов дает представление о том, в каком домене происходило накопление специфических сайтов.

Список использованных источников

1. Rossetti, S. The *MTG* proteins: chromatin repression players with a passion for networking / S. Rossetti, A. T. Hoogeveen, N. Sacchi // Genomics. – 2004. – Vol. 84, N 1. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.02.011>
2. Associations between morphology, karyotype and clinical features in myeloid leukemias / M. A. Bitter [et al.] // Human Pathol. – 1987. – Vol. 18, N 3. – P. 211–225. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(87\)80002-3](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(87)80002-3)
3. Therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplasia with balanced 21q22 translocations / D. A. Arber [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2002. – Vol. 117, N 2. – P. 306–313. <https://doi.org/10.1309/c3g2-cxa0-he9j-tkdr>

4. Myeloid translocation genes differentially regulate colorectal cancer programs / B. Parang [et al.] // *Oncogene*. – 2016. – Vol. 35, N 49. – P. 6341–6349. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.167>
5. Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including *nervy*, a proto-oncogene homologue / P. G. Feinstein [et al.] // *Genetics*. – 1995. – Vol. 140, N 2. – P. 573–586.
6. Alternative splicing targeting the hTAF4-TAFH domain of TAF4 represses proliferation and accelerates chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells / J. Kazantseva [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, N 10. – P. e74799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074799>
7. Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction / J. Zhang [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 21, N 1. – P. 156–163. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.156-163.2001>
8. Cloning, expression, purification and crystallization of NHR3 domain from acute myelogenous leukemia-related protein AML1-ETO / H.-T. Yang [et al.] // *Acta Biochim. Biophys. Sinica*. – 2004. – Vol. 36, N 8. – P. 566–570. <https://doi.org/10.1093/abbs/36.8.566>
9. The MYND motif is required for repression of basal transcription from the multidrug resistance 1 promoter by the t(8;21) fusion protein / B. Lutterbach [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – Vol. 18, N 6. – P. 3604–3611. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.6.3604>
10. The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution / E. E. Schwager [et al.] // *BMC Biology*. – 2017. – Vol. 15, N 1. – Art. 62. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0399-x>

References

1. Rossetti S., Hoogveen A. T., Sacchi N. The *MTG* proteins: chromatin repression players with a passion for networking. *Genomics*, 2004, vol. 84, no. 1, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.02.011>
2. Bitter M. A., Le Beau M. M., Rowley J. D., Larson R. A., Golomb H. M., Vardiman J. W. Associations between morphology, karyotype and clinical features in myeloid leukemias. *Human Pathology*, 1987, vol. 18, no. 3, pp. 211–225. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(87\)80002-3](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(87)80002-3)
3. Arber D. A., Slovak M. L., Popplewell L., Bedell V., Ikle D., Rowley J. D. Therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplasia with balanced 21q22 translocations. *American Journal of Clinical Pathology*, 2002, vol. 117, no. 2, pp. 306–313. <https://doi.org/10.1309/c3g2-cxa0-he9j-tkdr>
4. Parang B., Bradley A. M., Mittal M. K., Short S. P., Thompson J. J., Barrett C. W. [et al.]. Myeloid translocation genes differentially regulate colorectal cancer programs. *Oncogene*, 2016, vol. 35, no. 49, pp. 6341–6349. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.167>
5. Feinstein P. G., Kornfeld K., Hogness D. S., Mann R. S. Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including *nervy*, a proto-oncogene homologue. *Genetics*, 1995, vol. 140, no. 2, pp. 573–586.
6. Kazantseva J., Kivil A., Tints K., Kazantseva A., Neuman T., Palm K. Alternative splicing targeting the hTAF4-TAFH domain of TAF4 represses proliferation and accelerates chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 10, p. e74799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074799>
7. Zhang J., Hug B. A., Huang E. Y., Chen C. W., Gelmetti V., Maccarana M., Minucci S., Pelicci P. G., Lazar M. A. Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, vol. 21, no. 1, pp. 156–163. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.156-163.2001>
8. Yang H.-T., Wu D.-H., Xue X.-Y., Liang W.-X., Miao X.-Y., Pang H., Chen S.-J. Cloning, expression, purification and crystallization of NHR3 domain from acute myelogenous leukemia-related protein AML1-ETO. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, vol. 36, no. 8, pp. 566–570. <https://doi.org/10.1093/abbs/36.8.566>
9. Lutterbach B., Sun D., Schuetz J., Hiebert S. W. The MYND motif is required for repression of basal transcription from the multidrug resistance 1 promoter by the t(8;21) fusion protein. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, vol. 18, no. 6, pp. 3604–3611. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.6.3604>
10. Schwager E. E., Sharma P. P., Clarke T., Leite D. J., Wierschin T., Pechmann M. [et al.]. The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution. *BMC Biology*, 2017, vol. 15, no. 1, art. 62. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0399-x>

Информация об авторах

Ковалевская Анна Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5, корп. 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bio.ovcharovaa@gmail.com

Романовская Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, доцент, преподаватель. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: romanovskaya.t@mail.ru

Information about the authors

Anna I. Kavaleuskaya – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bio.ovcharovaa@gmail.com

Tatsiana V. Ramanouskaya – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Lecturer. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romanovskaya.t@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 634.737:581.5:581.522.4(476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-403-410>

Поступила в редакцию 05.09.2019

Received 05.09.2019

Ж. А. Рупасова¹, И. М. Гаранович¹, Т. В. Шпитальная¹, Н. Б. Павловский¹, Л. В. Гончарова¹,
Т. И. Василевская¹, Н. Б. Криницкая¹, А. Г. Павловская¹, М. Л. Пигуль², Л. В. Фролова²

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт плодоводства, Минск, Республика Беларусь

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПЛОДОВ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВ ERICACEAE И ACTINIDIACEAE В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Аннотация. Приведены результаты сравнительного исследования варибельности 14 количественных характеристик биохимического состава плодов в сортовых рядах 4 видов интродуцентов из сем. Ericaceae (*Oxycoccus macrocarpus*, *Vaccinium corymbosum*) и Actinidiaceae (*Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta*), показавшие их наименьшую зависимость от генотипа у *O. macrocarpus* и наибольшую у *A. arguta* при наличии у исследуемых видов сходства в уровне генетической детерминированности ряда характеристик биохимического состава плодов. Показано, что наименьшей стабильностью в сортовых рядах обоих видов сем. Ericaceae отличались параметры накопления собственно антоцианов и лейкоантоцианов, тогда как наибольшей – аскорбиновой кислоты, отмеченной у обоих видов сем. Actinidiaceae, напротив, высокой варибельностью. У большинства исследуемых видов интродуцентов наименьшая изменчивость в сортовых рядах установлена для содержания в плодах растворимых сахаров и суммарного количества биофлавоноидов, тогда как наибольшая – для показателя сахарокислотного индекса и содержания дубильных веществ. У *V. corymbosum* и *A. arguta* выявлена слабая зависимость от генотипа содержания в плодах флавонолов, тогда как у *V. corymbosum* и *A. kolomikta* – пектиновых веществ при сильной зависимости от него параметров накопления последних у *O. macrocarpus* и *A. arguta*.

Ключевые слова: клюква крупноплодная, голубика высокорослая, актинидия аргута, актинидия коломикта, сорта, плоды, биохимический состав, органические кислоты, углеводы, биофлавоноиды, коэффициент вариации

Для цитирования: Генотипическая изменчивость биохимического состава плодов интродуцированных видов семейств Ericaceae и Actinidiaceae в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 403–410. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-403-410>

Zh. A. Rupasova¹, I. M. Garanovich¹, T. V. Shpitalnaya¹, N. B. Pavlovskiy¹, L. V. Goncharova¹, T. I. Vasilevskaya¹,
N. B. Krinitskaya¹, A. G. Pavlovskaya¹, M. L. Pigul², L. V. Frolova²

¹Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Fruit Growing, Minsk, Republic of Belarus

GENOTYPIC VARIABILITY OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF FRUITS OF INTRODUCED SPECIES OF ERICACEAE AND ACTINIDIACEAE FAMILIES IN CONDITIONS OF BELARUS

Abstract. The article describes results of a comparative study of variability of 14 quantitative characteristics of biochemical composition of fruits in sort rows of 4 species of introduced varieties of Ericaceae (*Oxycoccus macrocarpus*, *Vaccinium corymbosum*) and Actinidiaceae (*Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta*) families, which has shown its lowest dependence on genotype in *O. macrocarpus* and the greatest dependence in *A. arguta* while the species studied have similarities in the level of genetic determinancy of a number of characteristics of fruits biochemical composition. It has been shown that the lowest stability in sort rows of both species of Ericaceae fam. is typical of parameters of accumulating anthocyanins proper and leucoanthocyanins while the greatest stability – that of ascorbic acid, which is characterized by high variability in both species of Actinidiaceae family.

Most species of introduced plants studied have the lowest variability in sort rows in content of soluble sugars and total amount of bioflavonoids in fruits, while the greatest one – in sugar-acid index and tannins content. It has been found out that *V. corymbosum* and *A. arguta* have little dependence of flavonols content in fruits on genotype while *V. corymbosum* and *A. kolomikta* – that of pectin substances with a strong dependence of parameters of accumulating the latter in *O. macrocarpus* and *A. arguta*.

Keywords: marsh cranberry, tall bilberry, actinidia arguta, actinidia kolomikta, sorts, fruits, biochemical composition, organic acids, carbohydrates, bioflavonoids, variation quotient

For citation: Rupasova Zh. A., Garanovich I. M., Shpitalnaya T. V., Pavlovskiy N. B., Goncharova L. V., Vasilevskaya T. I., Krinitskaya N. B., Pavlovskaya A. G., Pigul M. L., Frolova L. V. Genotypic variability of biochemical composition of fruits of introduced species of Ericaceae and Actinidiaceae families in conditions of Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 403–410 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-403-410>

Введение. В результате сравнительного исследования биохимического состава плодов интродуцированных в Беларуси новых высоковитаминных видов сем. Ericaceae и Actinidiaceae – *Oxycoccus macrocarpus* Ait. Pers, *Vaccinium corymbosum* L., *Actinidia arguta* Siebold et Zucc. Planch, ex Miq. и *Actinidia kolomikta* Maxim. & Rupr. установлена выраженная видо- и сорто-специфичность параметров накопления в них действующих веществ разной химической природы [1, 2]. При этом выявлены отчетливые генотипические различия анализируемых признаков, косвенно свидетельствовавшие о разной степени их генетической детерминированности и возможности наследования при выведении новых сортов, что особенно актуально для селекционного процесса.

С целью установления степени зависимости от генотипа количественных характеристик биохимического состава плодов вышеуказанных видов интродуцентов проведено сравнение уровней их изменчивости в соответствующих таксономических рядах в двулетнем цикле наблюдений. При этом мы ориентировались на значения коэффициентов вариации (V) рассматриваемых признаков, указывающие на уровень их зависимости от генотипа (т. е. чем выше коэффициент вариации, тем сильнее эта зависимость, а следовательно, ниже уровень генетической детерминированности признака, и наоборот).

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены в контрастные по погодным условиям сезоны 2016 и 2017 гг. на экспериментальном участке лаборатории интродукции и технологии ягодных растений ЦБС НАН Беларуси (Ганцевичский р-н Брестской обл.), находящемся на территории центральной агроклиматической зоны Беларуси в районе распространения легких песчаных дерново-подзолистых почв и осушенных верховых торфяников. Вегетационный период первого сезона в целом характеризовался сравнительно жаркой погодой при достаточном и временами избыточном выпадении атмосферных осадков, тогда как на протяжении второго сезона имели место резкие перепады температуры воздуха при дефиците влаги, что свидетельствовало о менее благоприятном характере погодных условий для созревания плодов интродуцентов.

В качестве объектов исследования были использованы плоды 6 сортов *O. macrocarpus* – *Stevens*, *Bain Favorit*, *Hiliston*, *Holistar Red*, *Stankovich*, *WSU 108*; 9 сортов *V. corymbosum* – *Bluecrop (st)*, *Bluejay*, *Nui*, *Puru*, *Spartan*, *Sunrise*, *Toro*, *Brigitta Blue*, *Elliott*; 5 сортов и природной формы *A. arguta* – *Киевская крупноплодная*, *Киевская гибридная*, *Ласунка*, *Пурпурная садовая* и *Сентябрьская*, а также 8 сортов и природной формы *A. kolomikta* – *Превосходная*, *Ароматная*, *Достойная*, *Однодомная*, *Сентябрьская*, *ВИР-1*, *Вафельная* и *Ботаническая*.

Сравнительную оценку их биохимического состава осуществляли по широкому спектру показателей, относящихся к разным классам действующих веществ. В свежих усредненных пробах зрелых плодов определяли содержание: сухих веществ – по ГОСТ 28561-90 [3]; аскорбиновой кислоты (витамина С) – стандартным индофенольным методом [4]; титруемых кислот (общей кислотности) – объемным методом [4]. В высушенных при температуре 60 °С пробах растительного материала определяли содержание: гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую) – спектрофотометрическим методом [5]; растворимых сахаров – ускоренным полумикрометодом [6]; пектиновых веществ – кальциево-пектатным методом [4]; суммы антоциановых пигментов – по методу Т. Swain, W. E. Hillis [7] (с построением градуировочной кривой по кристаллическому цианидину, полученному из плодов аронии черноплодной и очищенному по методике Ю. Г. Скориковой и Э. А. Шафтан [8]); собственно антоцианов и суммы катехинов (с использованием ванилинового реактива) – фотоэлектроколориметрическим методом [4, 9]; суммы флавонолов (в пересчете на рутин) – спектрофотометрическим методом [4]; дубильных веществ – титрометрическим методом Левентала [10]. Все аналитические определения выполнены в трехкратной биологической повторности. Данные статистически обработаны с использованием программы Excel.

Результаты и их обсуждение. В результате выполненных исследований обозначены диапазоны изменений основных характеристик биохимического состава плодов в таксономических рядах представителей сем. Ericaceae и Actinidiaceae (табл. 1). Сравнение данных диапазонов у исследуемых видов интродуцентов показало, что плоды *O. macrocarpus* отличались наиболее высоким содержанием свободных органических кислот, лейкоантоцианов, катехинов и дубиль-

ных веществ при наименьшем, сопоставимом с таковым у обоих видов актинидии, содержании растворимых сахаров, а также самом низком показателе сахарокислотного индекса и наименьшем количестве сухих и пектиновых веществ. У плодов *V. corymbosum*, характеризовавшихся максимальным значением сахарокислотного индекса, установлено наиболее активное накопление гидроксикоричных кислот, растворимых сахаров, собственно антоцианов, флавонолов и биофлавоноидов в целом при наименьшем содержании дубильных веществ, аскорбиновой и свободных органических кислот. Плоды *A. arguta*, как и плоды *A. kolomikta*, в ряду исследуемых видов оказались наиболее богаты сухими и пектиновыми веществами, но вместе с тем отличались отсутствием в составе Р-витаминного комплекса собственно антоцианов при наименьшем содержании в них растворимых сахаров и дубильных веществ. Наряду с этим плоды *A. arguta* характеризовались минимальным накоплением гидроксикоричных кислот и флавонолов. В отличие от *A. arguta*, *A. kolomikta* занимала лидирующее положение в содержании в плодах аскорбиновой кислоты, которое в несколько раз превосходило таковое у остальных видов интродуцентов, но при этом для нее было показано наименьшее содержание лейкоантоцианов, катехинов и биофлавоноидов.

Т а б л и ц а 1. Диапазоны изменений в таксономических рядах интродуцентов сем. *Ericaceae* и *Actinidiaceae* количественных показателей биохимического состава плодов (в сухом веществе) в годы исследований

Table 1. Ranges of changes in taxonomic rows of *Oxycoccus macrocarpus* family introduced species of quantitative indexes of fruits biochemical composition (in dry matter) in the years of the study

Показатель	Год	<i>Oxycoccus macrocarpus</i>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	<i>Actinidia arguta</i>	<i>Actinidia kolomikta</i>
Сухие вещества, %	2016	11,8–13,7	13,4–17,0	17,4–24,5	16,5–23,4
	2017	11,6–13,0	12,5–17,2	15,2–21,9	15,5–23,5
Свободные органические кислоты, %	2016	21,6–27,4	3,5–11,6	4,0–12,2	11,1–13,6
	2017	26,9–29,9	5,4–10,5	9,6–12,8	11,8–18,4
Аскорбиновая кислота, мг%	2016	461,2–533,0	248,7–357,9	200,0–536,3	1894,3–3280,5
	2017	387,3–423,7	335,2–448,1	164,4–722,3	2421,3–4070,4
Гидроксикоричные кислоты, мг%	2016	565,8–823,7	733,7–1141,8	177,4–333,9	298,5–679,6
	2017	601,2–678,2	676,2–920,2	156,3–205,0	322,0–632,2
Растворимые сахара, %	2016	34,7–41,0	45,3–59,3	26,0–40,3	25,0–40,3
	2017	23,0–34,7	51,0–60,0	29,0–37,0	32,7–39,7
Сахарокислотный индекс	2016	1,4–1,7	4,5–15,1	2,3–10,0	1,8–3,6
	2017	0,8–1,2	5,1–11,1	2,4–3,9	1,8–3,4
Пектиновые вещества, %	2016	3,5–6,3	4,2–6,4	6,2–12,6	8,1–13,0
	2017	5,7–7,2	8,4–9,6	7,6–12,0	7,9–9,9
Собственно антоцианы, мг%	2016	1913,3–2765,0	4506,7–9150,0	0	0
	2017	1700,0–3216,0	2706,7–5775,0	0	0
Лейкоантоцианы, мг%	2016	3482,5–4244,3	2670,7–5104,5	2366,0–2825,3	910,0–1378,0
	2017	3934,0–6672,0	2298,3–4326,0	2366,0–3891,3	884,0–1291,3
Сумма антоциановых пигментов, мг%	2016	5960,5–7007,0	7297,3–14254,5	2366,0–2825,3	910,0–1378,0
	2017	7098,0–8372,0	5005,0–10101,0	2366,0–3891,3	884,0–1291,3
Катехины, мг%	2016	1342,3–2062,7	797,3–1126,7	593,7–1100,7	478,1–702,0
	2017	1046,5–2626,0	705,3–1054,1	624,0–775,7	524,3–606,7
Флавонолы, мг%	2016	1238,0–1635,3	1510,9–2014,1	864,6–1017,4	869,0–1471,6
	2017	982,5–1329,7	1360,2–1818,7	633,2–864,6	755,4–1213,9
Сумма биофлавоноидов, мг%	2016	8769,7–10378,9	9840,1–17185,1	3863,3–4856,8	2367,5–3395,6
	2017	9526,2–12026,4	7373,8–12625,0	3854,6–5422,4	2280,9–3029,6
Дубильные вещества, %	2016	2,33–2,87	1,77–2,58	1,39–3,10	2,08–3,51
	2017	2,35–4,15	1,70–2,60	1,70–2,40	1,70–2,40

Обращает на себя внимание несопоставимость диапазонов варьирования в таксономических рядах исследуемых видов количественных характеристик биохимического состава их плодов. На наш взгляд, это обусловлено генотипическими различиями параметров накопления в них отдельных химических соединений и косвенно свидетельствовало о разной степени их генетической детерминированности, что необходимо учитывать в селекционном процессе при выведении новых сортов интродуцентов.

С целью установления степени зависимости от генотипа количественных характеристик биохимического состава плодов последних проведено сравнение уровней их изменчивости в соответствующих таксономических рядах в годы наблюдений. Для оценки уровня изменчивости анализируемых признаков мы ориентировались на шкалу Г.Н. Зайцева [11], предусматривающую их распределение на 5 групп: с очень низким уровнем изменчивости ($V < 7\%$), низким ($V = 8-12\%$), средним ($V = 13-20\%$), повышенным ($V = 21-40\%$) и очень высоким ($V > 41\%$).

Анализ данных, приведенных в табл. 2, выявил весьма широкий диапазон изменений коэффициентов вариации 14 количественных характеристик биохимического состава плодов в таксономических рядах интродуцентов как в отдельные годы, так и в среднем за период наблюдений. Это свидетельствовало о разном уровне их генетической детерминированности и позволяло обозначить признаки, обладающие наибольшей и, соответственно, наименьшей степенью внутри- и межвидовой изменчивости. Как следует из табл. 3, у всех видов интродуцентов существенное влияние на доленое участие в биохимическом составе плодов показателей с тем или иным уровнем изменчивости в таксономических рядах оказывал гидротермический режим сезона, в связи с чем представлялось целесообразным при анализе этих данных ориентироваться на усредненные значения исследуемого параметра.

Единственным видом в ряду интродуцентов со значительным количеством биохимических характеристик с очень низким уровнем изменчивости (36 %) являлась *O. macrocarpus*, у которой достаточно высокой (28 %) была также доля показателей с низким уровнем изменчивости, тогда как на долю признаков со средним ее уровнем приходилось 29 %. Наряду с этим в качественном составе плодов клюквы крупноплодной установлена минимальная среди исследуемых видов относительная доля показателей с повышенным уровнем изменчивости (не более 7 %), при отсут-

Т а б л и ц а 2. Средние для таксономических рядов интродуцентов сем. Ericaceae и Actinidiaceae значения коэффициентов вариации количественных показателей биохимического состава плодов в годы исследований, %

Table 2. Average for taxonomic series of introducers of the family Ericaceae and Actinidiaceae values of the coefficients of variation of quantitative indicators of the biochemical composition of the fruit in the years of research, %

Показатель	<i>Oxycoccus macrocarpus</i>			<i>Vaccinium corymbosum</i>			<i>Actinidia arguta</i>			<i>Actinidia kolomikta</i>		
	2016	2017	средн.	2016	2017	Средн. знач.	2016	2017	Средн. знач.	2016	2017	Средн. знач.
Сухие вещества, %	5,3	4,4	4,9	8,4	10,9	9,7	11,9	16,5	14,2	11,8	13,1	12,5
Свободные органические кислоты, %	8,4	3,9	6,2	42,6	20,9	31,8	33,5	11,6	22,6	16,2	15,5	15,9
Аскорбиновая кислота, мг%	5,3	3,5	4,4	10,5	11,4	11,0	27,3	60,9	44,1	20,4	18,7	19,6
Гидроксикоричные кислоты, мг%	14,5	4,5	9,5	13,6	10,4	12,0	21,4	11,0	16,2	25,1	25,4	25,3
Растворимые сахара, %	7,1	14,2	10,7	9,1	6,2	7,7	15,5	9,8	12,7	12,9	7,5	10,2
Сахарокислотный индекс	8,9	15,6	12,3	36,4	24,2	30,3	65,2	21,0	43,1	22,8	20,6	21,7
Пектиновые вещества, %	20,9	9,9	15,4	12,9	4,2	8,6	25,7	20,4	23,1	14,4	8,1	11,3
Собственно антоцианы, мг%	12,5	22,5	17,5	23,9	22,6	23,3	0	0	0	0	0	0
Лейкоантоцианы, мг%	7,3	18,9	13,1	22,7	18,0	20,4	7,3	17,8	12,6	14,5	16,1	15,3
Сумма антоциановых пигментов, мг%	7,3	6,6	7,0	22,8	20,1	21,5	7,3	17,8	12,6	14,5	16,1	15,3
Катехины, мг%	14,4	34,2	24,3	10,8	13,8	12,3	23,9	9,8	16,9	12,7	5,5	9,1
Флавонолы, мг%	10,2	10,8	10,5	9,2	12,0	10,6	5,5	10,9	8,2	18,4	19,1	18,8
Сумма биофлавоноидов, мг%	6,7	8,6	7,7	19,0	15,8	17,4	8,8	12,8	10,8	11,5	11,1	11,3
Дубильные вещества, %	7,3	21,2	14,3	14,0	13,7	13,9	26,2	14,9	20,6	21,1	13,7	17,4
Средневзвешенное значение V , %	9,7	12,8	11,3	18,3	14,6	16,5	21,5	18,1	19,8	16,6	14,7	15,7

Таблица 3. Относительная доля показателей биохимического состава плодов интродуцентов сем. Ericaceae и Actinidiaceae с разным уровнем изменчивости в двухлетнем цикле наблюдений, %
 Table 3. Relative share of characteristics of fruits biochemical composition of introduced species of Ericaceae and Actinidiaceae families with a different variability level in a two-year observation cycle, %

Уровень изменчивости, %	<i>Oxycoccus macrocarpus</i>			<i>Vaccinium corymbosum</i>			<i>Actinidia arguta</i>			<i>Actinidia kolomikta</i>		
	2016	2017	Средн. знач.	2016	2017	Средн. знач.	2016	2017	Средн. знач.	2016	2017	Средн. знач.
Очень низкий (< 7)	50	36	36	0	14	0	23	0	0	0	8	0
Низкий (8–12)	29	21	28	36	29	50	15	38	15	15	23	31
Средний (13–20)	14	21	29	28	36	21	8	46	46	62	54	54
Повышенный (21–40)	7	22	7	29	21	29	46	8	23	23	15	15
Очень высокий (>41)	0	0	0	7	0	0	8	8	16	0	0	0

ствии признаков с ее очень высоким уровнем. Для *V. corymbosum* была показана в целом более высокая, чем у *O. macrocarpus*, вариабельность характеристик биохимического состава плодов в пределах таксономического ряда, что подтверждалось полным отсутствием в нем доли признаков с очень низким уровнем изменчивости при существенном возрастании (до 29 %) таковой с ее повышенным уровнем. При этом доминирующее положение в биохимическом составе плодов голубики занимали признаки с низким уровнем изменчивости (50 %) на фоне снижения до 21 % доли признаков с ее средним уровнем.

В отличие от представителей сем. Ericaceae, биохимический состав плодов обоих видов сем. Actinidiaceae в двухлетнем цикле наблюдений характеризовался более выраженной генотипической изменчивостью. Наиболее отчетливо это проявилось у *A. arguta*, характеризовавшейся не только отсутствием в нем признаков с очень низким уровнем изменчивости при самом незначительном (15 %) количестве таковых с ее низким уровнем, но и появлением признаков с очень высоким уровнем изменчивости, относительная доля которых достигала 16 %, на фоне весьма значительного количества признаков с ее повышенным уровнем. Вместе с тем для обоих видов сем. Actinidiaceae, особенно для *A. kolomikta*, показано более высокое, нежели у представителей сем. Ericaceae, количество признаков со средним уровнем изменчивости (46–54 % против 21–29 %) (табл. 3). Заметим, что биохимический состав плодов *A. kolomikta* в целом характеризовался меньшим уровнем изменчивости в таксономическом ряду по сравнению с таковым у плодов *A. arguta*. Это подтверждалось не только отсутствием в нем признаков с ее очень высоким уровнем при снижении доли таковых с повышенным уровнем, но и увеличением вдвое количества признаков с низким уровнем изменчивости при заметном увеличении доли таковых с ее средним уровнем.

Результаты данных исследований позволили расположить исследуемые виды интродуцентов в порядке ослабления зависимости от генотипа совокупности количественных характеристик биохимического состава плодов в следующей последовательности: *A. arguta* > *A. kolomikta* > *V. corymbosum* > *O. macrocarpus*.

Как следует из табл. 2, у всех исследуемых видов интродуцентов далеко не во всех случаях соответствие уровня генотипической изменчивости конкретного признака той или иной области принятой градации сохранялось на протяжении двухлетнего периода наблюдений, что однозначно свидетельствовало о выраженной его зависимости от гидротермического режима сезона в период формирования плодов. При этом каждому виду интродуцентов были присущи индивидуальные особенности генотипической изменчивости количественных характеристик биохимического состава плодов. Для выявления последовательности анализируемых признаков (14 у представителей сем. Ericaceae и 12 у сем. Actinidiaceae) в порядке снижения уровня генетической детерминированности, указывающего на усиление сортовых различий, были определены позиции каждого из них в соответствии с увеличением коэффициентов вариации, усредненных в двухлетнем цикле наблюдений (табл. 4).

Если исходить из посыла, что первые 5 позиций в приведенных рядах занимают признаки, обладающие наибольшим, а последние 5 – признаки с наименьшим уровнем генетической детерминированности, то из табл. 4 следует, что у всех исследуемых видов интродуцентов наименее выраженные сортовые различия были установлены для содержания в плодах сухих веществ. При этом подобные различия у *O. macrocarpus* были выявлены также для содержания в них аскорбиновой

Т а б л и ц а 4. Позиции характеристик биохимического состава плодов интродуцентов сем. Ericaceae и Actinidiaceae в рядах снижения уровня генетической детерминированности в двулетнем цикле наблюдений

Table 4. Positions of characteristics of biochemical structure of fruits of introduced species fam. Ericaceae and Actinidiaceae in the ranks of decrease in level of genetic determinacy in a biannual cycle of observations

Показатель	<i>O. macrocarpus</i>	<i>V. corymbosum</i>	<i>A. arguta</i>	<i>A. kolomikta</i>
Сухие вещества	2	3	5	5
Свободные органические кислоты	3	14	9	7
Аскорбиновая кислота	1	5	12	10
Гидроксикоричные кислоты	6	6	6	12
Растворимые сахара	8	1	4	2
Сахарокислотный индекс	9	13	11	11
Пектиновые вещества	12	2	10	4
Собственно антоцианы	13	12	0	0
Лейкоантоцианы	10	10	3	6
Сумма антоциановых пигментов	4	11	3	6
Катехины	14	7	7	1
Флавонолы	7	4	1	9
Сумма биофлавоноидов	5	9	2	3
Дубильные вещества	11	8	8	8

сходства в уровне генетической детерминированности ряда характеристик биохимического состава плодов. Так, наименьшей стабильностью в сортовых рядах обоих видов сем. Ericaceae характеризовались параметры накопления в них собственно антоцианов и лейкоантоцианов, тогда как наибольшей – аскорбиновой кислоты, отмеченной у обоих видов сем. Actinidiaceae, напротив, высоким уровнем варибельности. У большинства видов наименьшая изменчивость в сортовых рядах установлена для содержания в плодах растворимых сахаров и суммы биофлавоноидов (за исключением *O. macrocarpus* в первом случае и *V. corymbosum* во втором), тогда как наибольшая – для показателя сахарокислотного индекса и содержания дубильных веществ (за исключением *O. macrocarpus* в первом случае и *V. corymbosum* во втором). У *V. corymbosum* и *A. arguta* выявлена слабая зависимость от генотипа содержания в плодах флавонолов, тогда как у *V. corymbosum* и *A. kolomikta* – пектиновых веществ при сильной зависимости от него параметров накопления последних у *O. macrocarpus* и *A. arguta*. В наших более ранних исследованиях при оценке изменчивости биохимического состава плодов в таксономических рядах других представителей родов *Vaccinium* и *Oxycoccus* были получены близкие приведенным выше результаты [12], что свидетельствует об общности характера выявленных закономерностей для сем. Ericaceae.

Полученные данные о генотипической изменчивости количественных характеристик биохимического состава плодов исследуемых интродуцентов имеют чрезвычайно важное значение для селекционного процесса, поскольку при создании новых сортов эта информация позволит прогнозировать возможные изменения в качестве плодов преимущественно за счет направленной регуляции содержания органических соединений с наиболее выраженной лабильностью в таксономических рядах.

Заключение. В результате сравнительного исследования варибельности 14 количественных характеристик биохимического состава плодов в сортовых рядах 4 видов интродуцентов из сем. Ericaceae и Actinidiaceae – *O. macrocarpus*, *V. corymbosum*, *A. arguta* и *A. kolomikta* установлена ее наименьшая зависимость от генотипа у *O. macrocarpus* и наибольшая у *A. arguta* при

и свободных органических кислот, суммы антоциановых пигментов и общего количества биофлавоноидов, у *V. corymbosum* – для содержания аскорбиновой кислоты, растворимых сахаров, пектиновых веществ и флавонолов, у *A. arguta* – для параметров накопления растворимых сахаров, лейкоантоцианов, флавонолов и общего количества биофлавоноидов, у *A. kolomikta* – для содержания растворимых сахаров, пектиновых веществ, катехинов и суммарного количества биофлавоноидов. Соответственно, наиболее выраженные сортовые различия были установлены у *O. macrocarpus* для содержания в плодах пектиновых и дубильных веществ, собственно антоцианов, лейкоантоцианов и катехинов, у *V. corymbosum* – для такового свободных органических кислот, собственно антоцианов, лейкоантоцианов и показателя сахарокислотного индекса, у *A. arguta* – для параметров накопления аскорбиновой и свободных органических кислот, пектиновых и дубильных веществ, а также для показателя сахарокислотного индекса, у *A. kolomikta* – для содержания аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, флавонолов, дубильных веществ и показателя сахарокислотного индекса.

Нетрудно убедиться в наличии у исследуемых видов интродуцентов определенного

наличии у исследуемых видов сходства в уровне генетической детерминированности ряда характеристик биохимического состава плодов. Показано, что наименьшей стабильностью в сортовых рядах обоих видов сем. Ericaceae характеризовались параметры накопления собственно антоцианов и лейкоантоцианов, тогда как наибольшей – аскорбиновой кислоты, которая у обоих видов сем. Actinidiaceae отличалась, напротив, высокой вариабельностью. У большинства исследуемых видов интродуцентов наименьшая изменчивость в сортовых рядах установлена для содержания в плодах растворимых сахаров и суммарного количества биофлавоноидов, тогда как наибольшая – для показателя сахарокислотного индекса и содержания дубильных веществ. У *V. corymbosum* и *A. arguta* выявлена слабая зависимость от генотипа содержания в плодах флавонолов, тогда как у *V. corymbosum* и *A. kolomikta* – пектиновых веществ при сильной зависимости от него параметров накопления последних у *O. macrocarpus* и *A. arguta*.

Список использованных источников

1. Сравнительная оценка биохимического состава плодов новых интродуцированных сортов клюквы крупноплодной (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers.) в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вест. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 1. – С. 16–24.
2. Биохимический состав плодов интродуцированных сортов актинидии аргута (*Actinidia arguta* Siebold et Zucc.) Planch, ex Miq.) в Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] // Актуальные вопросы инновационного развития генетики, селекции и интродукции садовых культур : материалы Всерос. дистанц. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Москва, 1–31 марта 2017 г. – М., 2017. – С. 274–278.
3. Методы определения сухих веществ: ГОСТ 8756.2-82. – Введ. 01.01.1983. – М. : Изд-во стандартов, 1982. – 5 с.
4. Методы биохимического исследования растений / под ред. А. И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Ленинград : Агропромиздат, 1987. – 430 с.
5. Марсов, Н. Г. Фитохимическое изучение и биологическая активность брусники, клюквы и черники : дис. ... канд. фарм. наук / Н. Г. Марсов. – Пермь, 2006. – 200 с.
6. Плешков, Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – 3-е изд., доп. и перераб. – М. : Колос, 1985. – 255 с.
7. Swain, T. The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents / T. Swain, W. Hillis // J. Sci. Food Agric. – 1959. – Vol. 10, N 1. – P. 63–68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
8. Скорикова, Ю. Г. Методика определения антоцианов в плодах и ягодах / Ю. Г. Скорикова, Э. А. Шафтан // Тр. III Всесоюз. семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод (27–30 сент. 1966 г.) / М-во высш. и сред. спец. образования РСФСР ; Урал. лесотехн. ин-т. – Свердловск, 1968. – С. 451–461.
9. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной / В. Ю. Андреева [и др.] // Фармация. – 2013. – № 3. – С. 19–21.
10. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье // Государственная фармакопея СССР. – М., 1987. – Вып. 1 : Общие методы анализа. – С. 286–287.
11. Зайцев, Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г. Н. Зайцев. – М. : Наука, 1974. – 424 с.
12. Формирование биохимического состава плодов видов семейства Ericaceae (Вересковые) при интродукции в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]; под ред. акад. В. И. Парфенова. – Минск : Беларус. навука. – 2011. – 307 с.

References

1. Rupasova Zh. A., Pavlovskii N. B., Vasilevskaya T. I., Krinickaya N. B., Tishkovskaya E. V., Pavlovskaya A. G., Titok V. V., Reshetnikov V. N., Pinchukova Ju. M., Lishtvan I. I. Comparative evaluation of the biochemical composition of the fruits of the new introduced large-fruited cranberry varieties (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers.) in the conditions of Belarus. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 1, pp. 16–24 (in Russian).
2. Rupasova Zh. A., Garanovich I. M., Shpital'naya T. V., Vasilevskaya T. I., Krinickaya N. B., Frolova L. V. Biochemical composition of fruits of introduced varieties of actinidia arguta (*Actinidia arguta* Siebold et Zucc.) Planch, ex Miq.) in Belarus. *Aktual'nyye voprosy innovatsionnogo razvitiya genetiki, seleksii i introduksii sadovykh kul'tur: materialy Vserossiiskoi distantsionnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem* [Topical issues of innovative development of genetics, plant breeding and introduction of horticultural crops: materials of the All-Russian distance scientific-practical conference with international participation]. Moscow, 2017, pp. 274–278 (in Russian).
3. *Methods for determination of dry substances: GOST 8756.2-82*. Vved. 01.01.1983. Moscow, Standards Publishing, 1982. 5 p. (in Russian).
4. Ermakov A. I. (ed.). *Methods of biochemical research of plants. 3rd ed.* Leningrad, Agropromizdat Publ., 1987. 430 p. (in Russian).
5. Marsov N. G. *Phytochemical study and biological activity of cranberries, cranberries and blueberries*. Ph. D. Thesis. Perm', 2006. 200 p. (in Russian).
6. Pleshkov B. P. *Practical work on plant biochemistry. 3rd ed.* Moscow, Kolos Publ., 1985. 255 p. (in Russian).
7. Swain T., Hillis W. The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1959, vol. 10, no. 1, pp. 63–68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>

8. Skorikova Yu. G., Shaftan E. A. Method for the determination of anthocyanins in fruits and berries. *Trudy III Vsesoyuznogo seminar po biologicheski aktivnym (lechebnym) veshchestvam plodov i yagod (27–30 sentyabrya 1966 goda)* [Proceedings of the III All-Union seminar on biologically active (medicinal) substances of fruits and berries (September 27–30, 1966)]. Sverdlovsk, 1968, pp. 451–461 (in Russian).

9. Andreeva V. Yu., Kalinkina, G. I., Kolomiets N. E., Isaikina N. V. Method for the determination of anthocyanins in the fruit of chokeberry aronia. *Farmatsiya* [Pharmacy], 2013, no. 3, pp. 19–21 (in Russian).

10. Determination of the content of tannins in medicinal plant raw materials. *State Pharmacopoeia of the USSR. Issue 1. General analysis methods*. Moscow, 1987, pp. 286–287 (in Russian).

11. Zaitsev G. N. *Mathematical statistics in experimental botany*. Moscow, Nauka Publ., 1974. 424 p. (in Russian).

12. Rupasova Zh. A., Reshetnikov V. N., Vasilevskaya T. I., Yakovlev A. P., Pavlovskii N. B. *Formation of the biochemical composition of the fruits of the Ericaceae family (Heathers) when introduced in Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 307 p. (in Russian).

Информация об авторах

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

Гаранович Игорь Михайлович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: I.Garanovich@cbg.org.by

Шпитальная Тамара Васильевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bel.dendr@gmail.com

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

Гончарова Людмила Владимировна – канд. биол. наук, уч. секретарь. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: L.Goncharova@cbg.org.by

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

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

Павловская Алла Генриховна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavlovskiy@tut.by

Пигуль Марина Леоновна – науч. сотрудник. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, аг. Самохваловичи, Минский район, Минская область, Республика Беларусь).

Фролова Людмила Владимировна – канд. с.-х. наук, заведующий лабораторией. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, аг. Самохваловичи, Минский район, Минская область, Республика Беларусь).

Information about the authors

Zhanna A. Rupasova – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by

Igor M. Garanovich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: I.Garanovich@cbg.org.by

Tamara V. Shpitalnaya – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bel.dendr@gmail.com

Nikolay B. Pavlovskiy – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavlovskiy@tut.by

Ljudmila V. Goncharova – Ph. D. (Biol.), Scientific Secretary. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: L.Goncharova@cbg.org.by

Tamara I. Vasilevskaya – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: T.Vasileuskaya@cbg.org.by

Natalia B. Krinitskaya – Researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Alla G. Pavlovskaya – Researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavlovskiy@tut.by

Marina L. Pigul – Researcher. Institute of Fruit Growing (Kovalev Str., 2, 223013, ag. Samokhvalovichy, Minsk District, Minsk Region, Republic of Belarus).

Ljudmila V. Frolova – Ph. D. (Agric.), Head of the Laboratory. Institute of Fruit Growing (Kovalev Str., 2, 223013, ag. Samokhvalovichy, Minsk District, Minsk Region, Republic of Belarus).

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 581.2
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-411-419>

Поступила в редакцию 17.07.2019
Received 17.07.2019

Е. Г. Тюлькова¹, Л. Ф. Кабашникова²

¹Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации, Гомель, Республика Беларусь
²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ОВСЯНИЦЫ ТРОСТНИКОВОЙ *FESTUCA ARUNDINACEA* SCHREB.

Аннотация. В статье представлены результаты определения активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. при обработке листовых пластинок различными летучими органическими соединениями (пентаном, гексаном, бензолом, *o*-ксилолом, бенз(а)-пиреном, бутилацетатом) и их смесями.

С учетом динамики содержания малонового диальдегида, стабильного продукта ПОЛ, установлено, что влияние бензола, *o*-ксилола, бутилацетата и всех смесей вызывает более значительное усиление ПОЛ через 1 сут после обработки, чем после 3 сут эксперимента. При этом *o*-ксилол и смесь пентана, гексана и бенз(а)пирена оказывали наиболее интенсивное действие на процессы ПОЛ по сравнению с другими соединениями. Через 3 сут количество малонового диальдегида изменялось более интенсивно по сравнению с 1-ми сутками после обработки пентаном, гексаном и бенз(а)пиреном, причем пентан и гексан вызывали более выраженные изменения по сравнению с бенз(а)пиреном.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, овсяница тростниковая *Festuca arundinacea* Schreb., пентан, гексан, бензол, *o*-ксилол, бенз(а)пирен, бутилацетат

Для цитирования: Тюлькова, Е. Г. Влияние летучих органических соединений на перекисное окисление липидов овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. / Е. Г. Тюлькова, Л. Ф. Кабашникова // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 411–419. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-411-419>

E. G. Tulkova¹, L. F. Kabashnikova²

¹Belarussian Trade and Economic University of Consumer Cooperation, Gomel, Republic of Belarus
²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS ON *FESTUCA ARUNDINACEA* SCHREB. LIPID PEROXIDATION

Abstract. The article presents the results of determining the activity of lipid peroxidation (LPO) in biological membranes of the reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. plants in an experiment on the processing of leaf blades with different amounts of volatile organic compounds (pentane, hexane, benzene, *o*-xylol, benz(a)pyrene, butylacetate and their mixtures).

Taking into account the dynamics of the content of malonic dialdehyde – of a stable product of LPO, it was established during the experiment that the effect of benzene, *o*-xylol, butyl acetate and all mixtures caused a more significant increase LPO in 1 day after treatment compared to 3 days of the experiment. At the same time, *o*-xylene and a mixture of pentane, hexane, and benz(a)pyrene exerted the most intense effect on the processes of LPO in comparison with other compounds.

After 3 days, the amount of malonic dialdehyde changed more intensively compared to 1 day after treatment with pentane, hexane and benz(a)pyrene, and pentane and hexane caused more pronounced differences compared to benz(a)pyrene.

Keywords: lipid peroxidation, malonic dialdehyde, reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb., pentane, hexane, benzene, *o*-xylol, benz(a)pyrene, butylacetate

For citation: Tulkova E. G., Kabashnikova L. F. Effect of volatile organic compounds on *Festuca arundinacea* Schreb. lipid peroxidation. *Vesti Natsyuanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnyh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 411–419 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-411-419>

Введение. За последние годы в Республике Беларусь на фоне снижения общего объема выбросов загрязняющих веществ наблюдается рост количества выбросов в атмосферу от стационарных источников – от 371,1 тыс. т в 2011 г. до 453,4 тыс. т в 2017 г. [1]. При этом в результате

функционирования отдельных промышленных предприятий в атмосферу поступают летучие органические соединения, удельный вес которых в общем объеме выбросов загрязняющих веществ по предприятию является наибольшим и которые способны оказывать определенное влияние на рост и развитие растительных организмов. Такую группу веществ составляют алканы, циклоалканы, непредельные и ароматические углеводороды, спирты, сложные эфиры. Одним из критериев адаптации растений к действию летучих органических соединений может служить интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) как результат соотношения деструктивных окислительных процессов и активности антиоксидантной защиты растений. В настоящее время имеются данные о влиянии тяжелых металлов [2], автотранспортного загрязнения [3], оксидов азота, серы, углерода, взвешенных веществ [4–6], температурного воздействия на накопление продуктов ПОЛ в растениях [7]. При этом наличие небольшого количества данных о влиянии летучих органических токсикантов на показатели ПОЛ растений вызывает интерес к изучению дозовых зависимостей между содержанием малонового диальдегида и количеством таких соединений.

Цель исследования – сравнительное изучение влияния различных доз летучих органических соединений на содержание малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в заданных условиях эксперимента.

Материалы и методы исследования. Выбор овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в качестве исследуемого объекта в экспериментальных условиях обусловлен широкой распространенностью растения в городских условиях. Использование пентана, гексана, бензола, *o*-ксилола, бутилацетата обусловлено преобладающим количеством группы летучих органических соединений, представителями которой являются данные вещества, в выбросах отдельных промышленных предприятий г. Гомеля (ОАО «Гомельский завод литья и нормалей») по сравнению с другими загрязняющими веществами. Что касается бенз(а)пирена, то, несмотря на невысокое наличие в выбросах предприятий теплоэнергетики (ТЭЦ-2), его использование в эксперименте связано с высокой токсичностью, способностью в небольших количествах вызывать значительный эффект, недостаточной изученностью характера и закономерностей влияния на процессы ПОЛ в листьях растений и возможностью проведения сравнительной оценки влияния полициклического ароматического углеводорода и одноядерных ароматических углеводородов (бензола, *o*-ксилола) на растительные организмы.

Листовые пластинки овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. обрабатывали водными растворами углеводородов. Используемые дозы углеводородов рассчитывали исходя из установленных для атмосферного воздуха предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ [8]. В соответствии с нормативами ПДК пентана в атмосферном воздухе составляет 100000,0 мкг/м³, гексана – 60000,0 мкг/м³, бензола – 100,0 мкг/м³, ксилолов – 200 мкг/м³, бутилацетата – 100,0 мкг/м³, бенз(а)пирена – 5,0 нг/м³. Для всех соединений, кроме бенз(а)пирена, использовали величину максимальной разовой ПДК, для бенз(а)пирена – среднесуточную ПДК [8].

Контролем служили необработанные растения овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. Экспериментальными считали растения, обработанные водными растворами исследуемых соединений в следующих концентрациях: 0,0001–0,03 мг/мл пентана, 0,00006–0,018 мг/мл гексана, 0,0001–0,03 мкг/мл бензола, 0,0002–0,06 мкг/мл *o*-ксилола, 0,000005–0,0015 нг/мл бенз(а)пирена, 0,0001–0,03 мкг/мл бутилацетата (бутилового эфира уксусной кислоты).

Всего в процессе эксперимента было использовано 5 различных доз вводимых соединений, что численно соответствовало 1, 50, 10, 200 и 300 ПДК пентана, гексана, бензола, *o*-ксилола, бенз(а)пирена и бутилацетата в атмосферном воздухе.

Для выявления возможных эффектов совместного воздействия исследуемых соединений использовали смеси следующих концентраций: 0,01 мкг/мл бутилацетата + 0,02 мкг/мл *o*-ксилола; 0,02 мкг/мл бутилацетата + 0,04 мкг/мл *o*-ксилола; 0,01 мкг/мл бензола + 0,02 мкг/мл *o*-ксилола; 0,02 мкг/мл бензола + 0,04 мкг/мл *o*-ксилола; 0,01 мг/мл пентана + 0,006 мг/мл гексана; 0,02 мг/мл пентана + 0,012 мг/мл гексана; 0,01 мг/мл пентана + 0,006 мг/мл гексана + 0,0005 нг/мл бенз(а)пирена; 0,02 мг/мл пентана + 0,012 мг/мл гексана + 0,001 нг/мл бенз(а)пирена.

Обработку листовых пластинок овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. осуществляли путем опрыскивания водными растворами (по 50 мл водного раствора каждой дозы вводимого соединения).

Актыўнасць ПОЛ ацэнівалі па колькасці малоновага дыальдегіда в рэзультате цветной реакцыі с тиабарбітуровай кіслотой. Сoderжання малоновага дыальдегіда адредэлялі с пoмoщью спектрофотометра Shimadzu UV-2401 PC (Shimadzu, Японія) в максимуме поглощения при длине волны 532 нм и вычисляли как величину оптической плотности ($\lambda = 532\text{--}630$ нм), умноженную на коэффициент молярной экстинкции 21,285.

Дoстoверность различий между содержанием малоноваго дыальдегіда в экспериментальных и контрольных пробах ацэнівалі с пoмoщью дисперсионного анализа. Математическую адробтку цифрового материала выдoлнялі с пoмoщью программ M. Excel и Statistica.

С целью проведения сравнительной количественной аценки изменения содержания малоноваго дыальдегіда в условиях эксперимента проводили вычисления разницы между средними значениями содержания малоноваго дыальдегіда в начале и в конце исследования при адробтке образцов каждым из используемых соединений.

Результаты и их адробуждение. Результаты адределения содержания малоноваго дыальдегіда в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента по адробтке углеводородами и их смесями представлены в табл. 1–7.

Данные табл. 1–7 свидетельствуют о том, что адробтка пентаном, гексаном, бензолом, *o*-ксилолом, бенз(а)пиреном, бутилацетатом и их смесями является причиной увеличения содержания малоноваго дыальдегіда в экспериментальных образцах по сравнению с контрольными пробами практически при всех использованных дозах внесения. При этом адробтка листовых пластинок овсяницы предельными углеводородами приводила к росту содержания малоноваго дыальдегіда в случае воздействия максимальной дозой пентана (0,03 мг/мл) в 5,87 раза по сравнению с контрольными пробами через 1 сут и в 7,69 раза – через 3 сут; адробтка минимальной дозой пентана (0,0001 мг/мл) приводила к увеличению исследуемого показателя в 3,07 раза через 1 сут эксперимента и в 6,54 раза – через 3 сут (см. табл. 1).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что адробтка листовых пластинок овсяницы максимальной дозой гексана (0,018 мг/мл) обусловило менее резкое, чем при адробтке пентаном, увеличение содержания малоноваго дыальдегіда по сравнению с контролем: в 4,01 раза через 1 сут после адробтки и в 7,25 раза – через 3 сут.

При воздействии минимальной дозы гексана (0,00006 мг/мл) не отмечалось увеличения содержания малоноваго дыальдегіда, которое через 1 и 3 сут было ниже, чем в контроле. В связи с этим предположение о том, что влияние органических загрязнителей обязательно должно вызывать усиление процессов ПОЛ в биологических мембранах растений, не подтвердилось.

Таблица 1. Содержание малоноваго дыальдегіда в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента после адробтки пентаном

Table 1. Malondialdehyde content in cane fescue plants *Festuca arundinacea* Schreb. under experimental conditions after treatment with pentane

Концентрация раствора пентана, мг/мл	Содержание малоноваго дыальдегіда, нмоль/мг сырой массы	
	через 1 сут	через 3 сут
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,0001	4,16±0,01*	7,89±0,12*
0,005	6,86±0,01*	7,08±0,01*
0,01	7,27±0,06*	7,58±0,01*
0,02	6,76±0,10*	8,91±0,06*
0,03	7,96±0,03*	9,28±0,04*

Примечание. * – достоверные различия в содержании малоноваго дыальдегіда при $p \leq 0,05$. То же в табл. 2–7.

Таблица 2. Содержание малоноваго дыальдегіда в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента после адробтки гексаном

Table 2. Malondialdehyde content in cane fescue plants *Festuca arundinacea* Schreb. under experimental conditions after treatment with hexane

Концентрация раствора гексана, мг/мл	Содержание малоноваго дыальдегіда, нмоль/мг сырой массы	
	через 1 сут	через 3 сут
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,00006	1,22±0,01	1,17±0,01
0,003	2,99±0,06*	3,60±0,03*
0,006	3,02±0,01*	4,77±0,07*
0,012	3,55±0,01*	6,0±0,04*
0,018	5,43±0,02*	8,74±0,03*

В целом, предельные углеводороды в обоих случаях вызывали увеличение содержания малонового диальдегида в большей степени через 3 сут эксперимента по сравнению с 1-ми сутками после обработки, причем воздействие пентана через 3 сут как в минимальной, так и в максимальной дозе вызывало резкий рост величины изучаемого показателя.

Ароматические углеводороды, аналогично алканам, судя по накоплению стабильных продуктов этого процесса, также в различной степени влияли на интенсивность ПОЛ (табл. 3–5).

Обработка листовых пластинок бензолом привела к росту содержания малонового диальдегида при максимальной дозе воздействия (0,03 мкг/мл) в 2,94 раза через 1 сут по сравнению с контролем и в 2,46 – через 3 сут, при минимальной дозе (0,0001 мкг/мл) – в 1,71 раза через 1 сут и не вызвала изменения данного показателя через 3 сут, т. е. влияние бензола проявлялось в большей степени через 1 сут после обработки (см. табл. 3). Воздействие *o*-ксилола также вызывало более интенсивное накопление малонового диальдегида через 1 сут после опрыскивания, однако проявлялось более интенсивно как в максимальной, так и в минимальной дозе внесения по сравнению с бензолом (табл. 4).

Данные табл. 4 свидетельствуют о том, что максимальная доза воздействия *o*-ксилола (0,06 мкг/мл) приводила к увеличению содержания малонового диальдегида в 4,98 раза через 1 сут эксперимента и в 4,63 раза – через 3 сут по сравнению с контролем; минимальная – в 4,25 и 1,66 раза через 1 и 3 сут соответственно. Таким образом, аналогично действию пентана, через 3 сут влияние *o*-ксилола через 1 сут после обработки мало различалось при воздействии минимальной и максимальной доз.

Таблица 3. Содержание малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента после обработки бензолом

Table 3. Malondialdehyde content in cane fescue plants *Festuca arundinacea* Schreb. under experimental conditions after treatment with benzene

Концентрация раствора бензола, мкг/мл	Содержание малонового диальдегида, нмоль/мг сырой массы	
	через 1 сут	через 3 сут
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,0001	2,31±0,03*	1,20±0,01
0,005	2,80±0,01*	1,61±0,02*
0,01	3,79±0,01*	2,41±0,01*
0,02	2,72±0,03*	2,33±0,01*
0,03	3,98±0,02*	2,97±0,01*

Таблица 5. Содержание малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента после обработки бенз(а)пиреном

Table 5. Malondialdehyde content in cane fescue plants *Festuca arundinacea* Schreb. under experimental conditions after treatment with benz(a)pyrene

Концентрация раствора бенз(а)пирена, нг/мл	Содержание малонового диальдегида, нмоль/мг сырой массы	
	через 1 сут	через 3 сут
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,000005	4,64±0,06*	6,92±0,05*
0,00025	4,86±0,04*	8,73±0,09*
0,0005	10,42±0,11*	9,61±0,06*
0,001	10,69±0,02*	9,65±0,09*
0,0015	11,17±0,01*	9,70±0,05*

Таблица 4. Содержание малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента после обработки *o*-ксилолом

Table 4. Content of malondialdehyde in plants reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. under experimental conditions after treatment with *o*-xylol

Концентрация раствора <i>o</i> -ксилола, мкг/мл	Содержание малонового диальдегида, нмоль/мг сырой массы	
	через 1 сут	через 3 сут
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,0002	5,75±0,01*	2,0±0,02*
0,01	5,80±0,02*	2,59±0,06*
0,02	6,03±0,01*	3,09±0,05*
0,04	6,26±0,01*	4,86±0,02*
0,06	6,75±0,01*	5,58±0,17*

Таблица 6. Содержание малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента после обработки бутилацетатом

Table 6. Content of malondialdehyde in plants reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. in an experiment after treatment with butyl acetate

Концентрация раствора бутилацетата, мкг/мл	Содержание малонового диальдегида, нмоль/мг сырой массы	
	через 1 сут	через 3 сут
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,0001	5,66±0,03*	4,77±0,01*
0,005	6,87±0,03*	6,80±0,01*
0,01	7,17±0,01*	7,48±0,05*
0,02	8,89±0,02*	9,48±0,02*
0,03	12,43±0,02*	11,49±0,07*

Бенз(а)пирен, представитель полициклических ароматических углеводородов, характеризуется более высокой токсичностью по сравнению с бензолом и *o*-ксилолом, что послужило причиной накопления малонового диальдегида в большем количестве (табл. 5), особенно после обработки максимальной дозой (0,0015 нг/мл).

Так, через 1 сут эксперимента содержание малонового диальдегида при воздействии 0,0015 нг/мл бенз(а)пирена увеличилось по сравнению с контролем в 8,25 раза, через 3 сут – в 8,04 раза, т. е. интенсивность процессов ПОЛ в биологических мембранах листьев овсяницы оказалась практически стабильной. Минимальная доза воздействия (0,000005 нг/мл) приводила к росту содержания малонового диальдегида в 3,42 раза через 1 сут после обработки и в 5,74 раза – через 3 сут, что свидетельствует об усилении эффекта бенз(а)пирена в конце эксперимента.

Бутилацетат наряду с этилацетатом всегда присутствует в выбросах отдельных промышленных предприятий, однако в последние годы вследствие некоторых изменений в технологическом процессе наблюдается довольно значительный рост объема выбросов бутилацетата в атмосферу. В нашем эксперименте обработка бутилацетатом листовых пластинок овсяницы приводила к росту содержания малонового диальдегида при максимальной дозе воздействия (0,03 мкг/мл) в 9,17 раза через 1 сут и в 9,53 раза – через 3 сут, что отражает максимальный рост количества малонового диальдегида в условиях всего эксперимента (табл. 6).

Минимальная доза воздействия (0,0001 мкг/мл) вызывала рост содержания малонового диальдегида в 4,18 раза через 1 сут, а через 3 сут после обработки – в 3,95 раза, т. е. была почти в 2 раза ниже по сравнению с максимальной дозой воздействия.

Следует отметить, что в условиях эксперимента бензол и бутилацетат использовались в одинаковых дозах вследствие одинаковых ПДК в атмосферном воздухе. Однако воздействие бутилацетата приводило к более интенсивному развитию процессов ПОЛ в листьях овсяницы, судя по более высокому накоплению малонового диальдегида. Кроме того, в отличие от других использованных соединений, обработка максимальными дозами пентана и гексана вызывала наиболее выраженные различия между содержанием малонового диальдегида через 1 и 3 сут эксперимента и увеличивала активность ПОЛ к 3-м суткам. Минимальные дозы внесения приводили к наиболее заметным различиям между 1-ми и 3-ми суткам после воздействия *o*-ксилолом и пентаном, при этом влияние *o*-ксилола явилось причиной более высокого увеличения содержания малонового диальдегида через 1 сут, а пентана – через 3 сут после обработки.

Результаты кластерного анализа содержания малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. за период эксперимента представлены на рис. 1 (двухходовый кластерный анализ) и рис. 2 (кластерный анализ методом иерархической классификации).

Данные рис. 1 свидетельствуют о том, что через 1 сут накопление повышенного количества малонового диальдегида в условиях эксперимента является результатом влияния бутилацетата

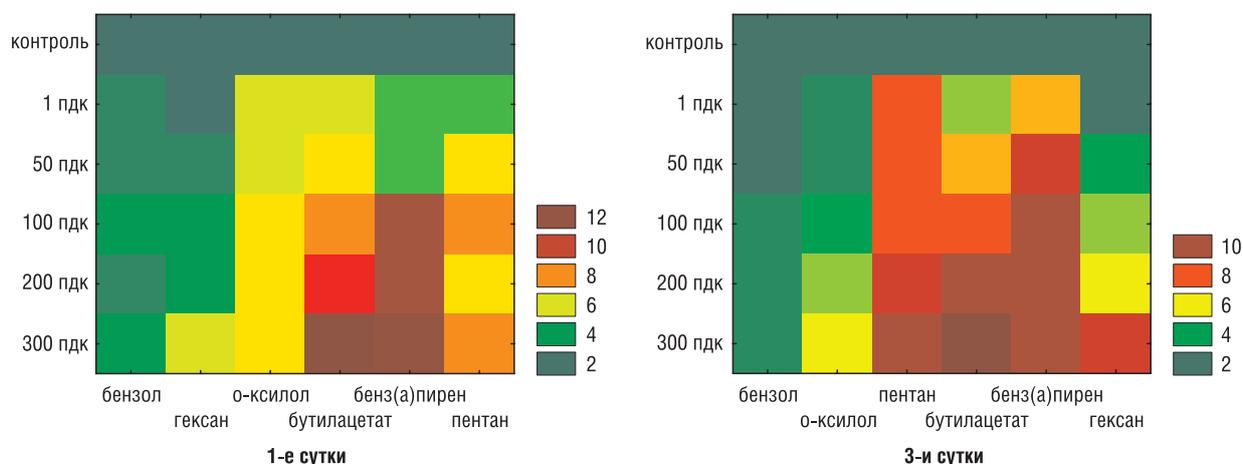


Рис. 1. Результаты кластерного анализа содержания малонового диальдегида (нмоль/мг сырой массы) в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb.

Fig. 1. Results of the cluster analysis of the content of malondialdehyde (nmol / mg wet weight) in cane fescue plants *Festuca arundinacea* Schreb.

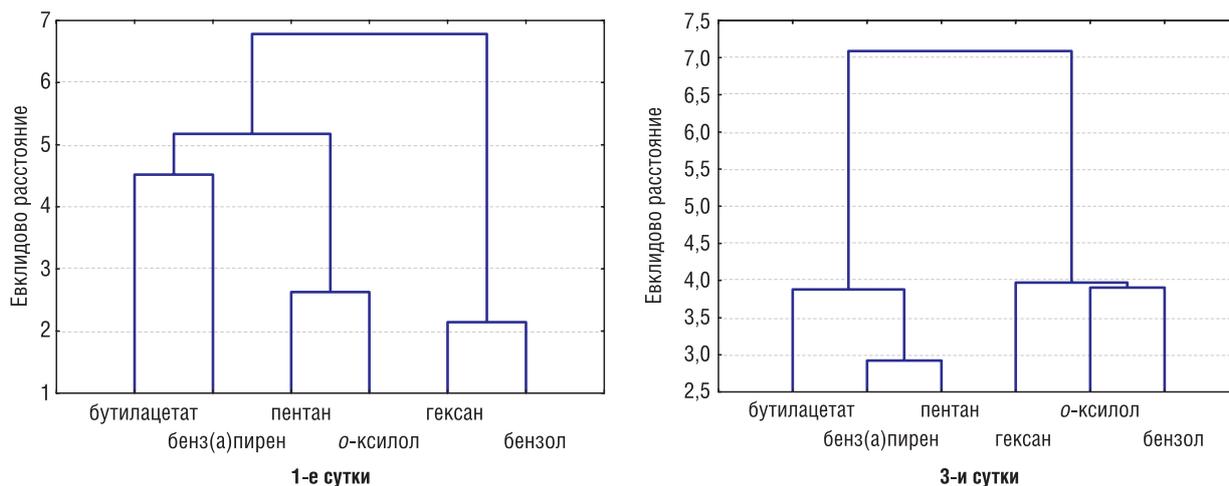


Рис. 2. Дендрограммы кластерного анализа содержания малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb.

Fig. 2. Dendrograms of cluster analysis of malondialdehyde content in cane fescue plants *Festuca arundinacea* Schreb.

и бенз(а)пирена, тогда как интенсивность процессов ПОЛ через 3 сут эксперимента повышается в случае обработки пентаном, бутилацетатом, бенз(а)пиреном и гексаном. Кроме того, через 1 сут эксперимента все использованные соединения с учетом интенсивности их влияния на растения овсяницы можно распределить на три кластера в порядке снижения степени воздействия: 1) бутилацетат и бенз(а)пирен; 2) пентан и *о*-ксилол; 3) гексан и бензол. Через 3 сут после обработки наблюдались изменения в группировании вводимых соединений и образование двух кластеров: 1) бутилацетат, бенз(а)пирен и пентан; 2) гексан, *о*-ксилол и бензол. Представители первого кластера вызвали более интенсивное окисление липидов биологических мембран и накопление малонового диальдегида, представители второго – менее интенсивное.

Известно, что выбросы промышленных предприятий характеризуются наличием не одного техногенного элемента или соединения, а целого их спектра, иногда довольно значительно. Поэтому техногенные элементы и их соединения могут оказывать воздействие на растения в виде различных смесей.

Для оценки влияния смесей летучих органических соединений на интенсивность развития процессов ПОЛ проведен эксперимент по совместному воздействию на листовые пластинки овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. смесей бутилацетата с *о*-ксилолом; бензола с *о*-ксилолом; пентана с гексаном; пентана, гексана с бенз(а)пиреном, наличие которых характерно для выбросов рассматриваемых промышленных предприятий (ОАО «Гомельский завод литья и нормалей» и ТЭЦ-2).

Результаты проведенного эксперимента показали, что все используемые смеси способны вызывать более интенсивные процессы ПОЛ через 1 сут после обработки (табл. 7).

При совместной обработке листовых пластинок растений овсяницы пентаном и гексаном содержание малонового диальдегида увеличивалось только через 1 сут после обработки (в отличие от раздельного воздействия этих соединений); пентан с гексаном, напротив, способны были снижать действие бенз(а)пирена по сравнению с одиночным влиянием этого соединения, а бенз(а)пирен – усиливать воздействие пентана и гексана на активность ПОЛ только через 1 сут после обработки. Бутилацетат и *о*-ксилол усиливали действие друг друга во всех использованных дозах через 1 сут; кроме того, бутилацетат увеличивал эффект воздействия *о*-ксилола через 3 сут после введения, тогда как *о*-ксилол через 3 сут эксперимента снижал действие бутилацетата на накопление малонового диальдегида. Ксилол усиливал воздействие бензола в течение всего времени эксперимента; бензол проявлял себя в качестве синергиста по отношению к *о*-ксилолу через 1 сут после обработки максимальной дозой и через 3 сут – во всех экспериментальных дозах.

Достоверность различий между содержанием малонового диальдегида в листовых пластинках экспериментальных и контрольных растений овсяницы тростниковой оценивали с помощью дисперсионного анализа.

Сравнение комплексов дисперсий содержания малонового диальдегида через 1 и 3 сут в эксперименте позволило установить достоверность их различий после обработки без учета контрольных проб ($F_{\text{факт}} = 5,57\text{--}104,76$; $F_{\text{крит}}(4, 35) = 2,64$ при $p \leq 0,05$ при обработке соединениями по одному; $F_{\text{факт}} = 29,56\text{--}92,05$; $F_{\text{крит}}(1, 14) = 4,60$ при $p \leq 0,05$ при обработке соединениями в смеси). Исключение составило содержание малонового диальдегида после обработки смесью бензола и *o*-ксилола. Это свидетельствует о том, что изменение содержания малонового диальдегида, вызванное влиянием такой смеси, незначительно в течение 1–3 сут эксперимента и носит недостоверный характер. В остальных случаях воздействие использованных соединений по одному и в смесях достоверно проявлялось и различалось на протяжении 1 и 3 сут после обработки.

Результаты дисперсионного анализа комплексов, состоящих из малонового диальдегида, при каждой вводимой дозе углеводорода через 1 и 3 сут после обработки и контроля, свидетельствуют о том, что значение *F*-критерия превышает величину *F* критического для всех исследованных образцов во всех случаях после обработки одиночными соединениями и смесями ($F_{\text{факт}} = 6,31\text{--}989,25$; $F_{\text{крит}}(1, 6) = 5,98$ при $p \leq 0,05$ при обработке соединениями по одному; $F_{\text{факт}} = 22,59\text{--}2093,56$; $F_{\text{крит}}(1, 6) = 5,98$

Таблица 7. Содержание малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента после обработки смесями исследуемых соединений

Table 7. Content of malondialdehyde in plants of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. under experimental conditions after treatment with mixtures of the studied compounds

Вариант опыта	Содержание малонового диальдегида, нмоль/мг сырой массы	
	через 1 сут	через 3 сут
<i>Смесь бутилацетат + о-ксилол</i>		
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,01 мкг/мл + 0,02 мкг/мл	9,24±0,04*	6,89±0,01*
0,02 мкг/мл + 0,04 мкг/мл	10,16±0,01*	7,26±0,04*
<i>Смесь бензол + о-ксилол</i>		
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,01 мкг/мл + 0,02 мкг/мл	5,84±0,01*	3,13±0,01*
0,02 мкг/мл + 0,04 мкг/мл	7,51±0,06*	5,96±0,18*
<i>Смесь пентан + гексан</i>		
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,01 мг/мл + 0,006 мг/мл	7,30±0,05*	4,25±0,05*
0,02 мг/мл + 0,012 мг/мл	7,73±0,04*	4,73±0,05*
<i>Смесь пентан + гексан + бенз(а)пирен</i>		
Контроль	1,36±0,01	1,21±0,02
0,01 мг/мл + 0,006 мг/мл + 0,0005 нг/мл	7,96±0,01*	3,41±0,01*
0,02 мг/мл + 0,012 мг/мл + 0,001 нг/мл	9,54±0,01*	5,97±0,05*

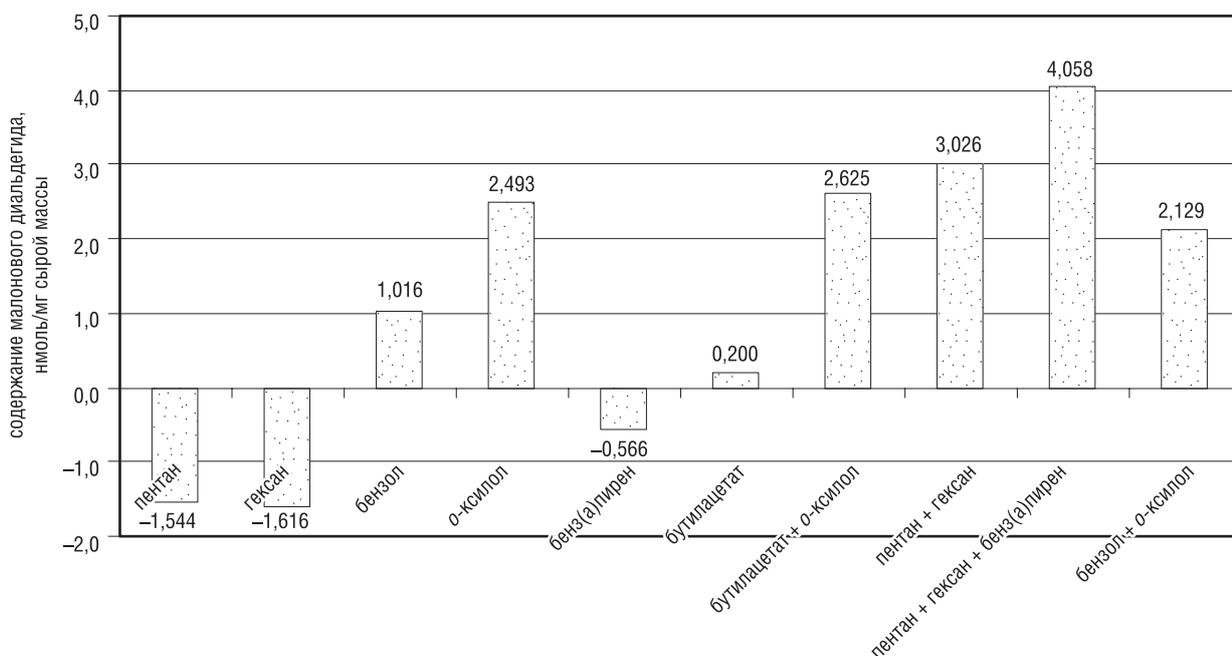


Рис. 3. Изменение содержания малонового диальдегида в растениях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. в условиях эксперимента

Fig. 3. Change in malondialdehyde content in plants reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. in an experiment

при $p \leq 0,05$ при обработке соединениями в смеси). Исключение составили следующие недостоверные различия между контролем и экспериментальной пробой: через 1 сут – при обработке раствором гексана в концентрации 0,00 006 мг/мл; через 3 сут – при обработке раствором бензола в дозе 0,0001 мкг/мл и раствором гексана в концентрации 0,00 006 мг/мл. В случае использования смесей в эксперименте недостоверные различия не выявлены.

С учетом общей количественной оценки влияния использованных предельных ароматических углеводородов и сложного эфира на содержание малонового диальдегида в листьях овсяницы установлено, что через 3 сут после обработки пентаном, гексаном и бенз(а)пиреном содержание изучаемого показателя изменялось более интенсивно, чем в 1-е сутки, причем пентан и гексан вызывали более выраженные различия по сравнению с бенз(а)пиреном (рис. 3).

Влияние бензола, *o*-ксилола, бутилацетата и всех смесей вызывало более значительное усиление ПОЛ через 1 сут после обработки, чем после 3 сут эксперимента. При этом через 1 сут *o*-ксилол и смесь пентана, гексана и бенз(а)пирена влияли более интенсивно на процессы ПОЛ по сравнению с другими соединениями.

Закключение. Результаты эксперимента по обработке листовых пластинок растений овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. летучими углеводородами и их смесями свидетельствуют о том, что обработка пентаном, гексаном, бензолом, *o*-ксилолом, бенз(а)пиреном, бутилацетатом и их смесями является причиной увеличения содержания малонового диальдегида в экспериментальных образцах по сравнению с контрольными пробами практически во всех используемых дозах, что свидетельствует об активации процессов ПОЛ. Исключением явилось воздействие минимальной дозы гексана (0,00 006 мг/мл) в процессе всего эксперимента и бензола (0,0001 мкг/мл) через 3 сут после обработки.

Максимальное увеличение количества малонового диальдегида по сравнению с контролем вызывало действие бутилацетата на протяжении всего эксперимента и смеси бутилацетата с *o*-ксилолом через 1 сут после обработки растений.

С учетом динамики содержания изучаемого показателя установлено, что влияние бензола, *o*-ксилола, бутилацетата и всех смесей вызывало более значительное усиление ПОЛ через 1 сут после обработки, чем после 3 сут эксперимента. При этом *o*-ксилол и смесь пентана, гексана и бенз(а)пирена оказывали наиболее сильное действие на активность ПОЛ по сравнению с другими соединениями. Через 3 сут количество малонового диальдегида изменялось более интенсивно по сравнению с 1-ми сутками после обработки листьев овсяницы пентаном, гексаном и бенз(а)пиреном, причем пентан и гексан вызывали более выраженные эффекты по сравнению с бенз(а)пиреном.

Список использованных источников

1. Охрана окружающей среды в Республике Беларусь : стат. сб. – Минск : Нац. стат. ком. Респ. Беларусь, 2018. – 227 с.
2. Михайлова, И. Д. Перекисное окисление липидов в растениях огурца и редиса при действии тяжелых металлов / И. Д. Михайлова, А. С. Лукаткин // Изв. Саратов. ун-та. Новая сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2016. – Т. 16, вып. 2. – С. 206–210.
3. Ерофеева, Е. А. Многолетний сравнительный анализ устойчивости *Betula pendula* (Betulaceae, Fagales) и *Tilia cordata* (Malvaceae, Malvales) к автотранспортному загрязнению / Е. А. Ерофеева, К. В. Шаповалова // Поволж. экол. журн. – 2015. – № 4. – С. 390–399.
4. Неверова, О. А. Оценка интенсивности окислительных процессов у древесных растений в зоне действия промышленных выбросов / О. А. Неверова, О. М. Легощина, А. А. Быков // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 776–779.
5. Перекисное окисление липидов дикорастущих галофитов в условиях Приэльтона / В. Н. Нестеров [и др.] // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2014. – Т. 16, № 5. – С. 299–303.
6. Курганова, Л. Н. Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс / Л. Н. Курганова // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. Сер. Биология. – 2001. – С. 74–76.
7. Попов, В. Н. Перекисное окисление липидов при низкотемпературной адаптации листьев и корней теплолюбивых растений табака / В. Н. Попов, О. В. Антипина, Т. И. Трунова // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 1. – С. 153–156.
8. Об утверждении и введении в действие нормативов предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ в атмосферном воздухе и ориентировочно безопасных уровней воздействия загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных пунктов и мест массового отдыха населения : постановление М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 08.11.2016 г., № 113 [Электронный ресурс] // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – 2007. – 8/31467. – Режим доступа : http://pravo.by/upload/docs/op/W21631467p_1485896400.pdf. – Дата доступа : 22.08.2019.

References

1. *Environmental protection in the Republic of Belarus: statistical collection*. Minsk, National Statistical Committee of the Republic of Belarus, 2018. 227 p. (in Russian).
2. Mikhailova I. D., Lukatkin A. S. Lipid peroxidation in cucumber and radish seedlings affected by heavy metals. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya Khimiya. Biologiya. Ekologiya* [Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology], 2016, vol. 16, no. 2, pp. 206–210 (in Russian).
3. Erofeeva E. A., Shapovalova K. V. Long-term comparative analysis of the stability of *Betula pendula* (Betulaceae, Fagales) and *Tilia cordata* (Malvaceae, Malvales) to motor traffic pollution. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal* [Povolzhskii journal of ecology], 2015, no. 4, pp. 390–399 (in Russian).
4. Neverova O. A., Legoshchina O. M., Bykov A. A. Estimation of oxidative processes intensity at wood plants in the operative range of industrial emissions. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Izvestia of Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences], 2010, vol. 12, no. 1, pp. 776–779 (in Russian).
5. Nesterov V. N., Bogdanova E. S., Tabalenkova G. N., Rozentsvet O. A. Lipid peroxidation of wild-growing halophytes in the conditions of the prieltonye. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Izvestia of Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences], 2014, vol. 16, no. 5, pp. 299–303 (in Russian).
6. Kurganova L. N. Lipid peroxidation is one of the possible components of a quick response to stress. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni N. I. Lobachevskogo. Seriya Biologiya* [Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod], 2001, pp. 74–76 (in Russian).
7. Popov V. N., Antipina O. V., Trunova T. I. Lipid peroxidation during low-temperature adaptation of cold-sensitive tobacco leaves and roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, vol. 57, no. 1, pp. 144–147. <https://doi.org/10.1134/S102144371>
8. Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus “On the approval and implementation of standards for maximum allowable concentrations of pollutants in the atmospheric air and approximately safe levels of exposure to pollutants in the atmospheric air of settlements and places of mass recreation of the population” of 08.11.2016 No. 113. *National Center of Legal Information of the Republic of Belarus*. Available at: http://pravo.by/upload/docs/op/W21631467p_1485896400.pdf (accessed 22.08.2019) (in Russian).

Информация об авторах

Тюлькова Елена Григорьевна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации (пр-т Октября, 50, 246029, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: tut-3@mail.ru

Кабашникова Людмила Федоровна – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kabashnikova@mail.ru

Information about the authors

Elena G. Tulkova – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Belarusian Trade and Economic University of Consumer Cooperation (50, Oktyabr Ave., 246029, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: tut-3@mail.ru

Lyudmila F. Kabashnikova – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kabashnikova@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.215; 578.223; 578.226

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-420-430>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева, Е. П. Счесленок, П. А. Семижон, С. В. Ткачев, А. С. Владыко

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ РЕТРОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ДОСТОВЕРНОСТИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Аннотация. Широкое внедрение методов обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в биологию и медицину для исследования вирусных и клеточных молекул РНК предполагает получение стабильных, хорошо охарактеризованных контролей и стандартов. Разработан новый тип внутреннего контрольного образца (ВКО) на основе рекомбинантных ретровирусных частиц для оценки эффективности выделения генетического материала и количественных параметров реакций ОТ-ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Препарат включает следующие компоненты: генетически модифицированные вирионы, в геном которых клонирован ген-мишень, набор праймеров и гибридизационную пробу для его детекции.

В составе рекомбинантных ретровирусов как своеобразных имитаторов природного вируса РНК защищена белковой оболочкой и устойчива к действию рибонуклеаз. Наличие контроля в каждой отдельной пробе биологического материала позволяет максимально точно учесть все факторы, влияющие на молекулу РНК в процессе исследования. Благодаря использованию такого препарата в качестве ВКО появляется возможность контролировать процессы выделения и сохранности РНК, отдельные стадии реакции обратной транскрипции и ПЦР, оценить влияние ингибиторов, содержащихся в биологических жидкостях, на ферменты реакций ОТ-ПЦР, сравнивать образцы между собой, что повышает достоверность исследования и позволяет исключить появление ложноотрицательных результатов.

Ключевые слова: диагностика, ОТ-ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени, внутренний контрольный образец, РНК-вирусы, РНК-стандарт

Для цитирования: Использование внутреннего контрольного образца на основе рекомбинантных ретровирусных частиц для повышения достоверности ПЦР-исследования / Е. Г. Фомина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 420–430. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-420-430>

E. G. Fomina, E. E. Grigorieva, E. P. Scheslenok, P. A. Semizhon, S. V. Tkachev, A. S. Vladyko

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

APPLICATION OF INTERNAL CONTROL BASED ON RECOMBINANT RETROVIRAL PARTICLES FOR INCREASING THE PCR ASSAY RELIABILITY

Abstract. Molecular diagnostic tests based on PCR preceded by reverse transcription (RT-PCR) are now used commonly for the detection of viral pathogens with RNA genomes. The application of internal controls to validate the entire process of these assays is necessary to prevent false-negative results caused by inhibition or inefficient extraction. In the present study a strategy to produce a new type of internal control for RT-PCR based on recombinant retroviral particles is described. Cell clones stably producing retroviral particles were established by transfecting GP+env-AM12 packaging cells with constructed MoMuLV-derived retroviral vector pLneo/gfp and subsequent cultivation on selective medium with G418. The *egfp* gene was used as a target for primers and hybridization probe design for real-time RT-PCR assay and as a marker for flow cytometry analysis of eGFP expression by transfected cells. The developed internal control is stable and ribonuclease resistant, economical to produce, noninfectious and safe for routine use. It closely mimics the natural virus and could be successfully used to monitor all the stages of RT-PCR, including nucleic acid extraction, RNA reverse transcription and amplification.

Keywords: diagnostics, real time PCR, RNA viruses, internal control, retroviral particles

For citation: Fomina E. G., Grigorieva E. E., Scheslenok E. P., Semizhon P. A., Tkachev S. V., Vladyko A. S. Application of internal control based on recombinant retroviral particles for increasing the PCR assay reliability. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 420–430 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-420-430>

Введение. Широкое использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения вирусных и клеточных последовательностей РНК создало потребность в разработке стабильных, хорошо охарактеризованных контролей и стандартов [1, 2].

При использовании количественных или полуколичественных вариантов реакции важна стандартизация образцов в ходе исследования по количеству и качеству выделенного генетического материала, наличию ингибиторов амплификации и эффективности реакции в каждой индивидуальной пробе, а также корректный количественный учет гена-мишени в отношении гена-сравнения в отдельной анализируемой пробе и между образцами [3]. Для этой цели используются внутренние контрольные образцы (РНК-контроли) и приготовленные на их основе стандарты. Как правило, они представляют собой препарат РНК, не схожий с РНК искомого микроорганизма, который вносится в пробу на этапе выделения генетического материала, что наряду с ПЦР позволяет контролировать процессы выделения генетического материала и реакцию обратной транскрипции (ОТ). Сложности при разработке таких препаратов связаны с тем, что не защищенные белками (неармированные) молекулы РНК нестабильны и легко подвергаются расщеплению рибонуклеазами [4].

В зависимости от решаемых задач на практике наиболее часто используются следующие типы РНК-контролей: матричные РНК генов домашнего хозяйства; транскрибированные *in vitro* молекулы РНК и генно-инженерные стандарты (рекомбинантные бактериофаги и вирусы животных) [5, 6]. Эволюция технологии получения таких стандартов для диагностики РНК-содержащих вирусов связана с тем, что контрольный образец должен полностью имитировать природный вирусный агент, но в то же время не являться инфекционным. Корректность результатов при использовании любого из предложенных контролей может быть достигнута только в том случае, если последовательность, включающая ген сравнения, прошла все этапы пробоподготовки исследуемого гена-мишени: от выделения генетического материала до учета результатов [7, 8].

Наиболее популярная стратегия нормирования образцов – использование внутренних контролей, в качестве которых выступает мРНК одного из трех генов домашнего хозяйства клетки, кодирующих β -актин (*Actb*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*Gapdh*) и рибосомный белок L30 (*Rpl30*). Однако в последнее время все чаще приводятся данные, свидетельствующие о том, что уровень экспрессии этих генов не всегда стабилен и варьируется в зависимости от экспериментальных (в том числе температурных) условий [9, 10]. В любом случае при использовании указанных генов в качестве внутренних контрольных образцов (ВКО) требуется предварительный анализ их пригодности для выбранных условий эксперимента. Такой тип внутренних контролей может быть весьма полезен, когда речь идет о выявлении внутриклеточных паразитов, где важна оценка наличия в пробе клеточного биологического материала для исследования.

Как альтернатива использованию внутреннего образца существует подход, основанный на применении транскрибированных *in vitro* молекул РНК, которые вносят в исследуемые пробы на этапе выделения генетического материала. Однако практика показывает, что эти контроли ненадежны, поскольку ряд факторов (щелочная рН, высокая температура, бивалентные катионы магния и марганца и даже минорные концентрации рибонуклеаз) приводит к быстрому разрушению молекул [11].

Интересным является способ получения рибонуклеиновых фаговых частиц в качестве контрольного образца как простого и надежного препарата количественной оценки в экспериментах ОТ-ПЦР. Несмотря на то что данный способ был предложен в 1998 г. [12], до настоящего времени он применяется в различных модификациях [13–16]. Используя технологию армированной РНК, с 1 л культуры *E. coli* можно получать до 10^{15} фаговых частиц. Недостаток этого способа, по мнению самих авторов, состоит в том, что эффективность упаковки РНК в фаговую частицу значительно снижается, если размер клонированного фрагмента составляет более 500 пар нуклеотидов (п. н.). На сегодняшний день этот факт трудно отнести к недостаткам в рутинных исследованиях, поскольку ПЦР-мишень редко превышает 500 п. н., особенно ввиду интенсивного использования амплификации с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени, где рекомендуемый размер гена-мишени не должен составлять более 200 п. н. Тем не менее, при решении специальных задач ограничение размера клонированного фрагмента может стать серьезным лимитирующим фактором. Одно из несомненных достоинств контроля такого типа – гиперустойчивость к влиянию факторов окружающей среды (способность сохранять свойства при инкубировании в плазме крови при 37 °С в течение 30 дней). Эта особенность одновременно является, на наш взгляд, и недостатком, когда речь идет об использовании данного контроля

в клинической диагностике, связанной с выявлением геномов РНК-содержащих патогенов. Как правило, большинство природных РНК-содержащих вирусов животных и человека весьма чувствительны к температурным и биохимическим условиям окружающей среды. Подобный контроль в силу своей устойчивости может дать ложное представление о сохранности генетического материала в образце и качестве проведения процедуры выделения. Отсутствие накопления флуоресцентного сигнала для искомой мишени патогена в исследуемой пробе в этом случае не может достоверно свидетельствовать о реальном отсутствии вируса в образце, даже при наличии четко детектируемой специфической флуоресценции для внутреннего контроля, свидетельствующей о корректности пробоподготовки.

Наиболее приближенным с физиологической и биохимической точки зрения к природным РНК-содержащим вирусам является разработанный и предлагаемый нами универсальный контрольный образец на основе ретровирусных частиц. Этот способ получения контрольных образцов был подсказан самой природой. Жизненный цикл ретровирусов включает стадию ОТ и последующую интеграцию генома в геном клетки-хозяина. В форме ДНК-провируса их геном может стабильно поддерживаться в ряду поколений, продуцируя ретровирусные частицы.

Суть данного подхода заключается в получении рекомбинантных ретровирусных частиц на основе генома вируса лейкемии мышей Молони с использованием «пакующей» клеточной линии. Клонированная в ретровирусный вектор последовательность гена-мишени экспрессируется в форме РНК-копий вместе с клеточными генами и упаковывается в ретровирусные частицы, выделяемые клетками в среду культивирования. Подготовленная специальным образом культуральная жидкость «пакующей» клеточной линии может быть использована в качестве контрольного образца.

Цель настоящего исследования – разработать внутренний контрольный образец на основе рекомбинантных ретровирусных частиц для оценки эффективности выделения генетического материала и количественных параметров реакций обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Материалы и методы исследования. Все генно-инженерные манипуляции проводили с использованием коллекционного штамма *Escherichia coli* DH5 α (*supE44 lacU169 (f80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Трансформацию бактериальных клеток, выделение плазмидной ДНК, электрофоретический анализ фрагментов осуществляли согласно рекомендациям, приведенным в руководстве [17]; рестрикцию, лигирование плазмидной ДНК и фрагментов – в соответствии с условиями, рекомендуемыми фирмой-изготовителем Thermo Scientific (США). Для выделения вирионной РНК использовали набор реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Российская Федерация) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили со случайными праймерами с использованием набора «Реверта-Л» (производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Российская Федерация) согласно прилагаемой инструкции. Для постановки ПЦР использовали Taq-полимеразу, 10-кратный реакционный буфер, раствор MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидов (Thermo Scientific, США), а также праймеры и гибридационные зонды, синтезированные ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). ПЦР осуществляли на термоциклере Corbett Research (Corbett Life Sciences, Австралия), ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени – на амплификаторе iQ5 (Bio-Rad, США). Для подбора праймеров и гибридационной пробы использовали программу Vector NTI. Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции по применению. Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Для поиска последовательностей, гомологичных выявленным фрагментам ДНК, использовали BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

«Пакующая» клеточная линия GP+env-AM12, продуцирующая ретровирусные вирионы с амфотропным спектром хозяев, а также линия клеток NIH 3T3, созданная на основе фибробластов мыши и используемая для определения биологического титра вируса, были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П) (г. Санкт-Петербург, Российская Федерация). Клеточные линии культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США), 100 ед/мл пенициллина (Sigma, США), 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США) при температуре 37 °С и 5%-ном содержании CO₂.

Ретровирусный вектор вводили в «пакующую» клеточную линию GP+env-AM12 посредством полибреновой методики трансфекции. Для этого $4 \cdot 10^5$ клеток «пакующей» линии помещали во флакон с площадью ростовой поверхности 25 см^2 за день до постановки эксперимента. На 2-й день среду культивирования заменяли 1 мл свежей среды, содержащей 10 мкг плазмидной ДНК, и инкубировали в течение 6 ч в присутствии 10 мкг/мл полибрена (Sigma, США). Затем проводили химический «шок» в присутствии 20 % DMSO (Sigma, США) в течение 5 мин, далее клетки отмывали и помещали в свежую среду. На следующий день культуральную среду заменяли на селективную, содержащую 400 мкг/мл G418 (Sigma, США) (химический аналог неомицина). Клоны, устойчивые к антибиотику, изолировали на 12–14-й день после трансфекции и размножали в монослое для последующего анализа.

Титр вируса определяли согласно модифицированному протоколу, описанному в статье D. Markowitz [18]. Культуральную жидкость, собранную от клонов клеток GP+env-AM12, трансфицированных ретровирусным вектором, центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g для удаления клеток и дебриса. Инфицирование проводили немедленно после сбора вируса. Реципиентные клетки NIH 3T3 высевали с плотностью $3 \cdot 10^5$ на 25 см^2 во флаконы за 24 ч до инфицирования. На второй день среду заменяли на 1 мл свежей среды, содержащей 8 мкг/мл полибрена и аликвоты тестируемого вируса. Инкубирование проводили в течение 2 ч, после чего среду заменяли на свежую. Количество клеток, экспрессирующих eGFP, анализировали спустя 72 ч после инфицирования с помощью проточного цитофлуориметра (BD Biosciences FACSCanto I, США). Титр вирусных частиц рассчитывали по следующей формуле: титр вируса = $AB/100C$, где A – количество клеток в культуральном сосуде на момент инфицирования; B – количество флуоресцирующих клеток; C – корректирующий коэффициент, учитывающий разведение супернатанта, нанесенное на клетки.

Результаты и их обсуждение. Исходным вектором для клонирования выбран «минимальный» ретровирусный вектор серии pL [19]. Данный вектор получен на базе генома вируса лейкемии мышей Молони (MoMuLV). Его ретровирусная часть содержит только *цис*-действующие последовательности (регуляторные элементы), необходимые для репликации, и включает длинные концевые повторы (LTR – long terminal repeat); Ψ – область упаковки-димеризации вирусного генома; PBS (primer binding site) – сайт связывания т-РНК затравки; полипуриновый тракт – сайт инициации синтеза плюс-цепи ДНК (PPT, polypurine tract). По концам LTR расположены два небольших, частично инвертированных повтора (att-сайты), необходимых для интеграции провируса в геном инфицированной клетки. Дополнительно в вектор клонирован полилинкер, содержащий сайты узнавания ферментов рестрикции. Бактериальная часть вектора представлена плазмидой pBR 322.

В ретровирусный вектор были клонированы две функционально значимые нуклеотидные последовательности: одна из них кодирует зеленый флуоресцирующий белок (*egfp*), другая – аминокликозид 3'-фосфотрансферазу (*neo*) [19].

В настоящее время белок GFP и его мутантные рекомбинантные формы, отличающиеся от белка дикого типа стабильностью и интенсивностью свечения, широко используются в качестве светящейся метки в клеточной и молекулярной биологии для изучения экспрессии клеточных белков [20, 21]. Наличие данной последовательности в векторе позволяет решить две задачи: использовать ее в качестве мишени для подбора праймеров и гибридизационной пробы для контроля выделения РНК-матрицы и всех стадий ОТ-ПЦР в режиме реального времени, а также определить титр ретровирусных частиц, продуцируемых «пакующей» клеточной линией, с использованием проточного цитофлуориметра с целью последующей количественной оценки содержания геном-эквивалентов гена-мишени в пробе. Наличие последовательности, кодирующей ген *neo* (обеспечивает устойчивость к неомицину), необходимо для отбора клеточных клонов с интегрированным в геном клетки вектором на селективной среде, содержащей генетицин (G418) – химический аналог неомицина, токсичный для клеток эукариот.

Указанные последовательности были амплифицированы и последовательно клонированы в «минимальный» ретровирусный вектор. Наличие вставки было подтверждено рестрикцией рекомбинантных плазмид по сайтам клонирования (рис. 1), а специфичность клонированных фрагментов – секвенированием.

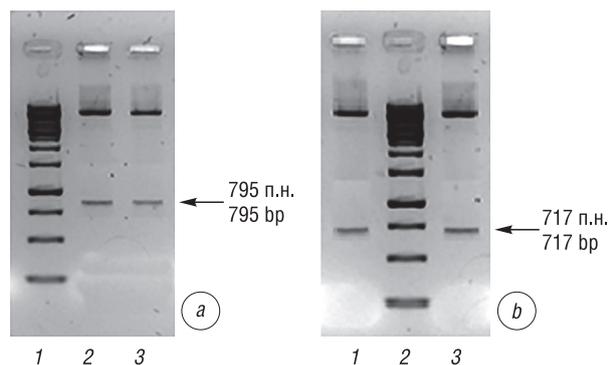


Рис. 1. Электрофоретический анализ рекомбинантной плазмидной ДНК: *a* – плазмидная ДНК pLneo после обработки рестрикционными нуклеазами HindIII и XbaI (1 – маркер молекулярных масс 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific; 2, 3 – рекомбинантная плазмидная ДНК); *b* – плазмидная ДНК pLneo/gfp после обработки рестрикционными нуклеазами XhoI и BamHI (1, 3 – рекомбинантная плазмидная ДНК; 2 – маркер молекулярных масс 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific)

Fig. 1. Analysis of recombinant plasmid DNA by restriction digestion and agarose gel electrophoresis: *a* – plasmid DNA pLneo after endonucleases HindIII and XbaI digestion (1 – 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific; 2, 3 – recombinant plasmid DNA); *b* – plasmid DNA pLneo/gfp after endonucleases XhoI and BamHI digestion (1, 3 – recombinant plasmid DNA; 2 – 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific)

Следует отметить, что в данном случае речь идет об инфекционном титре, но при расчете геном-эквивалентов (ГЭ) следует учитывать два обстоятельства: первое – ретровирусный геном содержит две идентичные молекулы РНК, второе – часть вирусных частиц может содержать репортерный ген в своем составе, но быть неинфекционной по ряду причин. Реальный физический титр, коррелирующий с количеством геном-эквивалентов, был определен в реакции ОТ-ПЦР с использованием метода конечных разведений. Для этого готовили 10-кратные разведения

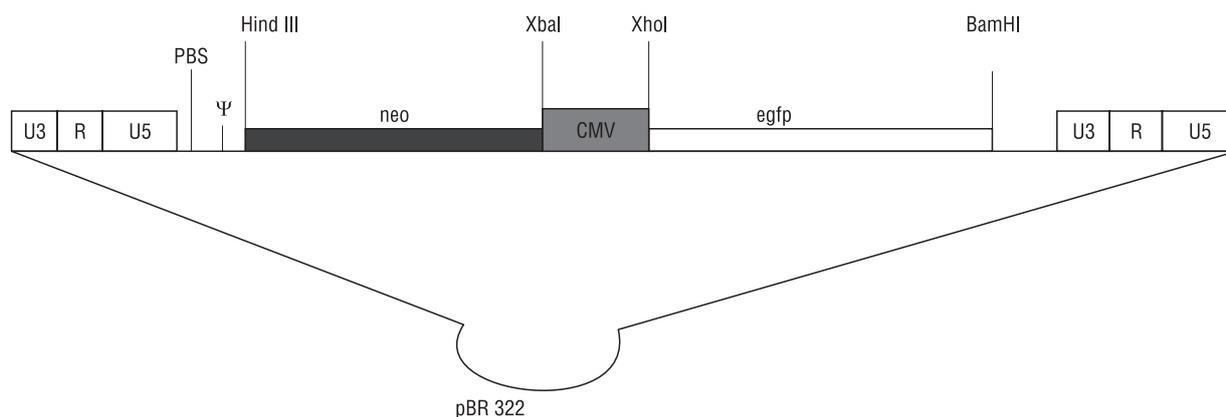


Рис. 2. Структура ретровирусного вектора pLneo/gfp: U3, R, U5 – районы вирусного LTR; Ψ – область упаковки-димеризации вирусного генома; PBS (primer binding site) – сайт связывания т-РНК затравки; *neo* – нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокликозид 3'-фосфотрансферазу; промотор ранних генов цитомегаловируса человека (CMV); *egfp* – ген, кодирующий белок eGFP (enhanced green fluorescent protein); BamHI, HindIII, XbaI, XhoI – сайты рестрикции

Fig. 2. pLneo/gfp retroviral vector structure: U3, R, U5 – regions of long terminal repeat; Ψ – extended retroviral packaging signal; PBS – primer binding site; *neo* – neomycin phosphotransferase gene; CMV – human cytomegalovirus (CMV) early promoter region; *egfp* – enhanced green fluorescent protein gene; BamHI, HindIII, XbaI, XhoI – restriction sites

Структура результирующего ретровирусного вектора pLneo/gfp представлена на рис. 2.

Рекомбинантная плазмидная ДНК pLneo/gfp посредством полибренновой методики трансфекции была введена в клетки «пакующей» линии GP+env-AM12. Данная линия клеток получена на базе мышиных фибробластов NIH 3T3, в которые введены вирус-кодирующие последовательности gag-pol и env, не содержащие Ψ-область, ответственную за упаковку вирусного генома в вирион. Такая клеточная линия продуцирует «пустые» вирионы. При введении ретровирусного вектора в клетки «пакующей» линии он интегрирует в геном клетки-хозяина, может эффективно транскрибироваться и упаковываться в вирионы.

После трансфекции и последующего культивирования клеток на селективной среде получены клоны мышиных фибробластов GP+env-AM12Lneo/gfp, продуцирующие в культуральную жидкость рекомбинантные вирионы с титром не менее $2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Титр ретровирусных частиц определяли с использованием индикаторной клеточной линии NIH 3T3 на проточном цитофлуориметре путем подсчета клеток, экспрессирующих eGFP, для трех независимых клеточных клонов (рис. 3).

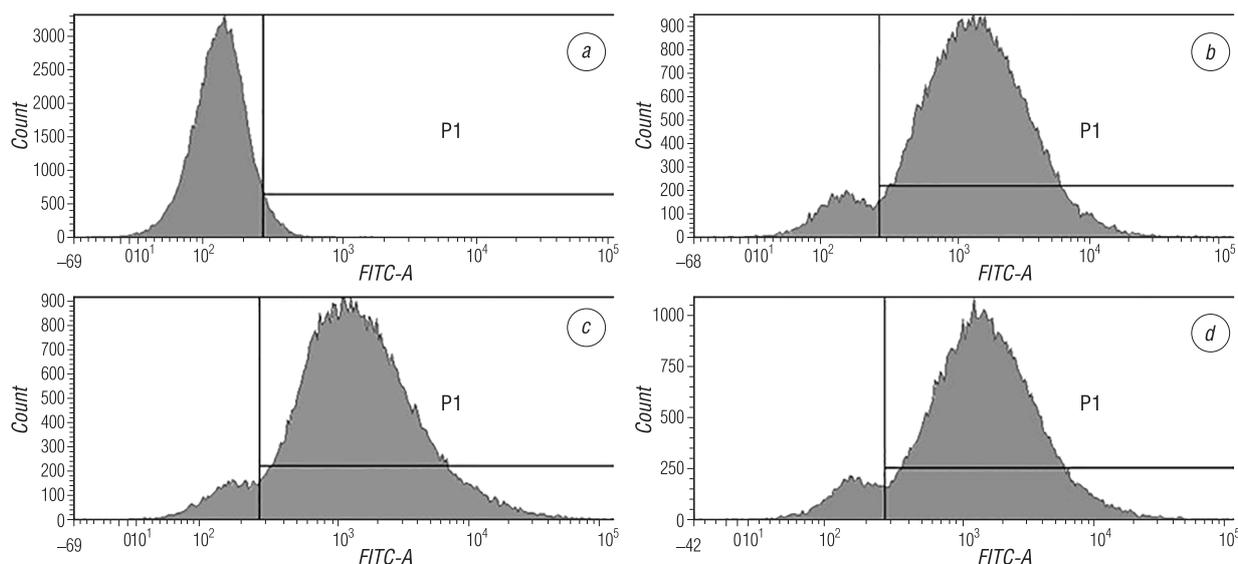


Рис. 3. Определение количества клеток, экспрессирующих eGFP, на проточном цитофлуориметре: *a* – контрольные клетки; *b, c, d* – клоны клеток NIH 3T3, инфицированные культуральной жидкостью, собранной с «пакующей» клеточной линии, трансфицированной ретровирусным вектором pLneo/gfp

Fig. 3. The number of cells expressing eGFP determined by flow cytometry: *a* – control cells; *b, c, d* – clones of NIH 3T3 cells infected by culture medium from packaging cells transfected with retroviral vector pLneo/gfp

супернатанта «пакующей» клеточной линии, определив исходную точку отсчета как титр инфекционных частиц, равный $2 \cdot 10^6$ ГЭ/мл. Из проб выделяли вирионную РНК и использовали ее в качестве матрицы для проведения ОТ-ПЦР последовательности *egfp* с подобранной парой праймеров, ограничивающих фрагмент размером 96 п. н., в режиме реального времени.

В проведенных экспериментах коэффициент пересчета физических/инфекционных частиц составил 1000, следовательно, в 1 мл культуральной жидкости содержится не менее $2 \cdot 10^9$ ГЭ гена-мишени. Как правило, в клинических исследованиях важны не абсолютные, а относительные цифры, полученные в серии сравнительных экспериментов (например, в парных сыворотках до и после терапии пациента). Тем не менее, точное количество геном-эквивалентов, внесенное в реакцию, дает представление об эффективности процессов исследования генетического материала и может быть использовано для приготовления стандартных образцов и учета четких количественных показателей реакции ОТ-ПЦР.

Одним из условий универсальности контрольного образца считается возможность его амплификации в широком диапазоне различных параметров ПЦР: температура, концентрация ионов магния, буферная система и др. Праймеры и гибридизационная проба, подобранные для определения репортерного гена, были исследованы на соответствие этому условию.

Для оценки влияния температурных параметров на амплификацию гена-мишени использовали градиент температур для отжига праймеров в диапазоне от 45 до 65 °С. Результаты исследования представлены на рис. 4.

Как видно из рис. 4, подобранная пара праймеров «работает» в широком температурном диапазоне. Накопление продукта амплификации фрагмента гена зеленого флуоресцирующего белка (*egfp*) регистрировалось при всех использованных значениях температуры отжига праймеров. Кривые флуоресцентного сигнала пересекали пороговую линию практически в одной точке, но отличались высотой подъема. При этом кинетическая кривая ПЦР сохраняла классическую сигмовидную форму, что свидетельствует о высокой эффективности реакции в температурном диапазоне 45–65 °С.

Сходные данные были получены при амплификации гена-мишени в диапазоне 1,5–3 мМ (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мМ) конечной концентрации $MgCl_2$. Анализ кривой накопления флуоресцентного сигнала показал, что образование продукта амплификации специфического фрагмента гена *egfp* наблюдалось при всех использованных в эксперименте значениях концентрации соли, при этом оптимальной являлась концентрация Mg^{2+} 3,0 мМ в конечном (50 мкл) объеме реакционной смеси (данные не представлены).

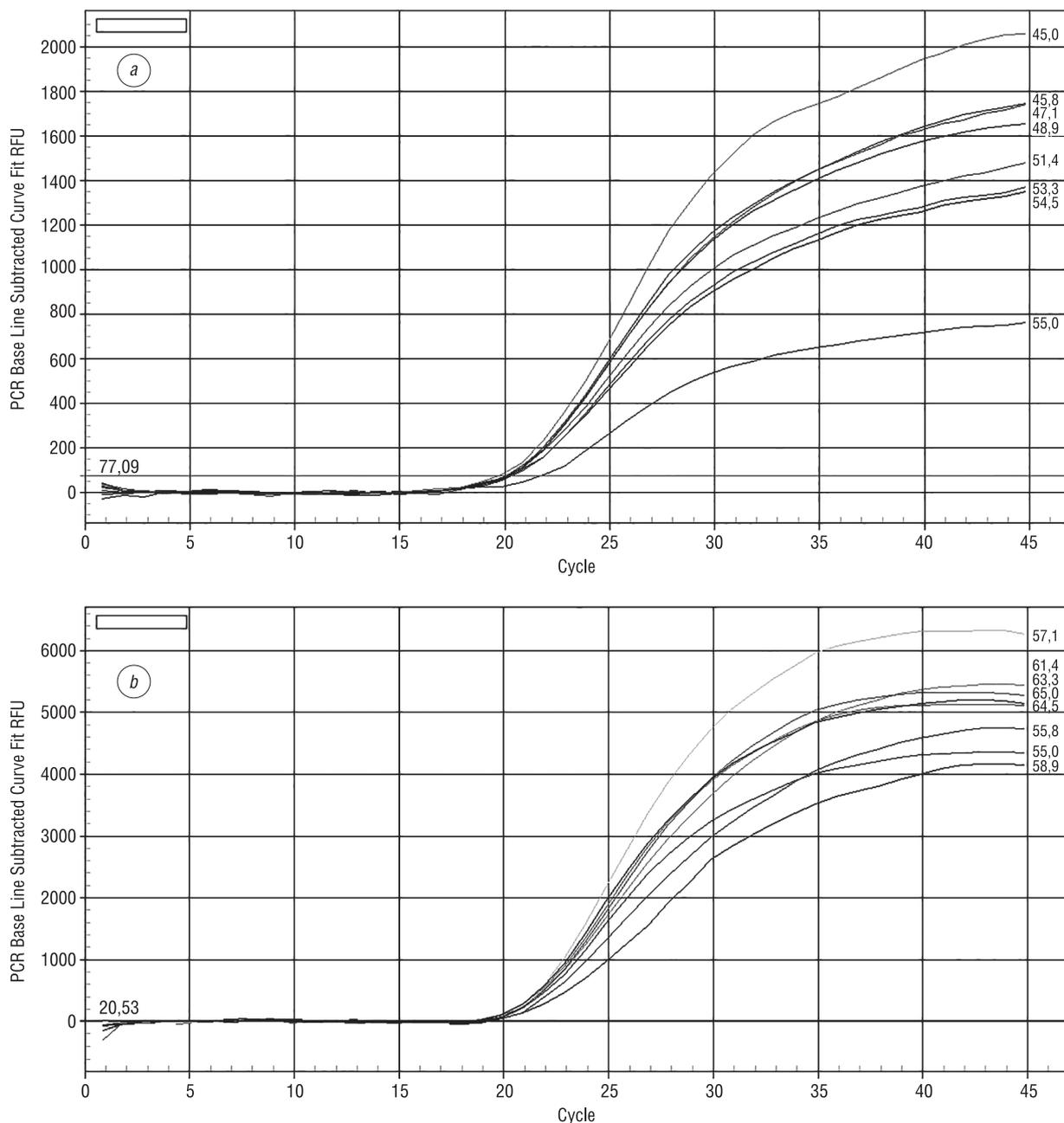


Рис. 4. Амплификация фрагмента гена *egfp* в ходе ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени при градиенте температуры отжига праймеров: *a* – 45–55 °C; *b* – 55–65 °C

Fig. 4. Amplification chart of the real time PCR assay for *egfp* gene using gradient protocol for the annealing temperature: *a* – 45–55 °C; *b* – 55–65 °C

При проведении экспериментов РНК-контроль вносили в реакцию в минимальном количестве – 10 мкл. Это является важным обстоятельством, так как, с одной стороны, позволяет увеличить объем пробы биологического материала, взятой для исследования, с другой – этого количества достаточно, чтобы детектировать сигнал амплификации мишени в каждом исследуемом образце.

Принято считать, что величина амплифицируемого гена-мишени инфекционного агента должна быть меньше мишени ВКО в 2–3 раза для обеспечения конкурентных преимуществ в ходе ПЦР. Если же речь идет о реакции с детекцией продуктов в режиме реального времени, где размер амплифицируемых фрагментов находится в пределах 100 п. н., то данное утверждение является спорным. Размер продукта амплификации ВКО составляет 96 п. н. Тем не менее, для

образцов, содержащих малые количества РНК искомого возбудителя инфекции, нами предлагается другой подход, который заключается в двукратном уменьшении концентрации праймеров и пробы от оптимальной для амплификации ВКО. В этом случае при наличии сигнала детекции ВКО он не будет конкурировать даже с минимальным количеством РНК инфекционного агента.

Заключение. Рекомбинантные ретровирусные частицы как имитаторы природного вируса позволяют максимально точно учесть факторы, влияющие на молекулу РНК в процессе исследования пробы биологического материала. Благодаря использованию в качестве внутреннего контроля препарата, разработанного на их основе, появляется возможность контролировать процессы выделения и сохранность РНК, отдельные стадии реакции ОТ-ПЦР, оценить влияние ингибиторов, содержащихся в биологических жидкостях, на ферменты реакций ОТ-ПЦР, что повышает достоверность исследования и дает возможность исключить появление ложноотрицательных результатов.

Преимущества РНК-стандарта заключаются в следующем:

РНК упакована в ретровирусную частицу, что делает ее недоступной для действия РНКаз и, следовательно, стабильной;

наличие вирусной оболочки позволяет контролировать этап выделения РНК из вируса, аналогично выделению из биологической жидкости (кровь, сыворотка, плазма, суспензии органов грызунов и др.);

внесение РНК-контроля в пробу до этапа выделения генетического материала позволяет оценить количество и качество выделенной РНК;

«пакующая» клеточная линия стабильно продуцирует ретровирусные частицы с определенным титром (количеством инфекционных единиц на 1 мл), что дает возможность стандартизовать процесс и количественно сравнивать пробы между собой;

клеточная линия может быть депонирована и использована на протяжении многих лет, не требуя дополнительных генно-инженерных манипуляций;

рекомбинантные ретровирусные частицы не инфекционны и безопасны в использовании;

подобранные для амплификации ВКО пара праймеров и гибридизационная проба могут работать в широком диапазоне температур, концентраций ионов магния и состава ПЦР-буферов, содержащих как KCl, так и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

предложенная технология получения рекомбинантных ретровирусных частиц позволяет использовать данный подход для получения положительных контрольных образцов РНК-содержащих вирусов.

Разработанный препарат может найти свою нишу в различных областях биологии и медицины при диагностике инфекционных, генетических, онкологических заболеваний, а также в быстро развивающейся в последнее время так называемой персонифицированной медицине. Например, он может быть использован при определении индивидуальных различий пациентов в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных, когда при изучении экспрессии различных генов необходимо количественно сравнить пробы между собой.

Наличие такого стандарта особенно полезно, когда речь идет о так называемых трудозатратных образцах, требующих длительного пробоподготовительного этапа: выделение РНК из органов, приготовление суспензии клещей и др. Даже при соблюдении холодовой цепи сохранность генетического материала в первой выделяемой пробе может отличаться от последней. Внутренний контрольный образец позволяет контролировать этот процесс.

На основе рекомбинантных ретровирусных частиц разработан набор реагентов «Универсальный РНК-стандарт». В состав набора входит внутренний контрольный образец (культуральная жидкость «пакующей» клеточной линии), праймер для постановки реакции ОТ и олигонуклеотиды (смесь праймеров и гибридизационной пробы) для ПЦР. Препарат может быть использован в качестве самостоятельного компонента при разработке и комплектации диагностических тест-систем, предназначенных для выявления геномных РНК широкого спектра РНК-содержащих вирусов методом ОТ-ПЦР; для оценки работы ферментов в ОТ-ПЦР; исследования эффективности наборов реагентов для выделения РНК при их производстве, а также в качестве стандарта при изучении экспрессии генов для нормализации образцов.

Список использованных источников

1. Нетесов, С. В. Сравнительная оценка современных методов диагностики вирусных инфекций / С. В. Нетесов, Н. А. Маркевич // Молекул. медицина. – 2008. – № 5. – С. 41–47.
2. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing / M. J. Espy [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – Vol. 19, N 1. – P. 165–256. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.165-256.2006>
3. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations / J. Huggett [et al.] // *Genes Immun.* – 2005. – Vol. 6, N 4. – P. 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
4. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Т. Е. Сизикова [и др.] // *Клин. лаб. диагностика.* – 2013. – № 3. – С. 41–44.
5. Niesters, H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time / H. G. M. Niesters // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2004. – Vol. 10, N 1. – P. 5–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00699.x>
6. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR / J. Hoorfar [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, N 5. – P. 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.1863-1868.2004>
7. Felder, E. Development of a versatile and stable internal control system for RT-qPCR assays / E. Felder, R. Wölfel // *J. Virol. Meth.* – 2014. – Vol. 208. – P. 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.028>
8. Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR / G. V. Villanova [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45, N 11. – P. 3555–3563. <https://doi.org/10.1128/jcm.02601-06>
9. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR / K. Dheda [et al.] // *BioTechniques.* – 2004. – Vol. 37, N 1. – P. 112–119. <https://doi.org/10.2144/04371rr03>
10. Schmittgen, T. D. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR / T. D. Schmittgen, B. A. Zakrajsek // *J. Biochem. Biophys. Meth.* – 2000. – Vol. 46, N 1–2. – P. 69–81. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(00)00129-9)
11. Hazari, S. Development and evaluation of a quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for hepatitis C virus RNA in serum using transcribed thio-RNA as internal control / S. Hazari, S. K. Acharya, S. K. Panda // *J. Virol. Meth.* – 2004. – Vol. 116, N 1. – P. 45–54.
12. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards / B. L. Pasloske [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, N 12. – P. 3590–3594.
13. Donia, D. Use of armored RNA as a standard to construct a calibration curve for real-time RT-PCR / D. Donia, M. Divizia, A. Pana // *J. Virol. Meth.* – 2005. – Vol. 126, N 1–2. – P. 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.004>
14. Stevenson, J. The use of armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR / J. Stevenson, W. Hymas, D. Hillyard // *J. Virol. Meth.* – 2008. – Vol. 150, N 1–2. – P. 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.007>
15. Векторная конструкция для накопления армированной РНК / В. А. Землянский [и др.] // *Вест. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2015. – № 2. – С. 19–22.
16. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics / M. R. Zambenedetti [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2017. – Vol. 112, N 5. – P. 339–347. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160380>
17. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual : in 3 vol. / J. Sambrook, D. W. Russell. – 3rd ed. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – Vol. 1. – 749 p.
18. Markowitz, D. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line / D. Markowitz, S. Goff, A. Bank // *Virology.* – 1988. – Vol. 167, N 2. – P. 400–406. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90101-8)
19. The U3 region of Moloney murine leukemia virus contains position-independent cis-acting sequences involved in the nuclear export of full-length viral transcripts / N. Volkova [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, N 29. – P. 20158–20169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545855>
20. Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование в клеточной биологии / О. В. Степаненко [и др.] // *Цитология.* – 2007. – Т. 49, № 5. – С. 395–420.
21. Differential rates of gene expression monitored by green fluorescent protein / C. Lu [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2002. – Vol. 79, N 4. – P. 429–437. <https://doi.org/10.1002/bit.10295>

References

1. Netesov S. V., Markevich N. A. Comparative evaluation of modern methods for viral infections diagnostics. *Molekulyarnaya medicina* [Molecular medicine], 2008, no. 5, pp. 41–47 (in Russian).
2. Espy M., Uhl J., Sloan L., Buckwalter S., Jones M., Vetter E. [et al.]. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, vol. 19, no. 1, pp. 165–256. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.165-256.2006>
3. Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 2005, vol. 6, no. 4, pp. 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
4. Sizikova T. E., Mel'nikova E. V., Manoshkin A. V., Petrov A. A., Mel'nikov D. G., Pantyukhov V. B., Lebedev V. N., Borisevich S. V. The application of external and internal control objects in case of using of polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics], 2013, no. 3, pp. 41–44 (in Russian).

5. Niesters H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, vol. 10, no. 1, pp. 5–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00699.x>
6. Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, no. 5, pp. 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.1863-1868.2004>
7. Felder E., Wölfel R. Development of a versatile and stable internal control system for RT-qPCR assays. *Journal of Virological Methods*, 2014, vol. 208, pp. 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.028>
8. Villanova G. V., Gardiol D., Taborda M. A., Reggiardo V., Tanno H., Rivadeneira E. D., Perez G. R., Giri A. A. Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, vol. 45, no. 11, pp. 3555–3563. <https://doi.org/10.1128/jcm.02601-06>
9. Dheda K., Huggett J. F., Bustin S. A., Johnson M. A., Rook G., Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 2004, vol. 37, no. 1, pp. 112–119. <https://doi.org/10.2144/04371rr03>
10. Schmittgen T. D., Zakrajsek B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2000, vol. 46, no. 1–2, pp. 69–81. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(00)00129-9)
11. Hazari S., Acharya S. K., Panda S. K. Development and evaluation of a quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for hepatitis C virus RNA in serum using transcribed thio-RNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 2004, vol. 116, no. 1, pp. 45–54.
12. Pasloske B. L., Walkerpeach C. R., Obermoeller R. D., Winkler M., DuBois D. B. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, no. 12, pp. 3590–3594.
13. Donia D., Divizia M., Pana A. Use of armored RNA as a standard to construct a calibration curve for real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2005, vol. 126, no. 1–2, pp. 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.004>
14. Stevenson J., Hymas W., Hillyard D. The use of armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2008, vol. 150, no. 1–2, pp. 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.007>
15. Zemlyanskii V. A., Dedyulya K. L., Poklonskaya N. V., Amvros'eva T. V. Vector construction for production of armored nucleic acid. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medicine series*, 2015, no. 2, pp. 19–22 (in Russian).
16. Zambenedetti M. R., Pavoni D. P., Dallabona A. C., Dominguez A. C., Poersch C., Fragoso S. P., Krieger M. A. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2017, vol. 112, no. 5, pp. 339–347. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160380>
17. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Vol. 1*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 749 p.
18. Markowitz D., Goff S., Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology*, 1988, vol. 167, no. 2, pp. 400–406. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90101-8)
19. Volkova N. A., Fomina E. G., Smolnikova V. V., Zinovieva N. A., Fomin I. K. The U3 region of Moloney murine leukemia virus contains position-independent cis-acting sequences involved in the nuclear export of full-length viral transcripts. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, no. 29, pp. 20158–20169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545855>
20. Stepanenko O. V., Verkhusha V. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. Fluorescent proteins: physical-chemical properties and application in cell biology. *Tsitologiya [Cytology]*, 2007, vol. 49, no. 5, pp. 395–420 (in Russian).
21. Lu C., Albano C. R., Bentley W. E., Rao G. Differential rates of gene expression monitored by green fluorescent protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, vol. 79, no. 4, pp. 429–437. <https://doi.org/10.1002/bit.10295>

Информация об авторах

Фомина Елена Георгиевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: feg1@tut.by

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru

Счесленок Елена Павловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: elena_pavlovna@tut.by

Information about the authors

Elena G. Fomina – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: feg1@tut.by

Elena E. Grigorieva – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru

Elena P. Scheslenok – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elena_pavlovna@tut.by

Семижон Павел Анатольевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavel5555@tut.by

Ткачев Сергей Викторович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pjc40@mail.ru

Владыко Александр Станиславович – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vladyko@belriem.by

Pavel A. Semizhon – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavel5555@tut.by

Sergey V. Tkachev – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pjc40@mail.ru

Alexander S. Vladyko – D. Sc. (Med.), Professor, Chief researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vladyko@belriem.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 547.913:543.544.32:615.281

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-431-439>

Поступила в редакцию 17.05.2019

Received 17.05.2019

**Н. А. Коваленко¹, Г. Н. Супиченко¹, Т. И. Ахрамович¹, Е. В. Феськова¹,
В. Н. Леонтьев¹, А. Г. Шутова²**

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРНОГО МАСЛА *PSEUDOTSUGA MENZIESII*

Аннотация. Методом паровой дистилляции получены образцы эфирного масла *Pseudotsuga menziesii*, интродуцированной в Республике Беларусь. С применением газожидкостной хроматографии идентифицировано и определено более 20 компонентов. Доминирующими компонентами являлись борнилацетат (~25–30%), камфен (~14–15%), α-пинен (~7–8%), β-пинен (~8–10%). Показаны особенности распределения энантиомеров основных компонентов эфирного масла *Pseudotsuga menziesii*. Установлена его оптическая чистота по (–)-борнилацетату. Выявлена антимикробная активность эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* в отношении тестовых культур грамположительных и грамотрицательных бактерий. Грамположительные бактериальные культуры оказались более чувствительными к ингибирующему действию эфирного масла. Показано влияние оптической активности доминирующих компонентов эфирного масла на его антимикробные свойства.

Ключевые слова: *Pseudotsuga menziesii*, эфирные масла, энантиомеры, антимикробная активность

Для цитирования: Антимикробные свойства эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* / Н. А. Коваленко [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 431–439. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-431-439>

N. A. Kovalenko¹, G. N. Supichenko¹, T. I. Ahramovich¹, A. V. Feskova¹, V. N. Leontiev¹, A. G. Shutova²

¹Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

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

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF *PSEUDOTSUGA MENZIESII* ESSENTIAL OIL

Abstract. The steam distillation method was used to obtain samples of essential oil of *Pseudotsuga menziesii* introduced in Republic of Belarus. More than 20 components have been identified and determined in the essential oil of *Pseudotsuga menziesii* by gas liquid chromatography. The dominant components are bornylacetate (~25–30%), camphene (~14–15%), α-pinene (~7–8%), β-pinene (~8–10%). Distribution of the enantiomers of the main components of *Pseudotsuga menziesii* essential oil are shown. It was determined the optical purity of oil to (–)-bornylacetate. The antimicrobial activity of *Pseudotsuga menziesii* essential oil was detected in relation to test cultures of gram-positive and gram-negative bacteria. Gram-positive bacterial cultures were more sensitive to the inhibitory effect of essential oil. The effect of the optical activity of essential oil dominant components on antimicrobial properties is shown.

Keywords: *Pseudotsuga menziesii*, essential oils, enantiomers, antimicrobial activity

For citation: Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Ahramovich T. I., Feskova A. V., Leontiev V. N., Shutova A. G. Antimicrobial properties of *Pseudotsuga menziesii* essential oil. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 431–439 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-431-439>

Введение. Эфирные масла хвойных растений содержат ценные биологически активные компоненты и обладают иммуномодулирующими, ранозаживляющими, антимикробными, противовоспалительными свойствами, что играет важную роль в охране здоровья человека.

Псевдотсуга Мензиса (*Pseudotsuga menziesii*) – вид рода Псевдотсуга (*Pseudotsuga*) семейства Сосновые (Pinaceae), произрастающая преимущественно на обширных территориях западной части Канады, США, севера Мексики, на островах Тихого океана [1, 2]. Растения отличаются исключительно быстрым ростом и долговечностью. В климатических условиях Республики Беларусь псевдотсуга Мензиса сохраняет при интродукции высокие темпы роста и продуктивность, практически не подвержена грибковым заболеваниям, не поражается насекомыми-вредителями [3]. Поэтому наряду с сосной обыкновенной и елью европейской *Pseudotsuga menziesii* все чаще входит в состав лесных насаждений Республики Беларусь.

Согласно литературным данным [2–5], эфирное масло *Pseudotsuga menziesii* содержит ценные биологически активные соединения и обладает рядом лечебных свойств. В научной литературе имеются публикации по компонентному составу и антимикробным свойствам эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* различного географического происхождения [6–8]. Проведенные в последние годы научные исследования доказали наличие взаимосвязи биологической активности эфирных масел хвойных растений и оптической активности входящих в их состав компонентов [9–14], однако свойства эфирного масла *Pseudotsuga menziesii*, интродуцированной в Республике Беларусь, изучены слабо. В этой связи изучение компонентного состава, характера распределения энантиомеров и антибактериальной активности эфирного масла *Pseudotsuga menziesii*, произрастающей в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси, представляет научный и практический интерес.

Цель настоящей работы – изучить компонентный состав, характер распределения энантиомеров компонентов и антимикробные свойства эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* из коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись образцы эфирного масла, выделенные из охвоенных концов ветвей длиной 30–40 см *Pseudotsuga menziesii* из коллекции хвойных растений Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (ЦБС НАН Беларуси). Эфирное масло получали методом перегонки с водяным паром.

Компонентный состав эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* исследовали на газовом хроматографе Agilent 7820A GC (Agilent Technologies, США), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-5 (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм) в следующем температурном режиме: изотерма при 70 °С в течение 5 мин, подъем температуры до 115 °С со скоростью 3°/мин, изотерма в течение 20 мин, затем подъем температуры со скоростью 4°/мин до 200 °С, изотерма в течение 10 мин в токе газа-носителя гелия. Скорость потока гелия – 2,4 мл/мин, величина сброса – 1 : 14.

Разделение энантиомеров компонентов эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* выполняли на хроматографе «Цвет 800», оснащенный пламенно-ионизационным детектором и оборудованный капиллярной колонкой Cyclosil B (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм), в температурном режиме, аналогичном режиму анализа на хроматографе Agilent 7820A GC. Газ-носитель – азот с линейной скоростью 16,2 см/с, величина сброса – 1 : 26. Температура испарителя – 230 °С, температура детектора – 280 °С.

Объем вводимой пробы цельного эфирного масла составлял 0,1 мкл. Временем удерживания несорбирующегося газа считали время выхода пика метана.

Для идентификации основных компонентов эфирного масла проводили сравнение относительных индексов удерживания (ОИУ) компонентов со значениями ОИУ стандартных образцов терпеновых соединений. Расчет ОИУ основных компонентов эфирных масел производили по формуле

$$\text{ОИУ} = 100 \left\{ \frac{[t'_{R(x)} + q \lg t'_{\lg R(x)}] - [t'_{R(n)} + q \lg t'_{R(n)}]}{[t'_{R(n+1)} + q \lg t'_{R(n+1)}] - [t'_{R(n)} + q \lg t'_{R(n)}]} + n \right\},$$

где $t'_{R(x)}$, $t'_{R(n)}$, $t'_{R(n+1)}$ – приведенное время удерживания анализируемого компонента, n -алкана ($C_n H_{2n+2}$) и следующего n -алкана ($C_{n+1} H_{2n+4}$) соответственно, причем $t'_{R(n)} < t'_{R(x)} < t'_{R(n+1)}$. Величину q рассчитывали по значениям приведенного времени удерживания трех последовательно выходящих n -алканов:

$$q = \frac{t'_{R(n)} + t'_{R(n+2)} - 2t'_{R(n+1)}}{\lg(t'^2_{R(n+1)} / t'_{R(n)} t'_{R(n+2)})}.$$

В качестве реперных компонентов для расчета ОИУ использовали n -алканы C_7 – C_{16} .

Для количественного определения идентифицированных компонентов эфирного масла применяли метод внутренней нормализации без учета относительных поправочных коэффициентов.

Содержание компонентов по методу внутренней нормализации рассчитывали по формуле $\omega_i = S_i \cdot 100 / \sum S_i$, где ω_i – содержание i -го компонента в смеси, %; S_i – площадь пика i -го компонента.

Энантиомерный избыток E_x рассчитывали по формуле $E_x = [(A_{\max} - A_{\min}) / (A_{\max} + A_{\min})] \cdot 100$, где A_{\max} – площадь пика преобладающего энантиомера, A_{\min} – площадь пика второго энантиомера.

Все измерения производили в четырехкратной повторности, учитывая только средние значения по результатам трех экспериментов. Согласно основным техническим данным хроматографа «Цвет-800», допустимые значения относительного среднего квадратичного отклонения времени удерживания и площади пиков составляют соответственно 1 и 2 %.

Антибактериальную активность определяли методом диффузии растворов эфирного масла в агар (метод бумажных дисков). В качестве тест-культур использовали санитарно-показательные микроорганизмы: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella alony*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium* sp., *Escherichia coli* Hfr H, *Pseudomonas aeruginosa*. Суточную культуру микроорганизмов (0,1 мл) распределяли шпателем по поверхности подсохшей плотной питательной среды в чашке Петри. На поверхности засеянных сред на расстоянии 1,5–2,0 см от края чашки на равном удалении друг от друга раскладывали стерильные бумажные диски диаметром 0,5 см. На диски наносили по 10 мкл растворов эфирных масел в этаноле, выдерживали посеы при 4 °С в течение 4 ч с последующим инкубированием в термостате при 30 °С в течение 24 ч. В ходе изучения определяли диаметр зон ингибирования.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) эфирного масла псевдотсуги Мензиса определяли методом серийных разведений антимикробных агентов в жидкой среде. Путем разведения растворов препаратов получали различные действующие концентрации эфирного масла (5–0,05 %) в культуральных жидкостях (исходное содержание клеток $\sim 10^4$ КОЕ/мл). Посевы инкубировали при 30 °С в течение 24 ч. Затем, визуально определив наличие мутности в каждой из пробирок, выбирали ту из них, которая содержала прозрачную суспензию и наименьшую концентрацию антимикробного агента. Эта концентрация соответствовала МИК. Результаты усредняли по данным двух экспериментов.

Для идентификации компонентов и оценки антибактериальной активности использовали стандартные образцы (–)- α -пинен (Fluka, США, CAS 7785-26-4); (+)- α -пинен (Fluka, CAS 7785-70-8); (–)-камфен (Aldrich, CAS 5794-04-7); (+)-камфен (Aldrich, CAS 5794-03-6); (+)- β -пинен (Fluka, CAS 19902-08-0); (–)- β -пинен (Aldrich, CAS 18172-67-3); сабинен (Aldrich, CAS 3387-41-5); (+)-лимонен (Fluka, CAS 5989-27-5); (–)-лимонен (Aldrich, CAS 5989-54-8); γ -терпинен (Aldrich, CAS 99-85-4); (–)-борнилацетат (Aldrich, CAS 5655-61-8); (–)-карвон (Aldrich, CAS 6485-40-1); (+)-ментон (Fluka CAS 3391-87-5); (–)-ментон (Aldrich, CAS 10458-14-7); Δ^3 -карен (Aldrich CAS 13466-78-9); геранилацетат (Aldrich, CAS 10587-87-3). Для получения растворов стандартных веществ (~ 1 –2 %) для хроматографических исследований навески растворяли в гексане. Для получения растворов стандартных веществ (~ 20 %) для оценки антибактериальной активности навески соответствующего соединения растворяли в этаноле.

Результаты и их обсуждение. Хроматографическое разделение эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* позволило обнаружить более 40 компонентов, 21 из которых идентифицирован. Основную долю исследованного образца составляли монотерпеновые соединения (табл. 1). Их суммарное содержание достигало 35–37 %. Количественно преобладали камфен (~ 14 –15 %), α -пинен (~ 7 –8 %), β -пинен (~ 8 –10 %).

Кислородсодержащие соединения были представлены преимущественно борнилацетатом (~ 25 –30 %), терпинен-4-олом (~ 5 –7 %), ментоном (~ 2 –3 %) и карвоном (~ 3 –4 %).

По доминирующим компонентам эфирное масло *Pseudotsuga menziesii* из коллекции ЦБС НАН Беларуси близко к образцам из Сербии. Главными компонентами эфирного масла сербского происхождения являлись

Т а б л и ц а 1. Идентифицированные компоненты эфирного масла *Pseudotsuga menziesii*
Table 1. Identified components of the essential oil *Pseudotsuga menziesii*

Соединение	Содержание, %	Соединение	Содержание, %
α -Туйен	0,19 \pm 0,00	Метилхавикол	0,46 \pm 0,01
α -Пинен	7,25 \pm 0,07	Терпинен-4-ол	5,25 \pm 0,05
Камфен	14,40 \pm 0,13	Борнилацетат	25,85 \pm 0,23
Мирцен	0,55 \pm 0,07	Ментилацетат	0,20 \pm 0,01
β -Пинен	8,64 \pm 0,08	α -Терпинеол	1,12 \pm 0,01
Δ^3 -Карен	2,37 \pm 0,02	Борнеол	0,29 \pm 0,01
Лимонен	2,79 \pm 0,02	Карвон	3,15 \pm 0,03
1,8 -Цинеол	1,49 \pm 0,01	Терпенилацетат	0,18 \pm 0,00
γ -Терпинен	2,54 \pm 0,02	Гераниол	1,73 \pm 0,02
Линалоол	0,15 \pm 0,00	Геранилацетат	1,82 \pm 0,02
Ментон	2,26 \pm 0,02	Эвгенол	0,13 \pm 0,00

борнилацетат (34,65 %), камфен (29,82 %), α -пинен (11,65 %), β -пинен (2,74 %), лимонен (4,52 %) [4]. Образцы эфирного масла из Болгарии в качестве основных компонентов содержали β -пинен (24,4 %), сабинен (22,2 %), α -терпинолен (18,8 %), а борнилацетат и камфен в них присутствовали в следовых количествах [7].

С целью установления характера распределения энантиомеров основных компонентов эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* проведено его хроматографическое разделение на хиральной колонке Cysclosil B. Характер распределения энантиомеров монотерпеновых соединений представлен на рис. 1. Основные компоненты исследованного образца α -пинен, β -пинен и лимонен представлены преимущественно в виде левовращающих изомеров, в отличие от камфена, энантиомерный избыток правовращающей формы которого составлял ~85 %.

Отличительной особенностью эфирного масла псевдотсуги Мензиса из коллекции ЦБС НАН Беларуси являлась оптическая чистота по борнилацетату, который представлен в исследованном образце только в виде (-)-формы.

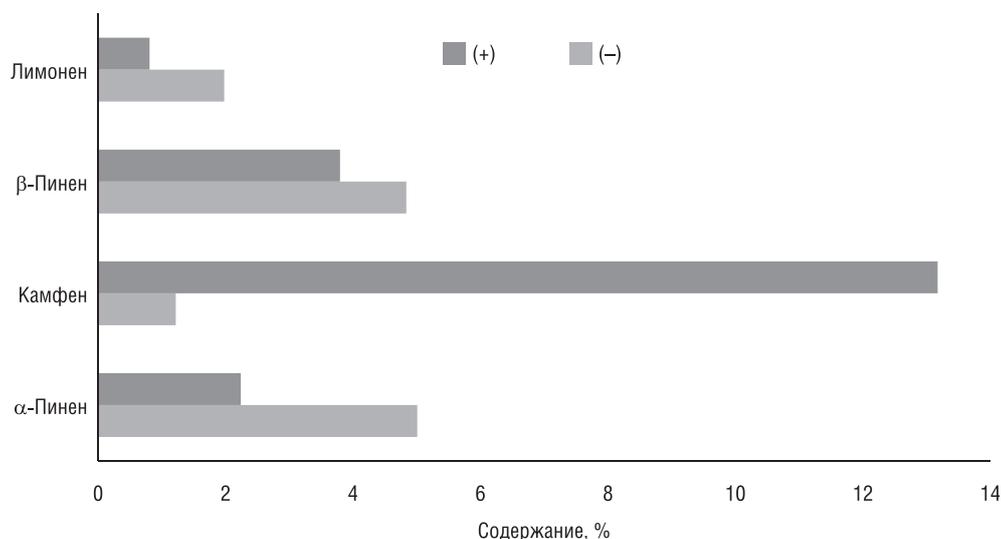


Рис. 1. Распределение энантиомеров монотерпенов эфирного масла *Pseudotsuga menziesii*
Fig. 1. The distribution of the monoterpene enantiomers of *Pseudotsuga menziesii* essential oil

На рис. 2 приведены результаты определения антимикробной активности этанольных растворов эфирного масла в отношении грамположительных тест-культур бактерий. Согласно полученным результатам, в интервале исследуемых концентраций эфирное масло подавляло рост всех тест-культур бактерий, однако при снижении его концентрации антибактериальная активность ослабевала. Растворы масла достаточно активно действовали на микроорганизмы *Clostridium* sp. и *Staphylococcus aureus*. Несколько слабее проявлялось их ингибирующее влияние в отношении *Bacillus subtilis*.

Эфирное масло угнетало рост грамотрицательных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella alony* практически в одинаковой степени (рис. 3). На степень проявления его бактерицидных свойств оказывала влияние только концентрация растворов.

Различное антибактериальное действие эфирного масла по отношению к грамположительным и грамотрицательным тестовым культурам объясняется тем, что стенка грамотрицательных бактерий имеет внешнюю мембрану (у грамположительных микроорганизмов она отсутствует), которая защищает клетку от проникновения агентов различной природы. Благодаря наличию этой мощной и непроницаемой клеточной стенки грамотрицательные бактерии более устойчивы к действию эфирного масла по сравнению с грамположительными культурами [4].

Для установления влияния оптической активности компонентов эфирного масла на его антимикробные свойства исследованы этанольные растворы стандартных образцов энантиомеров α - и β -пиненов, борнилацетата и камфена, являющихся доминирующими компонентами изученного образца.

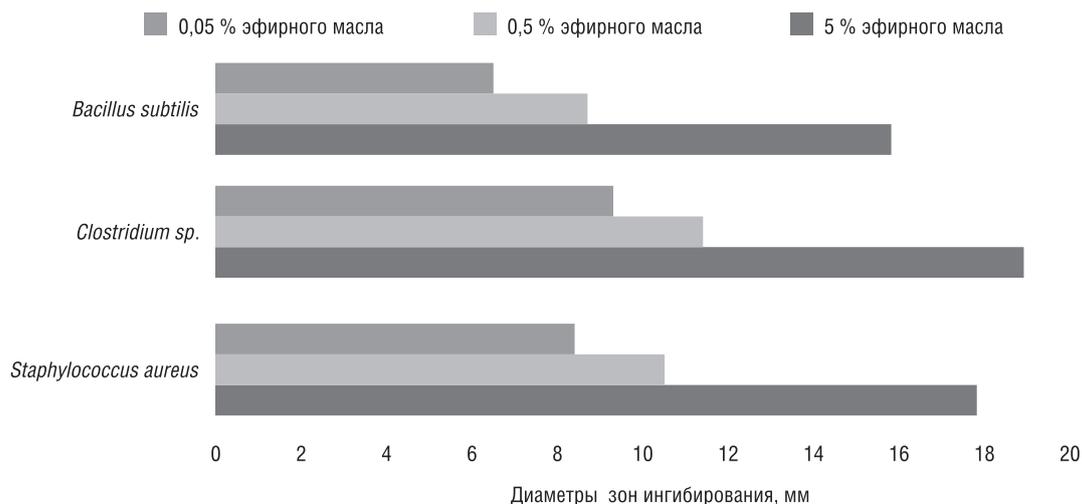


Рис. 2. Диаметры зон інгібіравання росту тэст-культур грамположitelных бактэрий этанольнымі растворами эфірнага масла *Pseudotsuga menziesii*

Fig. 2. The diameters of the zones of inhibition of growth of gram-positive bacteria test cultures by ethanol solutions of *Pseudotsuga menziesii* essential oil

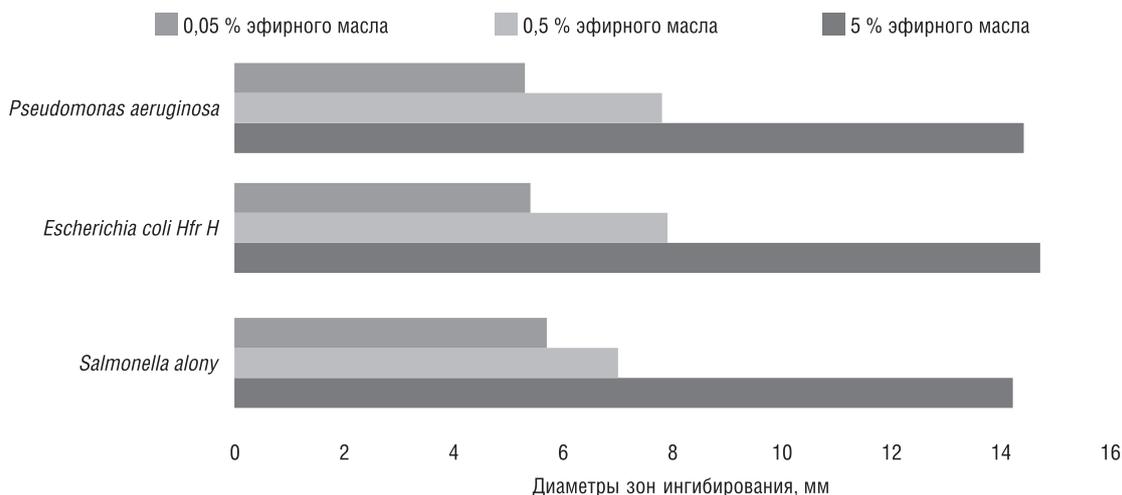


Рис. 3. Диаметры зон інгібіравання росту тэст-культур грамотрицательных бактэрий этанольнымі растворами эфірнага масла *Pseudotsuga menziesii*

Fig. 3. The diameters of the zones of inhibition of growth of gram-negative bacteria test cultures by ethanol solutions of *Pseudotsuga menziesii* essential oil

Энантіомеры α -пінена (рис. 4) эфэктывно інгібіравалі рост всех ісследованных бактэрыяльных культур, прычём ступень выраженности бактэрыцыдных свайстваў вызначалася аптычнай актывнасцю α -пінена. Левоврацаючы ізамер паказаў сябя актывным антывікробным агентам у адношэнні грамположitelных бактэрий (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sp.*). По атрыманым нам іспытальным даным антывікробная актывнасць левоврацаючага ізамера (–)- α -пінена суттэсна вышэ, чым у (+)- α -пінена. Слэдует адзначыць, што ў даступнай літэратуры сведэння аб уплыве аптычнай актывнасці α -пінена на праявленне бактэрыцыдных свайстваў эфірных масел доволна процыворэчывы. Так, у работах [15, 16] паказана большэ высакая эфэктывнасць (+)- α -пінена як антывікробнага агента па сраўненню с таковай у левоврацаючага ізамера. Аўтары [9] звязываюць разлчны ўзровень антывікробнай актывнасці эфірных масел с разлчным саотнашэннем канцэнтрацый (+)- і (–)-форм α -пінена. На наш вглед, разлчня між паказатэлямі антывікробнай актывнасці энантіомэраў α -пінена, атрыманымі ў нашым іспытальным даследаванні і прыведзенымі ў літэратуры, могуць быць рэзултыатам іспытання разлчных штамаў мікраарганізмаў.

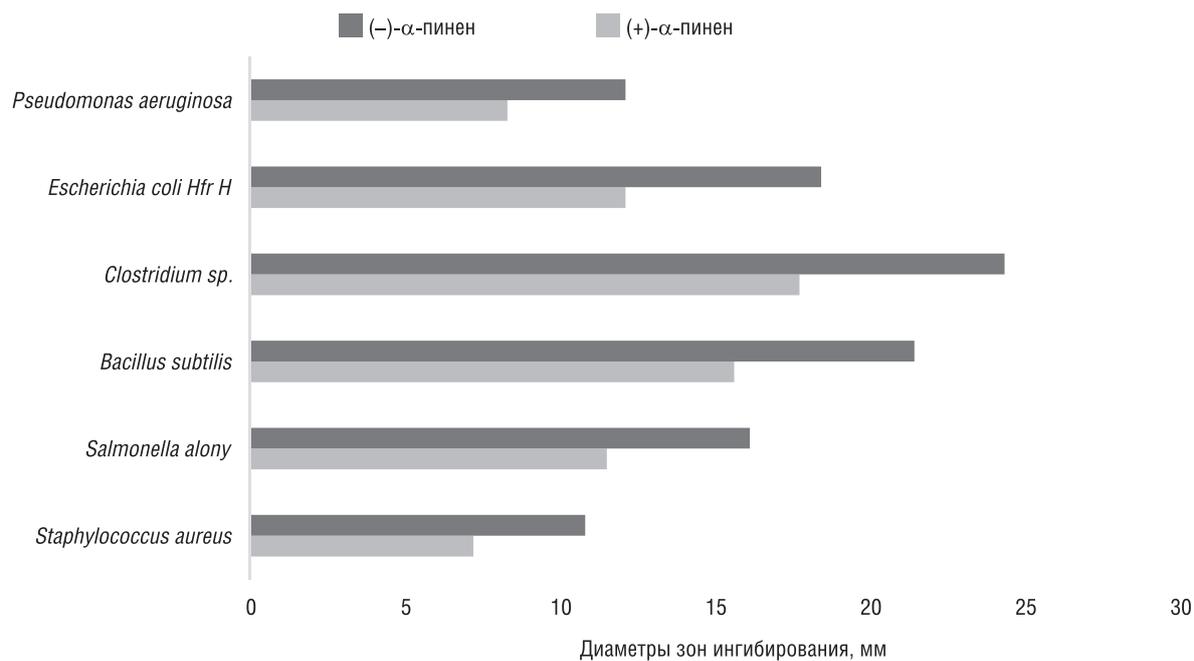


Рис. 4. Диаметры зон ингибирования роста тест-культур этанольными растворами стандартных образцов энантиомеров α-пинена

Fig. 4. The diameters of the zones of inhibition of growth of test cultures by ethanol solutions of standard samples of α-pinene enantiomers

На рис. 5 представлены данные по антимикробным свойствам энантиомеров β-пинена.

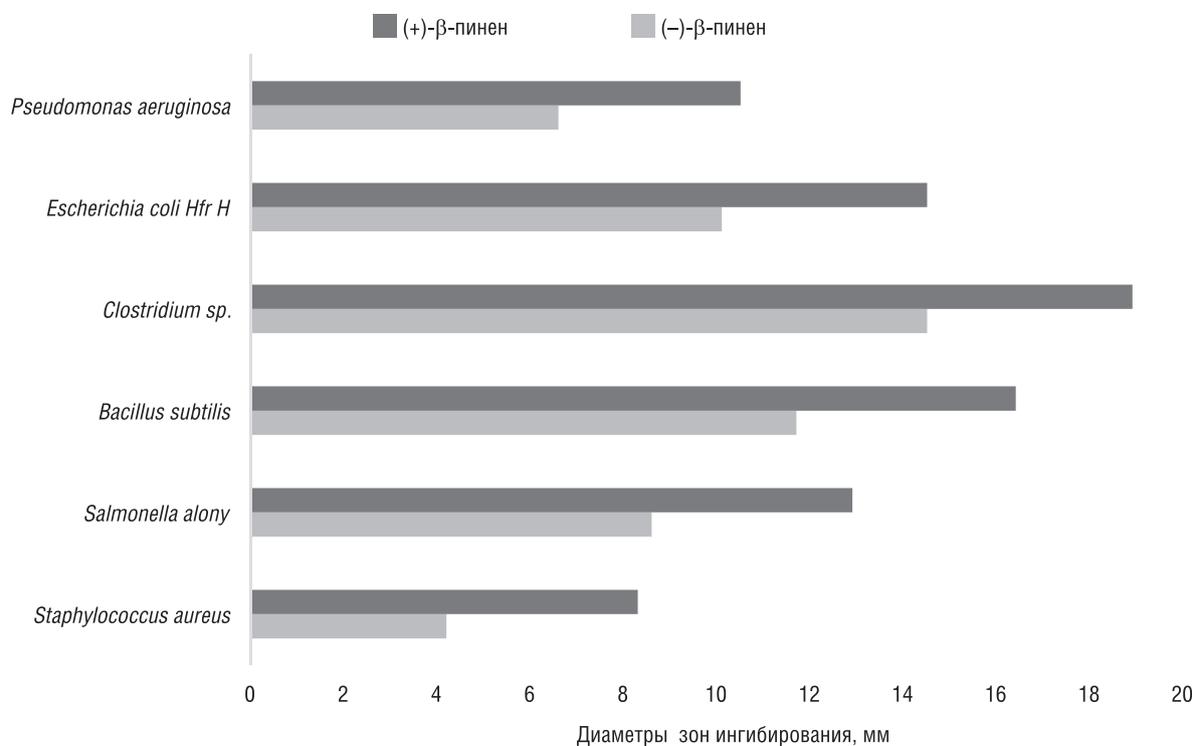


Рис. 5. Диаметры зон ингибирования роста тест-культур этанольными растворами стандартных образцов энантиомеров β-пинена

Fig. 5. The diameters of the zones of inhibition of growth of test cultures by ethanol solutions of standard samples of β-pinene enantiomers

Правовращающая форма β-пинена проявляет более выраженные бактерицидные свойства по сравнению с (–)-формой. Аналогичные результаты о более высокой антибактериальной активности правовращающей формы β-пинена приведены в работе [16].

Данные по антибактериальным свойствам энантиомеров камфена и (–)-борнилацетата представлены на рис. 6.

Аналогично β-пинену правовращающая форма камфена оказалась более эффективной в подавлении роста всех тест-культур. Наибольшую активность (+)-камфен проявил в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* Hfr H и *Pseudomonas aeruginosa*. По сравнению с оптическими изомерами камфена (–)-борнилацетат является более сильным антимикробным агентом.

Количественно антимикробные свойства эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* были выражены в виде МИК (табл. 2).

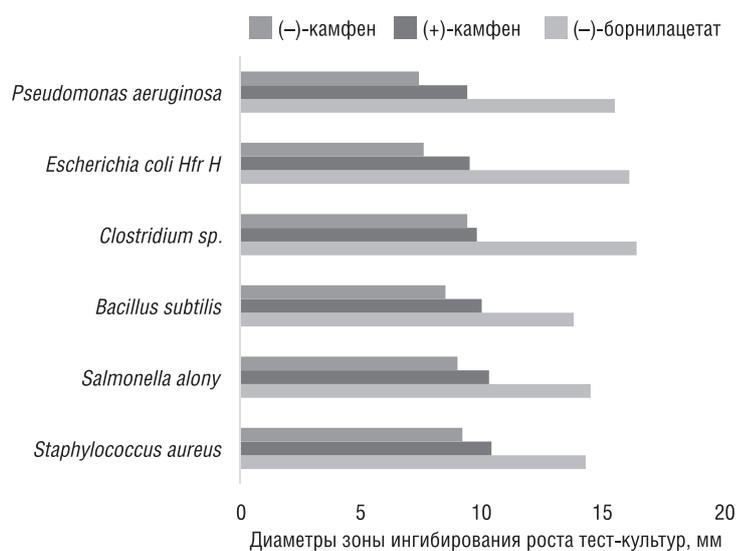


Рис. 6. Диаметры зон ингибирования роста тест-культур этанольными растворами стандартных образцов энантиомеров камфена и (–)-борнилацетата

Fig. 6. The diameters of the zones of inhibition of growth of test cultures by ethanol solutions of standard samples of camphene enantiomers and (–)-bornylacetate

Т а б л и ц а 2. Минимальная ингибирующая концентрация эфирного масла псевдотсуги Мензиса
Table 2. Minimum inhibitory concentration of the essential oil *Pseudotsuga menziesii*

Тест-культуры бактерий	МИК эфирного масла по отношению к штаммам бактерий, %
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2
<i>Salmonella alony</i>	0,5
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5
<i>Clostridium</i> sp.	0,2
<i>Escherichia coli</i> Hfr H	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5

Заключение. Таким образом, основными компонентами эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* являются борнилацетат, камфен, α-пинен и β-пинен. Установлено, что α- и β-пинены представлены преимущественно в виде левовращающих изомеров, а камфен – в виде правовращающей формы. Образец является оптически чистым по (–)-борнилацетату. Эфирное масло *Pseudotsuga menziesii* обладает антибактериальной активностью по отношению к грамотрицательным и грамположительным бактериям и может найти применение в качестве компонента лекарственных средств с бактерицидными свойствами.

Список использованных источников

1. Pureswaran, D.S. Quantitative variation in monoterpenes in four species of conifers / D.S. Pureswaran, R. Gries, J. Borden // *Biochem. System. Ecol.* – 2004. – Vol. 32, N 12. – P. 1109–1136. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.04.006>
2. Rudloff von, E. Geographical variation in the terpene composition of the leaf oil of Douglas fir / E. von Rudloff // *Pure Appl. Chem.* – 1973. – Vol. 34, N 3–4. – P. 401–410. <https://doi.org/10.1351/pac197334030401>
3. Холопук, Г.А. Экономическая оценка эффективности выращивания псевдотсуги Мензиса в Беларуси / Г.А. Холопук, В.И. Торчик // *Лес. и охот. хоз-во.* – 2012. – № 11. – С. 23–27.
4. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) (Mirb. Franco) from Serbia / V. Tesevic [et al.] // *J. Serb. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 74, N 10. – P. 1035–1040. <https://doi.org/10.2298/jsc0910035t>

5. Han, X. *In vitro* biological activities of Douglas fir essential oil in a human disease model / X. Han // *Cogent Biol.* – 2017. – Vol. 3, N 1. – P. 1035–1040. <https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1336886>
6. Antimicrobial activity of some Pacific Northwest woods against anaerobic bacteria and yeast / W. H. Johnston [et al.] // *Phytother. Res.* – 2001. – Vol. 15, N 7. – P. 568–588. <https://doi.org/10.1002/ptr.765>
7. Analysis of the essential oil volatiles of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) from Bulgaria / L. Jirovetz [et al.] // *Flavour Fragrance J.* – 2000. – Vol. 15, N 6. – P. 434–437. [https://doi.org/10.1002/1099-1026\(200011/12\)15:6<434::aid-ffj935>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200011/12)15:6<434::aid-ffj935>3.0.co;2-0)
8. Morpho-anatomical and phytochemical researches regarding *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco (Pinaceae) / I. M. Padure [et al.] // *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" din Iasi.* – 2008. – N 54. – P. 33–39.
9. Influence of plant origin natural α -pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi / K. Ložienė [et al.] // *Fitoterapia.* – 2018. – Vol. 127. – P. 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.04.013>
10. Антибактериальная активность эфирных масел иссопа лекарственного / Н. А. Коваленко [и др.] // *Химия раст. сырья.* – 2019. – № 1. – С. 191–199.
11. Антибактериальная активность эфирного масла *Agastache aurantiaca* / Н. А. Коваленко [и др.] // *Химия раст. сырья.* – 2018. – № 2. – С. 63–70.
12. Энантиомеры монотерпеновых соединений в эфирных маслах растений рода *Thuja* / В. Н. Леонтьев [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2014. – Т. 58, № 6. – С. 74–76.
13. Особенности распределения энантиомеров компонентов эфирных масел представителей рода *Pinus*, интродуцированных в Беларуси / Н. А. Коваленко [и др.] // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2012. – № 3. – С. 49–53.
14. Решетников, В. Н. Биологическая активность эфирных масел растений в связи с составом и оптической активностью компонентов / В. Н. Решетников, А. Г. Шутова, Е. В. Спиридович // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2015. – Т. 59, № 1. – С. 74–77.
15. Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in some conifers and receptor neuron discrimination of α -pinene and limonene enantiomers in the pine weevil *Hylobius abietis* / A. Wibe [et al.] // *J. Chem. Ecol.* – 1998. – Vol. 24, N 2. – P. 273–287. <https://doi.org/10.1023/A:1022580308414>
16. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers / A. C. Rivas da Silva [et al.] // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17, N 6. – P. 6305–6316. <https://doi.org/10.3390/molecules17066305>

References

1. Pureswaran D. S., Gries R., Borden J. Quantitative variation in monoterpenes in four species of conifers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004, vol. 32, no. 12, pp. 1109–1136. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.04.006>
2. Rudloff von E. Geographical variation in the terpene composition of the leaf oil of Douglas fir. *Pure and Applied Chemistry*, 1973, vol. 34, no. 3–4, pp. 401–410. <https://doi.org/10.1351/pac197334030401>
3. Kholopuk G. A., Torchik V. I. Economic evaluation of the effectiveness of growing *Pseudotsuga menziesii* in Belarus. *Lesnoe i okhotnich'e khozyaistvo = Forestry and hunting farm*, 2012, no. 11, pp. 23–27 (in Russian).
4. Tesevic V., Milosavljevic S., Vajs V., Dordevic I., Sokovic M., Lavadinovic V., Novakovic M. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) (Mirb. Franco) from Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2009, vol. 74, no. 10, pp. 1035–1040. <https://doi.org/10.2298/jsc0910035t>
5. Han X. *In vitro* biological activities of Douglas fir essential oil in a human disease model. *Cogent Biology*, 2017, vol. 3, no. 1, pp. 1035–1040. <https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1336886>
6. Johnston W. H., Carchesy J. J., Constantine G. H., Craig A. V. Antimicrobial activity of some Pacific Northwest woods against anaerobic bacteria and yeast. *Phytotherapy Research*, 2001, vol. 15, no. 7, pp. 568–588. <https://doi.org/10.1002/ptr.765>
7. Jirovetz L., Puschmann C., Stojanova A., Metodiev S., Buchbauer G. Analysis of the essential oil volatiles of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) from Bulgaria. *Flavour and Fragrance Journal*, 2000, vol. 15, no. 6, pp. 434–437. [https://doi.org/10.1002/1099-1026\(200011/12\)15:6<434::aid-ffj935>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200011/12)15:6<434::aid-ffj935>3.0.co;2-0)
8. Padure I. M., Badlescu L., Dediu T., Burzo I. Morpho-anatomical and phytochemical researches regarding *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco (Pinaceae). *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" din Iasi*, 2008, no. 54, pp. 33–39.
9. Ložienė K., Švedienė J., Paškevičius A., Raudonienė V., Sytar O., Kosyan A. Influence of plant origin natural α -pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. *Fitoterapia*, 2018, vol. 127, pp. 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.04.013>
10. Kovalenko N. A., Akhramovich T. I., Supichenko G. N., Sachivko T. V., Bosak V. N. Antibacterial activity of *Hyssopus officinalis* essential oils. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw material], 2019, no. 1, pp. 191–199 (in Russian).
11. Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Akhramovich T. I., Shutava H. G., Leont'ev V. N. Antibacterial activity of *Agastache aurantiaca* essential oils. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw material], 2018, no. 2, pp. 63–70 (in Russian).
12. Leont'ev V. N., Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Shutova H. G. Enantiomers of monoterpene compounds in the *Thuja* essential oils. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2014, vol. 58, no. 6, pp. 74–76 (in Russian).
13. Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Leont'ev V. N., Shutova H. G. Specificity of enantiomer distribution of essential oil compounds from the *Pinus* species introduced in Belarus. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2012, no. 3, pp. 49–53 (in Russian).

14. Reshetnikov V. N., Shutova H. G., Spiridovich E. V. Biological activity of plant essential oils in relation with the structure and optical activity of components. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 1, pp. 74–77 (in Russian).

15. Wibe A., Borg-Karison A.-K., Persson M., Norrin T., Mustaparta H. Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in some conifers and receptor neuron discrimination of α -pinene and limonene enantiomers in the pine weevil *Hylobius abietis*. *Journal of Chemical Ecology*, 1998, vol. 24, no. 2, pp. 273–287. <https://doi.org/10.1023/A:1022580308414>

16. Rivas da Silva A. C., Lopes P. M., Barros de Azevedo M. M., Costa L. C. M., Alviano C. S., Alviano D. A. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 6, pp. 6305–6316. <https://doi.org/10.3390/molecules17066305>

Информация об авторах

Коваленко Наталья Александровна – канд. хим. наук, доцент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kovalenko@belstu.by

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

Ахрамович Татьяна Игоревна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ahramovich@belstu.by

Феськова Елена Владимировна – канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

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

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

Information about the authors

Natalya A. Kovalenko – Ph. D. (Chem.), Assistant professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kovalenko@belstu.by

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

Tatyana I. Ahramovich – Ph. D. (Biol.), Assistant professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ahramovich@belstu.by

Alena V. Feskova – Ph. D. (Eng.), Senior researcher. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

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

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

А. Л. Исакова¹, А. В. Исаков¹, Н. А. Коваленко², Е. В. Феськова²,
Г. Н. Супиченко², Т. В. Сачивко¹

¹Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, Горки, Республика Беларусь

²Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СЕМЯН *NIGELLA SATIVA* L., ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Аннотация. Методом газовой хроматографии изучены компонентный состав эфирного масла семян и жирно-кислотный состав липидов семян *Nigella sativa* L., выращенных в условиях Республики Беларусь, с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105®/105М» – их аминокислотный состав. В результате изучения компонентного состава эфирного масла нигеллы посевой выявлен главный компонент – монотерпен *n*-цимен, содержание которого составило ~60 %. По результатам исследования жирнокислотного состава липидов семян исследуемых образцов отмечено преобладание омега-6 (линолевая) и омега-9 (олеиновая) ненасыщенных жирных кислот (75,11–76,91 % от суммарного содержания жирных кислот). Перспективными отмечены образцы НП-13/2 (сумма омега-кислот – 77,56 %, содержание линолевой кислоты – 60,16 %) и НП-4 (сумма омега-кислот – 77,55 %, содержание олеиновой кислоты – 18,12 %). В процессе изучения аминокислотного состава в экстрактах семян были идентифицированы четыре незаменимые (лейцин, метионин, валин, треонин) и четыре заменимые (аргинин, пролин, серин, глицин) аминокислоты. Установлено, что для селекционной работы по созданию сортов лекарственного назначения перспективным является образец НП-13/4 (сумма аминокислот – 62,23 %; содержание аргинина, лейцина, треонина – 17,56; 4,95; 4,12 мг/кг соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о ценности использования не только экологически и географически отдаленных форм нигеллы посевой, но и выделенных и адаптированных к условиям Беларуси ее образцов гибридного происхождения как исходного материала в селекционной работе при создании сортов лекарственного назначения.

Ключевые слова: *Nigella sativa*, компонентный состав, эфирное масло, жирные кислоты, аминокислоты, селекция, сорт

Для цитирования: Биохимический состав семян *Nigella sativa* L., выращенных в условиях Беларуси / А. Л. Исакова [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бйял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 440–447. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-440-447>

A. L. Isakova¹, A. V. Isakov¹, N. A. Kovalenko², A. Feskova², G. N. Supichenko², T. V. Sachivko¹

¹Belarusian State Agricultural Academy, Gorki, Republic of Belarus

²Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

BIOCHEMICAL COMPOSITION OF SEEDS *NIGELLA SATIVA* L., GROWN IN THE CONDITIONS OF BELARUS

Abstract. It was revealed that the main component of the studied samples composition of the essential oil of *Nigella* is monoterpene *p*-cymene, the content of which is ~ 60 %. According to the results of the study of the fatty acid composition of the seed lipids of the studied samples, the prevalence of omega-6 (linoleic) and omega-9 (oleic) unsaturated fatty acids was found (75.11–76.91 % of the total fatty acid content). Samples of NP-13/2 (sum of omega-acids 77.56 %, linoleic acid content – 60.16 %) and NP-4 (sum of omega-acids 77.55 %, oleic acid content – 18.12 %) are promising. In the process of studying the amino acid composition in seed extracts, four essential (leucine, methionine, valine, threonine) and four essential (arginine, proline, serine, glycine) amino acids were identified. A promising sample was NP-13/4 (the sum of amino acids is 62.23 %, the arginine content is 17.56 mg/kg, the leucine is 4.95 mg/kg, and threonine is 4.12 mg/kg).

The obtained data testify to the value of using not only ecologically and geographically distant forms, but also samples of hybrid origin of nigella sown, selected and adapted to the conditions of Belarus, as source material in breeding work when creating varieties of medicinal purpose.

Keywords: *Nigella sativa*, component composition, essential oils, fatty acids, amino acids, selection, variety

For citation: Isakova A. L., Isakov A. V., Kovalenko N. A., Feskova A., Supichenko G. N., Sachivko T. V. Biochemical composition of seeds *Nigella sativa* L., grown in the conditions of Belarus. *Vesti Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 440–447 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-440-447>

Введение. В настоящее время в Республике Беларусь изучаются вопросы интродукции и создания адаптированных к местным условиям сортов нигеллы различного целевого назначения.

Нигелла посевная (*Nigella sativa* L.) является однолетней травянистой культурой семейства Лютиковые (*Ranunculaceae* Juss.) [1–3]. Семена *Nigella sativa* L. используются в качестве пряности в мясной и рыбной промышленности [4–6]. Жирное масло нигеллы является наиболее ценным продуктом комплексной переработки и представляет интерес для использования в масложировой пищевой промышленности [7, 8]. По антибактериальным свойствам масло нигеллы превосходит пять самых мощных антибиотиков – ампицилин, тетрациклин, котримоксазол, гентамицин и налидиксовую кислоту. Оно оказалось действенным даже против бактерий *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*, которые наиболее устойчивы к лекарственным препаратам [9]. По результатам исследований [10] значительный положительный антидерматофитный и антиоксидантный эффект наблюдался при использовании масла нигеллы посевной с чередованием эниконазола для лечения дерматофитоза (*Trichophyton verrucosum*) у крупного рогатого скота. В результате проведенных исследований отмечено повышение иммунитета и устойчивость обыкновенного карпа (*Cyprinus carpio*) к флуоресцирующей псевдомонаде (*Pseudomonas fluorescens*) при добавлении к корму 4 % масла нигеллы посевной [11], а смертность радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), вызванной некоторыми патогенами, значительно снижалась при добавлении 5 % семян нигеллы посевной к основному корму [12].

Культура находит широкое применение также в медицине, фармакологической промышленности, косметологии, парфюмерии и в декоративном садоводстве [9–14].

В связи с вышеизложенным создание новых перспективных сортов нигеллы посевной, обладающих высоким содержанием жирных и эфирных масел, представляется актуальной задачей.

Цель настоящего исследования – изучение компонентного состава эфирного масла, жирнокислотного состава липидов и аминокислотного состава семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.), выращенной на территории Республики Беларусь.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись четыре коллекционных образца нигеллы посевной: НП-13/2 (Германия), НП-13/3 (Индия), НП-13/4 (НИЦ РАН «Никитский ботанический сад», Республика Крым), НП-14/8 (ЮБК), а также два образца гибридного происхождения: сорт Знахарка, отличающийся ранним созреванием семян (94 дня от появления всходов) [15], и НП-4, отличающийся поздним созреванием семян (106 дней от появления всходов) в условиях северо-восточной зоны Республики Беларусь. Биохимические исследования проводили через 80–90 дней после сбора семян в 2017–2018 гг.

Для количественного определения жирнокислотного состава липидов в семенах нигеллы применяли модифицированный метод Welch [16, 17]. Навески образцов помещали в стеклянные ампулы, приливали 1 см³ раствора 2%-ной серной кислоты в метаноле с внутренним стандартом – маргариновой кислотой (C_{17:0}; 1,35 мг/см³). Ампулы запаивали на газовой горелке, гидролиз триацилглицеридов с одновременным метилированием образующихся жирных кислот проводили при температуре (80±1) °С в течение 4 ч. Затем ампулы охлаждали до комнатной температуры, вскрывали и экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) гексаном (0,5 см³). МЭЖК разделяли методом газовой хроматографии на приборе Agilent 7820A GC (Agilent Technologies, США), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax (0,25 мм×30 м×0,25 мкм (полиэтиленгликоль)). Анализ проводили при скорости потока гелия через колонку 1,36 мл/мин; температуре инжектора – 250 °С, температуре детектора – 275 °С, температуре колонки – 150 °С (1 мин). Затем температуру колонки повышали со скоростью 2,9 °С/мин до 250 °С и выдерживали 3 мин. Объем анализируемой пробы – 1 мкл. Идентификацию МЭЖК производили по времени удерживания при разделении стандартных смесей этих веществ (AccuStandart, США) и оценивали в процентах от весового суммарного содержания по отношению к внутреннему стандарту.

Эфирное масло получали методом водно-паровой дистилляции из измельченных семян. Компонентный состав полученного эфирного масла определяли методом газовой хроматографии на хроматографе «Цвет-800», оснащенный пламенно-ионизационным детектором и оборудованный капиллярной колонкой Cyclosil B (30 м×0,32 мм×0,25 мкм) в следующем температурном режиме: изотерма при 70 °С в течение 5 мин, подъем температуры до 115 °С со скоростью 3°/мин,

изотерма в течение 20 мин, затем подъем температуры со скоростью 4°/мин до 200 °С, изотерма в течение 10 мин в токе газа-носителя. Газ-носитель – азот с линейной скоростью 16,2 см/с, величина сброса 1:26. Температура испарителя – 230 °С, температура детектора – 280 °С. Объем вводимой пробы цельного эфирного масла составлял 0,1 мкл. Временем удерживания несорбирующегося газа считали время выхода пика метана.

Для идентификации основных компонентов эфирного масла проводили сравнение относительных индексов удерживания (ОИУ) компонентов со значениями ОИУ стандартных образцов терпеновых соединений. Расчет ОИУ основных компонентов эфирных масел производили по формуле

$$\text{ОИУ} = 100 \left\{ \frac{[t'_{R(x)} + q \lg t'_{\lg R(x)}] - [t'_{R(n)} + q \lg t'_{R(n)}]}{[t'_{R(n+1)} + q \lg t'_{R(n+1)}] - [t'_{R(n)} + q \lg t'_{R(n)}} + n \right\},$$

где $t'_{R(x)}$, $t'_{R(n)}$, $t'_{R(n+1)}$ – время удерживания анализируемого компонента, n -алкана ($C_n H_{2n+2}$) и следующего n -алкана ($C_{n+1} H_{2n+4}$) соответственно, причем $t'_{R(n)} < t'_{R(x)} < t'_{R(n+1)}$. Значение q определяли с использованием приведенного времени удерживания трех последовательно выходящих n -алканов по формуле

$$q = \frac{t'_{R(n)} + t'_{R(n+2)} - 2t'_{R(n+1)}}{\lg(t'^2_{R(n+1)} / t'_{R(n)} t'_{R(n+2)})}.$$

В качестве реперных компонентов для расчета ОИУ использовали n -алканы C_7 – C_{16} . Для количественного определения идентифицированных компонентов эфирного масла использовали метод внутренней нормализации без учета относительных поправочных коэффициентов. Содержание компонентов по методу внутренней нормализации рассчитывали по формуле $\omega_i = S_i \cdot 100 / \sum S_i$, где ω_i – содержание i -го компонента в смеси, %; S_i – площадь пика i -го компонента [17].

Все измерения проводили в четырехкратной повторности. Результатами исследования считали средние значения по данным трех экспериментов. Согласно основным техническим данным хроматографа «Цвет-800», допустимые значения относительных СКО времени удерживания и площадей пиков составляют соответственно 1 и 2 %.

Исследование аминокислотного состава экстрактов из семян нигеллы проводили согласно существующей методике М 04-63-2010 («Определение массовой доли синтетических аминокислот и витаминов в кормовых добавках с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105®/105М»). Пробоподготовку проводили путем высокотемпературной экстракции сверхкритических углекислотных экстрактов из семян нигеллы 10%-ным этиловым спиртом на муфельной печи SNOL 1100. Минерализацию проводили, используя режим «без давления», в течение 20 мин, электрофорез – под напряжением в 10 кВт.

Результаты и их обсуждение. В результате газохроматографического разделения эфирного масла нигеллы посевной нами выявлен главный компонент исследованных образцов – ациклический монотерпен (n -цимен), содержание которого составляло ~60 %. Данное соединение придает маслу смолисто-камфорный аромат, что важно для использования нигеллы в качестве специи [18]. Однако известно, что присутствие n -цимена в масле может быть связано с окислительными и изомеризационными превращениями терпенов, в первую очередь γ -терпинена. Во многих эфирных маслах наряду с n -цименом присутствует γ -терпинен [19]. Можно предположить, что такое высокое содержание n -цимена связано не только с естественным накоплением его в семенах, но и с окислительными процессами, происходившими во время хранения семян нигеллы посевной.

Образцы содержали достаточно высокие концентрации α -туйена (~14,0 %), γ -терпинена (~3–10 %) и сабинена (~2–4 %). Содержание остальных компонентов не превышало 5 % (табл. 1).

α -Пинен и β -пинен хорошо распознаются насекомыми и являются важным регулятором их химической коммуникации. Лимонен применяют как репеллент. В косметологии его используют для придания хвойного или цитрусового аромата. Присутствие γ -терпинена в эфирном масле придает ему лимонный запах [18]. Таким образом, семена нигеллы можно использовать не только в пищевой, косметологической промышленности, но и в качестве репеллентов нового поколения.

По компонентному составу эфирное масло семян нигеллы посевной, выращенной в Беларуси, как по качественному, так и по количественному составу несущественно отличалось от эфирного масла, полученного из семян, выращенных в Турции, Италии, Сирии, Германии [20, 21]. Образцы гибридного происхождения (сорт Знахарка и НП-4) близки по содержанию соединений эфирного масла к родительским образцам, что говорит о способности указанных образцов нигеллы посевной накапливать эфирные масла в условиях северо-востока Беларуси не хуже, чем их экологически и географически отдаленные формы, и вследствие этого являться перспективным для селекции материалом.

По результатам газохроматографического анализа установлено, что в семенах нигеллы посевной преобладают линолевая ($C_{18:2}$), олеиновая ($C_{18:1cis}$) и пальмитиновая ($C_{16:0}$) кислоты (табл. 2).

Наибольшее содержание линолевой кислоты отмечено у образца НП-13/2 (60,16%), олеиновой кислоты (*цис* + *транс*) – у образца НП-13/3 (18,12%). Доля пальмитиновой кислоты составляла в среднем 11,62%, арахидиновой – 0,12, эйкозодиеновой – 3,04, стеариновой – 1,90%.

Содержание α -линоленовой (омега-3) кислоты у исследуемых образцов колебалась от 0,29 до 0,47%, причем по этому показателю особенно выделялись образцы НП-13/2 и НП-14/8. Сумма омега-кислот в исследуемых образцах составляла 75,69–77,56%.

Масло, имеющее высокое содержание мононенасыщенной олеиновой кислоты, обладает повышенной устойчивостью к разрушающим факторам тепла и света, что делает его предпочтительным в использовании для пищевых и кулинарных целей, а высокое содержание линолевой и α -линоленовой кислот в маслах свидетельствует о их лекарственной ценности [22].

Наибольший выход масла отмечен у образцов НП-13/3 (Индия) и НП-4 (Беларусь) – 37,83 и 36,12% соответственно. В среднем по образцам нигеллы посевной выход жирного масла составил 35%.

По результатам жирно-кислотного исследования липидов семян нигеллы посевной, выращенной в условиях Республики Беларусь, выявлено высокое содержание

Т а б л и ц а 1. Компонентный состав эфирных масел *Nigella sativa* L.

Table 1. Composition of the essential oils of *Nigella sativa* L.

Компонент	Содержание, %					
	НП-13/2	НП-13/3	НП-13/4	НП-14/8	Сорт Знахарка	НП-4
α -Туйена	16,63	14,41	9,41	15,60	13,52	10,04
α -Пинен	3,26	2,90	1,95	3,01	1,71	2,03
Сабинен	3,74	3,56	2,83	3,64	3,35	2,73
β -Пинен	0,31	0,27	0,28	0,27	0,29	0,32
Лимонен	1,70	1,75	1,64	1,71	1,61	1,55
<i>n</i> -Цимен	59,40	64,04	68,6	63,52	63,67	63,71
γ -Терпинен	5,72	4,33	5,04	3,30	5,62	9,98
Фенхон	1,92	2,16	2,73	2,36	2,29	2,11
Метилхавикол	0,10	0,19	0,20	0,20	0,22	0,12
Терпинен-4-ол	0,21	0,22	0,48	0,22	0,24	0,40
Борнилацетат	0,12	0,03	–	–	0,03	–
Нераль	0,13	0,20	–	0,26	0,29	–
Гераниаль	0,46	0,16	0,31	0,21	0,14	0,31
Карвакрол	0,95	0,56	0,93	0,76	0,56	1,12

Т а б л и ц а 2. Жирнокислотный состав липидов семян *Nigella sativa* L.

Table 2. Fatty acid composition of seed lipids *Nigella sativa* L.

Жирная кислота	Содержание жирных кислот, %					
	НП-13/2	НП-13/3	НП-13/4	НП-14/8	Сорт Знахарка	Образец НП-4
Миристиновая $C_{14:0}$	0,15	0,21	0,25	0,26	0,24	0,29
Пальмитиновая $C_{16:0}$	11,33	12,00	11,68	11,36	11,70	11,64
Пальмитолеиновая ($\omega 7$) $C_{16:1}$	0,27	0,30	0,27	0,23	0,24	0,28
Стеариновая $C_{18:0}$	1,71	2,05	1,82	1,89	1,99	1,93
<i>Цис</i> -олеиновая ($\omega 9$) $C_{18:1cis}$	15,34	16,74	15,04	14,76	16,70	15,18
<i>Транс</i> -олеиновая ($\omega 9$) $C_{18:1trans}$	1,32	1,38	1,82	1,71	1,26	2,29
Линолевая ($\omega 6$) $C_{18:2}$	60,16	58,57	58,44	59,30	57,15	59,44
α -линоленовая ($\omega 3$) $C_{18:3}$	0,47	0,29	0,32	0,47	0,34	0,36
Арахидиновая $C_{20:0}$	0,12	0,13	0,11	0,12	0,12	0,12
Гондоиновая $C_{20:1}$	0,27	0,31	0,26	0,27	0,33	0,27
Эйкозодиеновая $C_{20:2}$	3,26	2,76	3,06	3,26	2,77	3,11
Сумма ($\omega 9$, $\omega 6$ кислот)	76,82	76,69	75,30	75,77	75,11	76,91
Сумма ($\omega 3$, $\omega 7$, $\omega 9$, $\omega 6$ кислот)	77,56	77,28	75,89	76,47	75,69	77,55
Выход масла, %	34,26	37,83	35,15	34,66	32,17	36,12

омега-6 и омега-9 ненасыщенных жирных кислот. В сравнении с коллекционными (родительскими) образцами отмечены незначительные различия по содержанию незаменимых кислот у образцов гибридного происхождения, что свидетельствуют о ценности использования данных образцов в селекционной работе при создании сортов лекарственного назначения.

Образец НП-13/2 (сумма омега-кислот составляет 77,56 %, содержание линолевой кислоты – 60,16 %) и образец НП-4 (сумма омега-кислот составляет 77,55 %, содержание линолевой кислоты – 59,44 %) можно отнести к перспективным для использования их в дальнейшей селекционной работе.

В процессе изучения аминокислотного состава в экстрактах семян были идентифицированы четыре незаменимые (лейцин, метионин, валин, треонин) и четыре заменимые (аргинин, пролин, серин, глицин) аминокислоты (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Содержание аминокислот в семенах *Nigella sativa* L.

T a b l e 3. Amino acid content in the seeds of *Nigella sativa* L.

Образец	Аминокислотный профиль, мг/кг								ССА, %
	Лейцин	Аргинин	Метионин	Валин	Треонин	Пролин	Серин	Глицин	
НП-13/2	4,38	17,59	0,06	0,65	3,24	6,69	2,12	2,35	51,23
НП-13/3	3,29	15,41	0,07	0,72	3,52	6,25	1,94	2,97	58,25
НП-13/4	4,95	17,56	0,05	0,55	4,12	7,84	2,04	3,25	62,23
НП-14/8	3,95	15,29	0,06	0,49	3,23	7,56	2,33	3,46	57,12
Сорт Знахарка	2,45	15,02	0,07	0,41	2,04	5,77	1,73	2,48	52,32
НП-4	2,95	16,02	0,07	0,39	3,04	6,77	1,26	2,48	47,20

Среди незаменимых аминокислот в изученных образцах нигеллы посевной были выделены лейцин (от 2,45 мг/кг у сорта Знахарка до 4,95 мг/кг у образца НП-13/4), валин (от 0,39 мг/кг у образца НП-4 до 0,72 мг/кг у образца НП-13/3) и треонин (от 2,04 мг/кг у сорта Знахарка до 4,12 мг/кг у образца НП-13/4). По содержанию метионина существенных различий не выявлено.

В составе заменимых аминокислот в изученных образцах были выделены аргинин (от 15,02 мг/кг у сорта Знахарка до 17,59 мг/кг у НП-13/2), пролин (от 5,77 мг/кг у сорта Знахарка до 7,84 мг/кг у НП-13/4), серин (от 1,26 мг/кг у НП-4 до 2,33 мг/кг у НП-13/4) и глицин (от 2,35 мг/кг у образца НП-13/2 до 3,46 мг/кг у образца НП-14/8). Наибольшее содержание аминокислот выявлено в семенах образца НП-13/4 (62,23 %), наименьшее – у образца НП-4 (47,20 %).

Таким образом, выявлено, что в семенах образцов *N. sativa* L., выращенных в условиях Беларуси, преобладала аминокислота аргинин, играющая значимую роль в работе сердечно-сосудистой системы [23]. Перспективным образцом отмечен образец НП-13/4 (содержание аминокислот – 62,23 %; содержание аргинина, лейцина, треонина – 17,56; 4,95 и 4,12 мг/кг соответственно).

Следует отметить, что количество извлекаемых аминокислот из растительного сырья зависит от применяемых методик и оборудования и может различаться в пределах образца. Так, по данным Н. К. Рудь, А. М. Сампиева [24], изучавших аминокислотный состав сверхкритических углекислотных экстрактов из семян нигеллы посевной, извлекаемость аминокислот из растительного сырья в большей степени происходила при повышении температуры и давления, и суммарное содержание аминокислот, таким образом, составляло 21,87–175,34 мг/кг. При этом преобладали аминокислоты с тем же качественным составом, что и в наших исследованиях.

Заключение. Таким образом, по результатам проведенных исследований дана биохимическая характеристика семян *Nigella sativa* L., выращенных в условиях Беларуси. Определены перспективные образцы как исходный материал для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов лекарственного назначения.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ в рамках проекта Б18М-019 «Создание исходного материала нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.) для селекции в условиях Беларуси», № госрегистрации в ГУ «БелИСА» 20181745 от 11.10.2018.

Acknowledgements. This work was financially supported by the BRFFR in the framework of the project B18M-019 “Creation of the source material of the sowing nigella (*Nigella sativa* L.) for breeding in the conditions of Belarus”, state registration number at GU BelISA 20181745 dated 10.11.2018.

Список использованных источников

1. Исакова, А. Л. Некоторые аспекты возделывания нигеллы / А. Л. Исакова, В. Н. Прохоров // Наше сел. хоз-во. – 2019. – № 3. – С. 108–110.
2. Исакова, А. Л. Нигелла – перспективная эфиромасличная культура / А. Л. Исакова, А. В. Исаков // Наше сел. хоз-во. – 2016. – № 11. – С. 83–85.
3. Исакова, А. Л. Особенности развития образцов нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.) в условиях северо-восточной зоны Республики Беларусь / А. Л. Исакова, А. В. Исаков, В. Н. Прохоров // Вестн. Белорус. гос. с.-х. акад. – 2016. – № 3. – С. 79–82.
4. Datta, A. K. Black cumin (*Nigella sativa* L.) – a review / A. K. Datta, A. Saha, A. Bhattacharya // J. Plant Development Sci. – 2012. – Vol. 4, N 1. – P. 1–43.
5. Немтинов, В. И. Нигелла посевная в Крыму / В. И. Немтинов // Картофель и овощи. – 2016. – № 10. – С. 22–23.
6. Алиева, А. К. Совершенствование рецептуры спредов и жировых компонентов с учетом запросов потребителей / А. К. Алиева, Дж. С. Казиахмедов // Технично-технол. проблемы сервиса. – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 85–88.
7. Курако, У. М. Разработка технологии халыяльного паштета из печени индейки методом обогащения маслом черного тмина / У. М. Курако // Аграр. науч. журн. – 2016. – № 3. – С. 52–56.
8. Рудь, Н. К. Основные результаты фитохимического и фармакологического исследования чернушки посевной (обзор) / Н. К. Рудь, А. М. Сампиев, Н. А. Давитавян // Науч. вед. Белгород. гос. ун-та. Сер. Медицина. Фармация. – 2013. – № 25. – С. 207–212.
9. Balıkcı, E. Antidermatophyte and antioxidant activities of *Nigella sativa* alone and in combination with enilconazole in treatment of dermatophytosis in cattle / E. Balıkcı // Veterinárni Medicina. – 2016. – Vol. 61, N 10. – P. 539–545. <https://doi.org/10.17221/32/2015-vetmed>
10. Effect of *Nigella sativa* (black cumin seed) to enhance the immunity of common carp (*Cyprinus carpio*) against *Pseudomonas fluorescens* / S. Khondoker [et al.] // Am. J. Life Sci. – 2016. – Vol. 4, N 3. – P. 87–92. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20160403.14>
11. Antioxidant and antibacterial effects of *Nigella sativa* L. seed and *Echinophora platyloba* dc. Leaf extracts on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigeration storage / S. Raeisi [et al.] // IJBPAS. – 2015. – Vol. 4, N 5. – P. 3101–3114.
12. Longato, E. Nutritional and zootechnical aspects of *Nigella sativa*: a review / E. Longato, G. Meineri, P. G. Peiretti // J. Animal Plant Sci. – 2015. – Vol. 25, N 4. – P. 921–934.
13. Rathee, P. S. Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *Nigella sativa* Linn. / P. S. Rathee, S. H. Mishra, R. Kaushal // Ind. J. Pharm. Sci. – 1982. – Vol. 44, N 1. – P. 8–10.
14. Al-Beitawi, N. Effect of feeding different levels of *Nigella sativa* seeds (black cumin) on performance, blood constituents and carcass characteristics of broiler chicks / N. Al-Beitawi, S. S. El-Ghousein // Int. J. Poultry Sci. – 2008. – Vol. 7, N 7. – P. 715–721. <https://doi.org/10.3923/ijps.2008.715.721>
15. Характеристика сорта Знахарка нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.) / А. Л. Исакова [и др.] // Вестн. Белорус. гос. с.-х. акад. – 2019. – № 1. – С. 79–81.
16. Феськова, Е. В. Семена льна масличного сорта Солнечный – источник биологически активных веществ / Е. В. Феськова, В. Н. Леонтьев, В. В. Титок // Тр. БГТУ. Сер. 4: Химия, технология орган. веществ и биотехнология. – 2009. – Т. 1, № 4. – С. 201–203.
17. Welch, R. W. A micro-method for the estimation of oil content and composition in seeds crops / R. W. Welch // J. Sci. Food Agr. – 1977. – Vol. 28, N 7. – P. 635–638. <https://doi.org/10.1002/jfsa.2740280710>
18. Некоторые биохимические характеристики *Prangos trifida* (Mill.) Herrnst. & Heun / О. И. Коротков [и др.] // Бюл. Гос. Никит. ботан. сада. – 2018. – № 128. – С. 76–83.
19. Усов, А. П. Химия душистых и биологически активных веществ : учеб. пособие / А. П. Усов, В. Е. Тарасов, М. Г. Крапивина. – Краснодар : Кубан. гос. технол. ун-т, 2006. – 242 с.
20. Volatiles distribution in *Nigella* species (black cumin seeds) and in response to roasting as analyzed via solid-phase microextraction (SPME) coupled to chemometrics / M. A. Farag [et al.] // Industr. Crops Products. – 2017. – Vol. 108. – P. 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.011>
21. Wajs, A. Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland / A. Wajs, R. Bonikowski, D. Kalemba // Flav. Fragr. J. – 2008. – Vol. 23, N 2. – P. 126–132. <https://doi.org/10.1002/ffj.1866>
22. Мюррей, М. Жирные кислоты и наше здоровье / М. Мюррей. – М. : Корал Клуб, 1999. – 32 с.
23. Артемьева, Е. П. Аминокислоты и белки : учеб.-метод. пособие / Е. П. Артемьева. – Екатеринбург : Урал. гос. ун-т путей сообщения, 2006. – 31 с.
24. Рудь, Н. К. Сравнительное изучение аминокислотного состава сверхкритических углекислотных экстрактов из семян чернушки посевной / Н. К. Рудь, А. М. Сампиев [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования. – М., 2005. – Режим доступа : <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=11668>. – Дата доступа : 16.02.2018.

References

1. Isakova A. L., Prokhorov V. N. Some aspects of nigella cultivation. *Nashe sel'skoe khozyaistvo* [Our agriculture], 2019, no. 3, pp. 108–110 (in Russian).
2. Isakova A. L., Isakov A. V. Nigella – promising oil-bearing culture. *Nashe sel'skoe khozyaistvo* [Our agriculture], 2016, no. 11, pp. 83–85 (in Russian).
3. Isakova A. L., Isakov A. V., Prokhorov V. N. Features of the development of *Nigella sativa* L. samples under the conditions of the northeast zone of the Republic of Belarus. *Vestnik Belorusskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* [Bulletin of the Belarusian State Agricultural Academy], 2016, no. 3, pp. 79–82 (in Russian).
4. Datta A. K., Saha A., Bhattacharya A. Black cumin (*Nigella sativa* L.) – a review. *Journal of Plant Development Sciences*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 1–43.
5. Nemtinov I. I. Nigella sown in the Crimea. *Kartofel' i ovoshchi* [Potatoes and vegetables], 2016, no. 10, pp. 22–23 (in Russian).
6. Alieva A. K., Kaziakhmedov Dzh. S. Improving the formulation of spreads and fat components with the needs of consumers. *Tekhniko-tehnologicheskie problemy servisa* [Technical and technological problems of service], 2014, vol. 27, no. 1, pp. 85–88 (in Russian).
7. Kurako U. M. Development of technology of halal paste from turkey liver with the method of enrichment of black cumin oil. *Agrarnyi nauchnyi zhurnal* [Agrarian scientific journal], 2016, no. 3, pp. 52–56 (in Russian).
8. Rud N. K., Sampiev A. M., Davitavyan N. A. The main results of the phytochemical and pharmacological studies of the black crumbs (review). *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Meditsina. Farmatsiya* [Scientific reports of Belgorod State University], 2013, no. 25, pp. 207–212 (in Russian).
9. Balicki E. Antidermatophyte and antioxidant activities of *Nigella sativa* alone and in combination with cattle. *Veterinárni Medicina*, 2016, vol. 61, no. 10, pp. 539–545. <https://doi.org/10.17221/32/2015-vetmed>
10. Khondoker S., Hossain M. M., Hasan-Uj-Jaman, Alam E., Zaman F. U., Tabassum N. Effects of *Nigella sativa* (black cumin seed) to enhance the immunity of common carp (*Cyprinus carpio*) against *Pseudomonas fluorescens*. *American Journal of Life Sciences*, 2016, vol. 4, no. 3, pp. 87–92. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20160403.14>
11. Raeisi S., Sharifi-Rad M., Shaban-Pour B., Ojagh S. M., Alishahi A. R. Antioxidant and antibacterial effects of *Nigella sativa* L. seed and *Echinophora platyloba* dc. Leaf extracts on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigeration. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences (IJBPAS)*, 2015, vol. 4, no. 5, pp. 3101–3114.
12. Longato E., Meineri G., Peiretti P. G. Nutritional and zootechnical aspects of *Nigella sativa*: a review. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 2015, vol. 25, no. 4, pp. 921–934.
13. Rathee P. S., Mishra S. H., Kaushal R. Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *Nigella sativa* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1982, vol. 44, no. 1, pp. 8–10.
14. Al-Beitawi N., El-Ghousein S. S. Effects of feeding different levels of seeds (black cumin) on performance, blood constituents and carcass characteristics of broiler chicks. *International Journal of Poultry Science*, 2008, vol. 7, no. 7, pp. 715–721. <https://doi.org/10.3923 / ijps.2008.715.721>
15. Isakova A. L., Isakov A. V., Prokhorov V. N., Kovalenko N. A., Fes'kova E. V. Characteristics of the variety Znakharka nigella (*Nigella sativa* L.). *Vestnik Belorusskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* [Bulletin of the Belarusian State Agricultural Academy], 2019, no. 1, pp. 79–81 (in Russian).
16. Fes'kova E. V., Leont'ev V. N., Titok V. V. Seeds of flax oily variety Solnechnyi – a source of biologically active substances. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya 4. Khimiya i tekhnologiya organicheskikh veshchestv* [Proceedings of the Belarusian State Technological University. Series 4. Chemistry and technology of organic substances.], 2009, vol. 1, no. 4, pp. 201–203 (in Russian).
17. Welch R. W. A micro-method for the estimation of oil content and composition in seeds crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1977, vol. 28, no. 7, pp. 635–638. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280710>
18. Korotkov O. I., Shevchuk O. M., Shatko V. G., Timashova L. A., Fes'kov S. A. Some biochemical characteristics of *Prangos trifida* (Mill.) Herrnst. & Heyn. *Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada* [Bulletin of the State Nikitsky Botanical Garden], 2018, no. 128, pp. 76–83 (in Russian).
19. Usov A. P., Tarasov V. E., Krapivina M. G. *Chemistry of fragrant and biologically active substances*. Krasnodar, Kuban State Technological University, 2006. 242 p. (in Russian).
20. Farag M. A., El-Kersh D. M., Rasheed D. M., Heiss A. G. Volatiles distribution in the *Nigella* species (black cumin seeds) and analyzed in solid-phase microextraction (SPME) and coupled to chemometrics. *Industrial Crops and Products*, 2017, vol. 108, pp. 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.011>
21. Wajs A., Bonikowski R., Kalemba D. Composition of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*, 2008, vol. 23, no. 2, pp. 126–132. <https://doi.org/10.1002/ffj.1866>
22. Murray M. *Fatty acids and our health*. Moscow, Coral Club Publ., 1999. 32 p. (in Russian).
23. Artem'eva E. P. *Amino acids and proteins*. Yekaterinburg, 2006, Ural State University of Communication. 31 p. (in Russian).
24. Rud' N. K., Sampiev A. M. A comparative study of the amino acid composition of supercritical carbon dioxide extracts from seeds of a black cumin seed [Electronic resource]. *Modern problems of science and education*. Moscow, 2005. Available at: <http://www.science-education.ru/en/article/view?id=11668> (accessed 02.16.2018) (in Russian).

Информация об авторах

Исакова Анастасия Леонидовна – аспирант. Белорусская государственная сельскохозяйственная академия (ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки, Республика Беларусь). E-mail: nastyaisakova213@gmail.com

Исаков Андрей Васильевич – канд. с.-х. наук, доцент. Белорусская государственная сельскохозяйственная академия (ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки, Республика Беларусь). E-mail: isakov141@ Rambler.ru

Коваленко Наталья Александровна – канд. хим. наук, доцент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kovalenko@belstu.by

Феськова Елена Владимировна – канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

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

Сачивко Татьяна Владимировна – канд. с.-х. наук, доцент. Белорусская государственная сельскохозяйственная академия (ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки, Республика Беларусь). E-mail: sachyuka@ Rambler.ru

Information about the authors

Anastasia L. Isakova – Postgraduate student. Belarusian State Agricultural Academy (5, Michurin Str., 213407, Gorki, Republic of Belarus). E-mail: nastyaisakova213@gmail.com

Andrey V. Isakov – Ph. D. (Agricult.), Assistant professor. Belarusian State Agricultural Academy (5, Michurin Str., 213407, Gorki, Republic of Belarus). E-mail: isakov141@ Rambler.ru

Natalya A. Kovalenko – Ph. D. (Chem.), Assistant professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kovalenko@belstu.by

Alena V. Feskova – Ph. D. (Eng.), Senior researcher. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

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

Tatyana V. Sachivko – Ph. D. (Agricult.), Assistant professor. Belarusian State Agricultural Academy (5, Michurin Str., 213407, Gorki, Republic of Belarus). E-mail: sachyuka@ Rambler.ru

О. О. Коломиец, С. В. Глушен

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

СУТОЧНЫЙ РИТМ РОСТА ЛИСТЬЕВ И ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК У ПЕРЦА СТРУЧКОВОГО (*CAPSICUM ANNUUM* L.)

Аннотация. С помощью метода, основанного на компьютерном анализе изображений, исследована взаимосвязь между суточным ростом листьев стручкового перца (*Capsicum annuum* L.) и пролиферативной активностью образующих эти органы клеток. Установлено, что наблюдаемая у этого вида динамика роста листьев позволяет отнести его ко второму типу суточного роста двудольных растений, который отличается максимумом прироста вечером или в начале ночи.

Исследование клеток листьев с помощью цитометрии ДНК показывает, что их пролиферативная активность также выше ночью, чем днем. Это позволяет предположить, что суточный ритм роста листьев стручкового перца обусловлен синхронизацией клеточного цикла с помощью освещения.

Ключевые слова: рост растений, цитометрия ДНК, клеточный цикл, перец стручковый

Для цитирования: Коломиец, О. О. Суточный ритм роста листьев и пролиферации клеток у перца стручкового (*Capsicum annuum* L.) / О. О. Коломиец, С. В. Глушен // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 448–455. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-448-455>

O. O. Kolomiets, S. V. Gloushen

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

THE DIEL RHYTHM OF LEAF GROWTH AND CELL PROLIFERATION IN CAPSICUM (*CAPSICUM ANNUUM* L.)

Abstract. Relationship between the diel leaf growth of capsicum and proliferative activity of cells has been investigated using a computer-aided image analysis. It has been established the leaf growth pattern observed in this species allows to refer it to the second type of growth of dicotyledons, which is characterized by the maximum growth rate in the evening or at the beginning of the night.

A DNA cytometry study of leaf cells shows that their proliferative activity is also higher at night than during the day. This suggests that the diel rhythm of capsicum leaf growth is due to the synchronization of cell cycle with a lighting.

Keywords: plant growth, DNA cytometry, cell cycle, capsicum

For citation: Kolomiets O. O., Gloushen S. V. The diel rhythm of leaf growth and cell proliferation in capsicum (*Capsicum annuum* L.). *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 448–455 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-448-455>

Введение. Взаимосвязь между ростом организма и пролиферацией образующих его клеток представляет собой одну из центральных проблем биологии. Если на уровне клеточных популяций координация роста и клеточного цикла исследована достаточно детально, то на уровне организма она усложнена процессами дифференцировки и кооперации клеток и изучена недостаточно [1]. Однако знание этих связей важно как для понимания общих закономерностей роста и развития организмов, так и для управления этими процессами.

Рост растения может быть определен как необратимое увеличение его размеров и биомассы, которое находится под контролем внутренних генетических и эпигенетических механизмов, а также факторов внешней среды: питательных веществ, воды, температуры и освещения. На тканевом уровне рост обеспечивается делением, растяжением и дифференцировкой клеток. Суточная динамика роста растения подчиняется ритму, который обладает видовой специфичностью. Например, в листьях однодольных растений наблюдается постоянный рост, интенсивность

которого варьируется в зависимости от времени суток. В отличие от однодольных двудольные растения растут, главным образом, ночью [2]. В какой степени эти различия определяются кинетикой клеточных популяций, остается неясным. Предполагается, что ограниченный период роста у двудольных отражает высокую степень синхронизации клеточных процессов, которые контролируются генетическими и эпигенетическими механизмами.

Цель данной работы – изучение взаимосвязи между суточным ритмом роста листьев стручкового перца (*Capsicum annuum* L.) и пролиферативной активностью образующих этот орган клеток.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили растения перца сорта Алеся, которые выращивали на универсальном грунте в стандартных лабораторных условиях в контейнерах размером $15 \times 11 \times 7$ см по 5–7 штук. Мониторинг роста проводили с помощью метода, основанного на компьютерном анализе изображений [3].

Мониторинг начинали после появления у растений 3–4 листков при средней высоте проростков 5–8 см. Съемку проводили при следующих условиях: температура 18–20 °С, относительная влажность 50 %. Режим освещения – 12 ч день и 12 ч ночь. Дневной режим начинался в 8.00 и заканчивался в 20.00. В этом режиме растения освещали лампой дневного света (освещенность 75 лк). В ночном режиме растения подсвечивали лампой накаливания с темно-красным фильтром (освещенность 30 лк). Каждый цикл съемки начинали в период 17.00–18.00 и завершали на следующие сутки в это же время. Интервал между снимками составлял 3 мин. Всего в одном цикле мониторинга получали 480 кадров.

Обработка изображений включала два этапа. На первом измеряли площадь проекции листьев и другие параметры, зависящие от их размеров с помощью программы ImageJ [4]. На втором этапе полученные данные обрабатывали в программной системе Octave v.5.1.0. Сначала кривые суточного роста листьев выравнивали по 18.00 и сглаживали для устранения помех, затем вычисляли производную для получения кривой прироста. В каждом эксперименте было использовано от 6 до 9 растений.

Измерение относительного содержания ДНК в клетках проводили с помощью разработанной нами методики. Процедура изготовления цитологических препаратов была следующей:

1. Участок листа растения площадью около 1 см^2 помещали в чашку Петри с охлажденным лизирующим раствором (0,1 М лимонная кислота и 0,5 % тритон X100) объемом 3–6 мл.

2. Нарезали его на кусочки размером 1–3 мм и выдерживали в буферном растворе 40 мин для лизиса клеток и выхода клеточных ядер.

3. Полученную суспензию очищали от целых клеток, пропуская несколько раз через нейлоновые фильтры с диаметром пор от 120 до 60 мкм.

4. Для удаления клеточного детрита суспензию центрифугировали при 1200 об/мин в течение 25 мин в лабораторной центрифуге, после чего супернатант удаляли.

5. Осадок ресуспендировали, переносили в пробирку объемом 1,5 мл и фиксировали, добавляя 70%-ный этанол до конечной концентрации 40 %. Время фиксации – 20 мин.

6. Полученную суспензию клеточных ядер перемешивали с помощью вортекса и пробу объемом 20 мкл помещали на предметное стекло. К ней добавляли такой же объем водного раствора бромистого этидия в концентрации 20 мкг/мл. Через 10 мин препарат накрывали покровным стеклом.

Готовые препараты исследовали в флуоресцентном микроскопе Eclipse50i (Nikon). Микрофотографии клеточных ядер получали, используя объектив с 20-кратным увеличением и цифровую телекамеру DigitalSpot-5Mc. На микрофотографиях флуоресцирующих клеточных ядер при помощи программы ImageJ измеряли их интегральную яркость (параметр Integrated Density), которая пропорциональна относительному содержанию ДНК.

Компьютерная обработка ДНК-цитогамм проводилась с помощью системы Octave. В качестве примера представлены результаты обработки ДНК-цитогамм образца 2.

Сначала их интерполировали кубическим сплайном, затем аппроксимировали двумя нормальными распределениями [5]. В качестве начальных параметров задавали средние и стандартные отклонения, соответствующие диплоидному и тетраплоидному уровням ДНК. Площадь под полученными кривыми принимали равной доле клеток в G0/G1- и G2/M-периодах клеточного цикла [6]. Для статистической обработки использовали программу Statistica v.10.

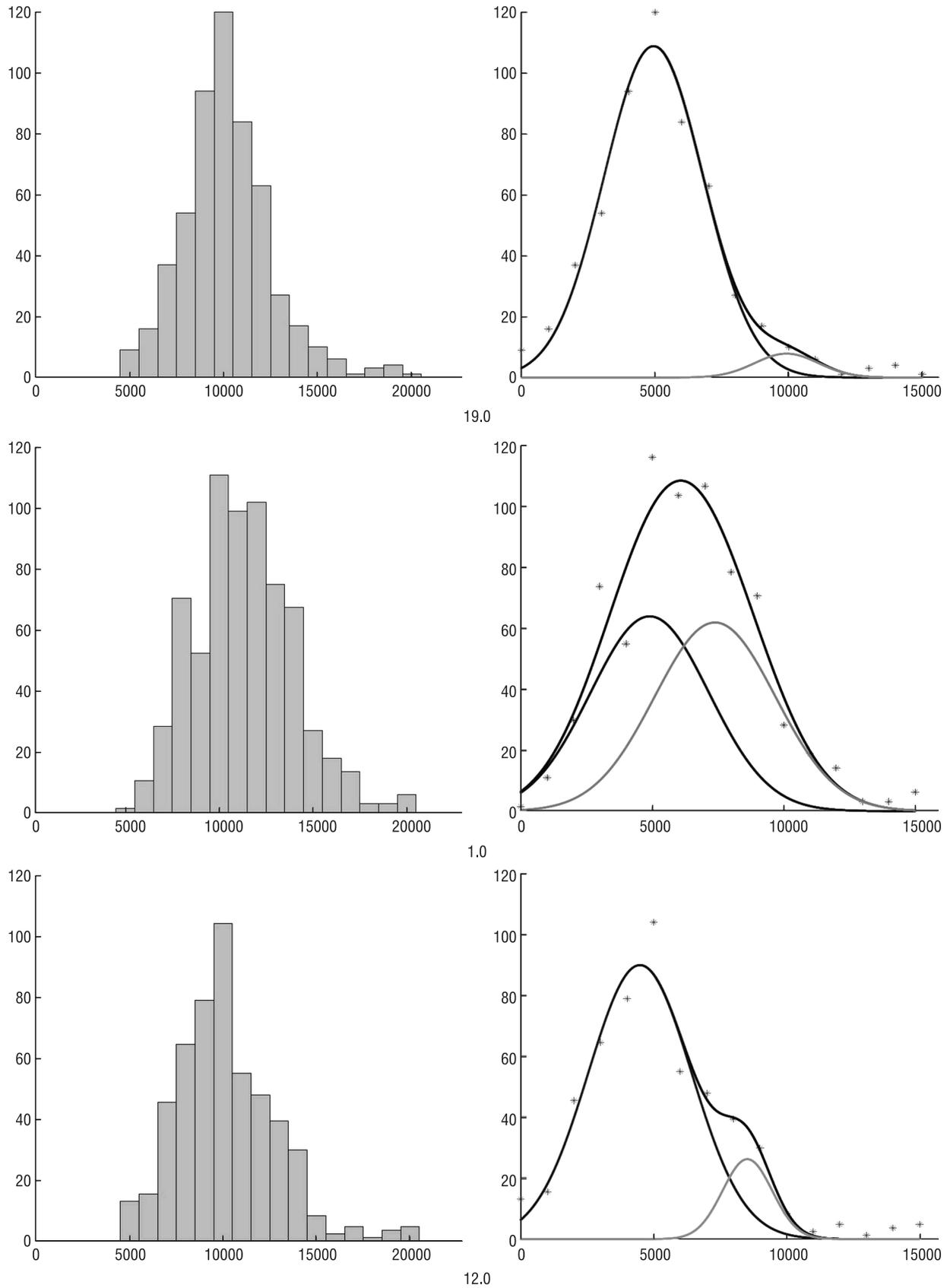


Рис. 1. ДНК-цитогаммы и соответствующий пролиферативный статус клеток у образца 2: темная линия – G0/G1, светлая линия – G2/M, огибающая интерполирует гистограмму (ее столбцы обозначены *)

Fig. 1. DNA cytograms and the corresponding proliferative status of cells in sample 2: dark line – G0/G1, light line – G2/M, envelope graph interpolates the histogram (its columns are marked *)

Результаты и их обсуждение. Динамика суточного роста листьев растений стручкового перца представлена на рис. 2, *a*. На нем показаны две кривые: первая из них (серая линия) отражает фактические изменения среднего размера листьев, тогда как вторая (темная линия) – результат сглаживания первой кривой (он необходим для последующего расчета прироста). На оси абсцисс указано время после начала эксперимента в часах (фактическое время начала – 18.00). На оси ординат показан средний размер листа в 1 мм^2 .

В начале эксперимента регистрировали активные движения листьев. Приблизительно через 2 ч после перевода освещения в ночной режим они прекращались. В условиях ночного режима освещения наблюдалось устойчивое увеличение средних размеров листа, которое заканчивалось к 15-му часу от начала эксперимента.

Полученная путем дифференцирования кривая прироста (рис. 2, *b*) еще более показательна. Она свидетельствует, что начало и окончание процесса роста (точки пересечения кривой с осью абсцисс) соответствуют началу и окончанию ночного режима освещения.

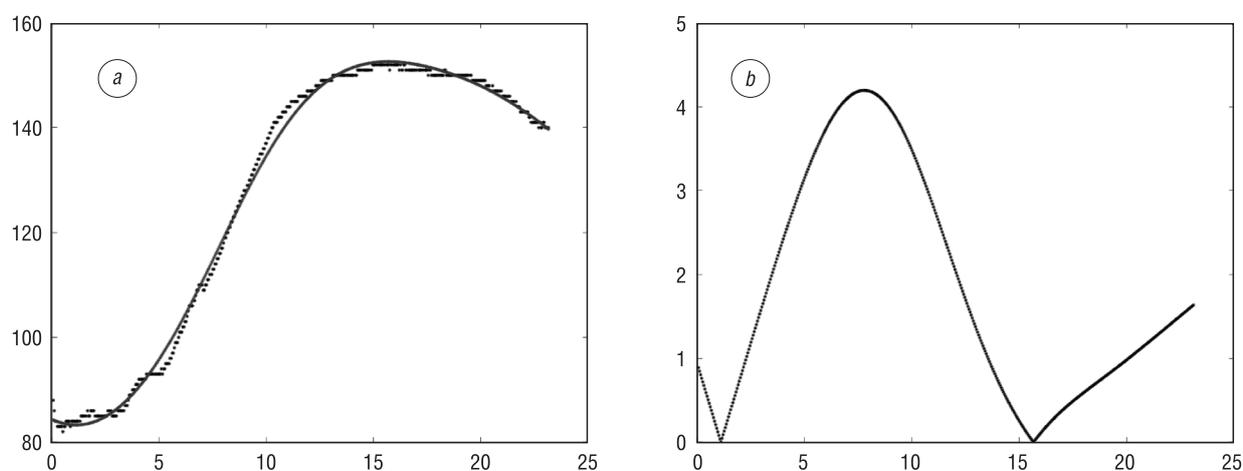


Рис. 2. Динамика суточного роста (*a*) и прироста (*b*) листьев стручкового перца: ось X – время в часах от начала наблюдения (18.00), ось Y – средняя площадь листа в мм^2 (*a*) и средний прирост в $\text{мм}^2/\text{ч}$ (*b*)

Fig. 2. Dynamics of diel growth (*a*) and its tempo (*b*) of capsicum leaves: X -axis – time in hours from the beginning (18.00), Y -axis – average leaf area in мм^2 (*a*) and $\text{мм}^2/\text{h}$ (*b*)

Измерение относительного содержания ДНК в клетках листьев стручкового перца проводилось для того, чтобы оценить их пролиферативную активность. Результаты статистической обработки полученных данных представлены в табл. 1.

Из представленных данных следует, что у всех образцов содержание ДНК в клетках в 1.00 достоверно выше, чем в 19.00 и 12.00. У образцов 1, 2 и 5 между 19.00 и 12.00 статистически достоверные различия в содержании ДНК отсутствуют, тогда как у образцов 3, 4 и 6 они минимальны. Таким образом, в ночном режиме освещения в клетках листьев стручкового перца регистрируется увеличение относительного количества ДНК.

Для оценки пролиферативного статуса клеток ДНК-цитогаммы были разделены на отдельные компоненты, которые соответствовали G1- и G2-периодам клеточного цикла. Аппроксимация выполнялась в системе Octave с помощью разработанных нами программ, основанных на методах нелинейной оптимизации. Полученные результаты представлены ниже (табл. 2).

Из полученных данных следует, что в 19.00 у 4 образцов из 6 (№ 1, 2, 3, 6) большинство клеток находилось в G1-периоде клеточного цикла. У оставшихся двух образцов (№ 4 и № 5) клетки распределялись по клеточному циклу равномерно. Среднее соотношение числа клеток G2/G1 для всех образцов составило $0,637 \pm 0,155$.

В 1.00 у 5 образцов из 6 клетки концентрировались в G2-периоде. Исключение составил образец № 2, у которого клетки распределялись равномерно. Учитывая, что в 19.00 у этого образца большинство клеток находилось в G1-периоде, можно констатировать переход у него части клеток из G1- в G2-период. Соотношение числа клеток G2/G1 в 1.00 достигло $1,458 \pm 0,167$.

Т а б л и ц а 1. Относительное содержание ДНК в клетках листьев стручкового перца в различное время суток

T a b l e 1. Relative DNA content of capsicum leaf cells at different times of the day

Номер образца	Время суток	Ср. значение интенсивности флуоресценции бромида этидия \pm SD, усл. ед.	Достоверность различий относительного содержания ДНК в изученные временные периоды		
			19.00–1.00	1.00–12.00	19.00–12.00
1	19.00	9857,15 \pm 2557,31			
	1.00	11 159,20 \pm 2775,18	$t = 4,9928$	$t = -4,0907$	$t = 1,4223$
	12.00	10 101,17 \pm 2321,66	$p = 0,0000$	$p = 0,0000$	$p = 0,1558$
2	19.00	10 578,91 \pm 4073,92			
	1.00	12 079,48 \pm 4518,18	$t = 5,2172$	$t = -6,1746$	$t = 0,0866$
	12.00	10 591,61 \pm 3340,95	$p = 0,0000$	$p = 0,0000$	$p = 0,9310$
3	19.00	10 666,99 \pm 3507,45			
	1.00	13 348,22 \pm 4619,67	$t = 10,4470$	$t = -7,7971$	$t = 2,4000$
	12.00	10 993,35 \pm 3442,46	$p = 0,0000$	$p = 0,0000$	$p = 0,0169$
4	19.00	12 378,50 \pm 4915,89			
	1.00	12 757,69 \pm 4698,43	$t = 1,6750$	$t = -6,0602$	$t = -3,7323$
	12.00	11 080,79 \pm 3288,39	$p = 0,0945$	$p = 0,0000$	$p = 0,0002$
5	19.00	11 361,47 \pm 3865,38			
	1.00	13 853,67 \pm 5276,24	$t = 8,0288$	$t = -9,1021$	$t = 0,5332$
	12.00	11 427,27 \pm 3662,82	$p = 0,0000$	$p = 0,0000$	$p = 0,5941$
6	19.00	11 349,53 \pm 3998,41			
	1.00	12 776,71 \pm 4461,57	$t = 4,8026$	$t = -5,7826$	$t = -2,9497$
	12.00	10 879,04 \pm 3309,16	$p = 0,0000$	$p = 0,0000$	$p = 0,0033$

Пр и м е ч а н и е. Статистически достоверные различия выделены подчеркиванием.

Т а б л и ц а 2. Распределение клеток листьев стручкового перца по периодам клеточного цикла в зависимости от времени суток

T a b l e 2. Distribution of capsicum leaf cells by cell cycle periods on the time of the day

№ образца	19.00			1.00			12.00		
	G1	G2	G2/G1	G1	G2	G2/G1	G1	G2	G2/G1
1	91,7	8,3	0,091	31,35	68,65	2,19	95,87	4,12	0,043
2	70,53	29,47	0,408	49,98	50,02	1,001	73,69	26,31	0,351
3	63,92	36,08	0,562	38,93	61,07	1,564	59,46	40,54	0,667
4	46,24	53,76	1,174	45,93	54,07	1,174	64,53	35,47	0,538
5	52,41	47,59	0,923	41,92	58,08	1,381	52,62	47,38	0,887
6	60,36	39,64	0,667	41,32	58,68	1,439	60,09	39,91	0,667
Среднее	64,19	35,81	0,637	41,57	58,43	1,458	67,71	32,29	0,525
Ст. откл.	15,95	15,95	0,381	6,34	6,34	0,411	15,44	15,44	0,294

К 12.00 у всех образцов большинство клеток вернулось в период G1. Соотношение G2/G1 в этот срок составило $0,525 \pm 0,121$. Поэтому можно предположить, что ночью клетки перешли из G1- в G2-период клеточного цикла, а затем вернулись в исходное состояние в результате деления. Наиболее наглядно этот переход виден на диаграмме (рис. 3), построенной на основании данных табл. 2. Согласно критерию Стьюдента для зависимых выборок, соотношение G2/G1 в 1.00 достоверно отличается от этого показателя для 19.00 ($t = 4,05$; $p < 0,01$) и 12.00 ($t = 8,92$; $p < 0,001$). С другой стороны, в 19.00 и 12.00 эти соотношения не различались между собой ($t = 0,92$; $p = 0,4$).

У двудольных растений известны два типа суточного роста [7–9]. Для первого из них характерен максимальный рост листьев в конце ночи или рано утром. Этот тип роста наблюдается, в частности, у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), клещевины (*Ricinus communis*) и табака (*Nicotiana tabacum*). Ко второму типу относятся растения с максимальным ростом листьев вечером или в начале ночи. Этот тип роста описан у сои (*Glycine max*), подсолнечника (*Helianthus*

annuus), томата (*Lycopersicon esculentum*), а такжэ у некаторых дрэвьев – березы (*Betula*), клена (*Acer*) і тополя (*Populus*).

Динамика суточного росту лісьев стручкового перца (*Capsicum annuum* L.) раньне не изучалась. Нами ўстаноўлена, што ўстойчывы рост лісьев у гэтага віда наблідаецца ночью, прычём максымальны прырост прыходзіцца на першую яе паловіну. Следзаватэльна, стручковы перец адносіцца к расьтэням со вторым тыпам суточного росту.

Рост лісьев у двудольных расьтэнь кнтралюецца спецыяльнымі генамі, котрыя фармірують тры регуляторных контура. Они согласуют процессы, идущие в ткани листа на клеточном уровне, с колебаниями абиотических факторов внешней среды. Отрицательные обратные связи контуров настроены на период в 24 ч и синхронизируются светом и температурой [2]. Роль внутренних и внешних факторов, регулирующих рост растений, является предметом дискуссий [9]. Согласно полученным нами данным, процесс роста листьев у стручкового перца зависит от режима освещения. Как следует из полученных данных, активный рост листьев наблюдался в период 1–15 ч от начала эксперимента, что соответствовало ночному режиму. Обращает на себя внимание также снижение средней величины листьев в конце мониторинга, что можно объяснить их движением. Согласованность роста и движения листьев, а также зависимость этих процессов от режима освещения была показана недавно у арабидопсиса [10].

Суточный ритм пролиферации клеток был исследован путем измерения относительного содержания ДНК в клеточных ядрах. Первоначально этот метод был разработан для проточной цитометрии [11], однако нами он был адаптирован и для обычной флуоресцентной микроскопии. В данном сообщении представлен последний вариант методики выделения клеточных ядер, который позволяет получить цитологические препараты улучшенного качества.

Согласно модели клеточного цикла, ДНК-цитогарма должна иметь два пика: первый из них соответствует G0/G1-клеткам, относительное содержание ДНК у которых равно 2С (удвоенному количеству ДНК, приходящемуся на гаплідный набор хромосом данного вида), тогда как второй – G2/М-клеткам, содержание ДНК у которых в 2 раза больше и соответствует 4С. Между двумя пиками в цитогарме располагаются клетки, в которых идет синтез ДНК, и поэтому ее содержание варьируется от 2С до 4С. В действительности форма ДНК-цитогармы отличается от идеальной, причинами чего являются гетерогенность клеточной популяции, различия в эффективности связывания флуорохрома с ДНК, ошибки прибора на различных этапах формирования изображения и т. п. В связи с этим ДНК-цитогарму предлагается рассматривать как результат свертки идеального распределения клеток по количеству ДНК с функцией уширения [12]. Если принять, что природа функции уширения является случайной, в качестве такой функции правомерно использовать нормальное распределение. Тогда ДНК-цитогарму можно представить как наложение двух нормальных распределений, средние значения которых соответствуют относительному содержанию ДНК в G0/G1- и G2/М-периодах клеточного цикла.

Для обработки ДНК-цитогарм нами использовался функциональный аналог MatLab – свободно распространяемая программная система Octave. С ее помощью проводили построение и интерполяцию ДНК-цитогарм, их аппроксимацию, а также вычисление интегралов, соответствующих доле клеток в каждом из периодов клеточного цикла. При этом использовались различные способы оптимизации, включая метод касательных Ньютона, модифицированный симплекс-метод Нелдера-Мида и метод наименьших квадратов. Наилучшие результаты по качеству аппроксимации были получены с помощью метода касательных. Применение этого метода требует лишь приблизительного задания начальных условий, а кроме того, он дает

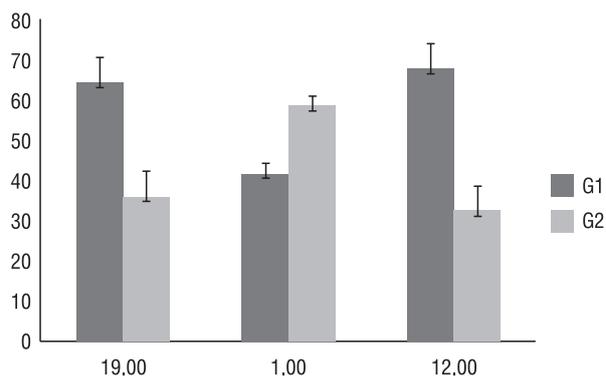


Рис. 3. Проліферативны статус клетак ліста у стручкового перца в разлічнае время сутак (средняя доля клеток в G1- или G2-периоде ± средняя квадратичная ошибка)

Fig. 3. Proliferative status of leaf cells in capsicum at different times of the day (average cell fraction in G1- or G2-period ± mean square error)

и более устойчивое решение. Если средние и стандартные отклонения известны (например, при калибровке по стандартам), наиболее точные результаты можно получить методом наименьших квадратов.

Аппроксимация ДНК-цитогамм нормальными распределениями и вычисление на этой основе доли клеток, находящихся в G0/G1- или G2/M-периодах клеточного цикла, позволяют заключить, что пролиферативная активность клеток листьев была значительно выше в 1.00 по сравнению с этим же показателем в 19.00 или в 12.00 (рис. 3). Несмотря на то что растения, по-видимому, отличались величиной ростовой фракции (это следует из данных, представленных в табл. 2), общая тенденция вполне очевидна – клетки листьев этого вида в условиях эксперимента пролиферировали, главным образом, ночью.

Сопоставляя данные, полученные при изучении ритма роста листьев у стручкового перца (рис. 2) и пролиферативной активности образующих этот орган клеток (рис. 3), можно предположить, что усиленный рост экспериментальных растений в ночной период был обусловлен, главным образом, синхронной пролиферацией клеток. Фактором, обеспечивающим синхронизацию клеток по клеточному циклу, а следовательно, и усиленный рост листьев, являлся, вероятно, переход от дневного режима освещения к ночному.

Выводы

1. У стручкового перца (*Capsicum annuum* L.) период усиленного роста листьев наблюдается в ночное время. Таким образом, этот вид относится ко второму типу суточного роста двудольных растений, который отличается максимальным приростом вечером или в начале ночи.

2. Исследование клеток листьев стручкового перца с помощью цитометрии ДНК показывает, что их пролиферативная активность ночью выше, чем днем.

3. Сопоставление динамики роста листьев и пролиферативной активности образующих этот орган клеток позволяет предположить, что у данного вида суточный ритм роста листьев обусловлен синхронизацией клеточного цикла освещением.

Список использованных источников

1. Sablowski, R. Interplay between cell growth and cell cycle in plants / R. Sablowski, M. C. Dornelas // J. Exp. Bot. – 2014. – Vol. 65, N 10. – P. 2703–2714. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert354>
2. The importance of the circadian clock in regulating plant metabolism / J. A. Kim [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18, N 12. – P. 2680. <https://doi.org/10.3390/ijms18122680>
3. Коломиец, О.О. Динамика суточного роста листьев томата и перца при различных условиях освещения / О.О. Коломиец, С.В. Глушен // Журн. Бел. гос. ун-та. Биология. – 2019. – № 1. – С. 73–78.
4. Schneider, C.A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri // Nat. Meth. – 2012. – Vol. 9, N 7. – P. 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
5. O’Haver, T. Pragmatic introduction to signal processing / T. O’Haver. – College Park : Univ. of Maryland, 2019. – 459 p.
6. Fiorani, F. Quantitative analyses of cell division in plants / F. Fiorani, G. T. S. Beemster // Plant Mol. Biol. – 2006. – Vol. 60, N 6. – P. 963–979. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-4065-2>
7. Matsubara S., Living in day-night cycles – specific diel leaf growth patterns and the circadian control of photomorphogenesis / S. Matsubara, A. Walter // Progress in Botany. – 2007. – N 68. – P. 288–314. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36832-8_13
8. Diel time-courses of leaf growth in monocot and dicot species: endogenous rhythms and temperature effects / R. Poiré [et al.] // J. Exp. Bot. – 2010. – Vol. 61, N 6. – P. 1751–1759. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq049>
9. Diel patterns of leaf and root growth: endogenous rhythmicity or environmental response? / T. Ruts [et al.] // J. Exp. Bot. – 2012. – Vol. 63, N 9. – P. 3339–3351. <https://doi.org/10.1093/jxb/err334>
10. Differentially phased leaf growth and movements in *Arabidopsis* depend on coordinated circadian and light regulation / T. Dombusch [et al.] // Plant Cell. – 2014. – Vol. 26, N 10. – P. 3911–3921. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129031>
11. Galbraith, D.W. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future / D.W. Galbraith // Biomedica. – 2012. – N 30. – P. 65–70. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i0.824>
12. Особенности цитометрических методов определения содержания ДНК в ядре / Ю.Г. Пичугин [и др.] // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 185–190.

References

1. Sablowski R., Dornelas M. C. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2014, vol. 65, no. 10, pp. 2703–2714. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert354>
2. Kim J. A., Kim H.-S., Choi S.-H., Jang J.-Y., Jeong M.-J., Lee S. I. The importance of the circadian clock in regulating plant metabolism. *International Journal of Molecular Science*, 2017, vol. 18, no. 12, p. 2680. <https://doi.org/10.3390/ijms18122680>

3. Kolomiets O. O., Glushen S.V. The dynamics of diel growth of tomato and capsicum leaves with different lighting modes. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Journal of the Belarusian State University. Biology*, 2019, no. 1, pp. 73–78 (in Russian).
4. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 2012, vol. 9, no. 7, pp. 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
5. O’Haver T. *Pragmatic introduction to signal processing*. College Park, University of Maryland, 2019. 459 p.
6. Fiorani F., Beemster G. T. S. Quantitative analyses of cell division in plants. *Plant Molecular Biology*, 2006, vol. 60, no. 6, pp. 963–979. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-4065-2>
7. Matsubara S., Walter A. Living in day-night cycles – specific diel leaf growth patterns and the circadian control of photomorphogenesis. *Progress in Botany*, 2007, vol. 68, pp. 288–314. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36832-8_13
8. Poiré R., Wiese-Klinkenberg A., Parent B., Mielewicz M., Schurr U., Tardieu F., Walter A. Diel time-courses of leaf growth in monocot and dicot species: endogenous rhythms and temperature effects. *Journal of Experimental Botany*, 2010, vol. 61, no. 6, pp. 1751–1759. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq049>
9. Ruts T., Matsubara S., Wiese-Klinkenberg A., Walter A. Diel patterns of leaf and root growth: endogenous rhythmicity or environmental response? *Journal of Experimental Botany*, 2012, vol. 63, no. 9, pp. 3339–3351. <https://doi.org/10.1093/jxb/err334>
10. Dombusch T., Michaud O., Xenarios I., Fankhauser C. Differentially phased leaf growth and movements in *Arabidopsis* depend on coordinated circadian and light regulation. *Plant Cell*, 2014, vol. 26, no. 10, pp. 3911–3921. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129031>
11. Galbraith D.W. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future. *Biomédica*, 2012, vol. 30, pp. 65–70. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i0.824>
12. Pichugin Yu. G., Sem’yanov K. A., Chernyshev A. V., Pal’chikova I. G., Omel’yanchuk L. V., Mal’tsev V.P. Nucleus DNA content measurement methods features. *Tsitologiya = Cytology*, 2012, vol. 54, no. 2, pp. 185–190 (in Russian).

Информация об авторах

Коломиец Олег Олегович – аспирант. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oleg_inna.90@mail.ru

Глушен Сергей Витальевич – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sgloush@gmail.com

Information about the authors

Oleg O. Kolomiets – Postgraduate student. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oleg_inna.90@mail.ru

Sergey V. Gloushen – Ph. D. (Biol.), Assistant professor. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sgloush@gmail.com

Т. Н. Куделина¹, А. В. Константинов², Л. В. Обуховская¹, О. В. Молчан¹

¹Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА МИКРОКЛОНОВ *POPULUS TREMULA* L. И *BETULA PENDULA* ROTH. ПРИ LED-ОСВЕЩЕНИИ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ *EX VITRO*

Аннотация. Исследованы особенности влияния LED-освещения с варьируемыми соотношениями физиологически значимых спектральных диапазонов (красный/синий (К/С), красный/(синий + зеленый) (К/(С + З)), красный/дальний красный (К/ДК)) на формирование фотосинтетического аппарата микроклонально размноженных растений осины обыкновенной (*Populus tremula* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth.) при адаптации *ex vitro*. У регенерантов осины наблюдались стимуляция образования метамеров и увеличение диаметра стебля при LED-освещении, в то время как у березы данные эффекты были выражены слабо. У растений-регенерантов осины и березы наблюдали снижение содержания фотосинтетических пигментов в условиях LED-освещения с меньшим уровнем синего света в спектре и большим – красного. Площадь листьев регенерантов березы практически не зависела от спектрального состава LED-освещения, в то время как у осины она была тем больше, чем ниже был уровень синего света и чем выше – уровень красного. Полученные результаты свидетельствуют о видовой специфичности восприятия древесными растениями-регенерантами при адаптации *ex vitro* света разных длин волн и их соотношений, что указывает на необходимость индивидуального режима освещения для каждого вида растений.

Ключевые слова: микроклональное размножение, растения-регенеранты, адаптация, светодиодное освещение, фотосинтетические пигменты, метамеры, сухое вещество, *Populus tremula*, *Betula pendula*

Для цитирования: Особенности формирования фотосинтетического аппарата микроклонов *Populus tremula* L. и *Betula pendula* Roth. при LED-освещении различного спектрального состава в процессе адаптации *ex vitro* / Т. Н. Куделина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. ботаника. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 456–466. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-456-466>

T. N. Kudelina¹, A. V. Konstantinov², L. V. Obukhovskaya¹, O. V. Molchan¹

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

²Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

FEATURE OF FORMATION OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF MICROCUTTINGS OF *POPULUS TREMULA* L. AND *BETULA PENDULA* L. AT LED-LIGHTING OF VARIOUS SPECTRAL COMPOSITION DURING *EX VITRO* ADAPTATION

Abstract. The peculiarities of the influence of LED-lighting of different spectral composition with varying ratios of physiologically significant spectral ranges on biometric parameters and the pigment composition of the leaf plate of microclonally propagated aspen (*Populus tremula* L.) and birch (*Betula pendula* Roth.) plants were identified during the adaptation *ex vitro*, which indicate the species specificity of plants response to the illumination spectrum.

Keywords: micropropagation woody plants, *ex vitro* adaptation, LED lighting, photosynthetic pigments, metamers, dry matter, *Populus tremula*, *Betula pendula*

For citation: Kudelina T. N., Konstantinov A. V., Obukhovskaya L. V., Molchan O. V. Feature of formation of photosynthetic apparatus of microcuttings of *Populus tremula* L. and *Betula pendula* Roth. at LED-lighting of various spectral composition during *ex vitro* adaptation. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 456–466 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-456-466>

Введение. Изменение климата оказывает значительное влияние на продуктивность, породный состав и биоразнообразие лесных экосистем, вызывает риски возникновения пожаров, ветровалов и буреломов, массового размножения вредителей в лесах. Поэтому крайне важным является решение проблем формирования оптимальной структуры леса, в том числе нормализа-

ции баланса между потреблением и воспроизводством древесной фитомассы [1]. В связи с этим высокую актуальность приобретают вопросы создания лесных плантаций из быстрорастущих пород деревьев, в частности из представителей родов *Populus* и *Betula* [2].

Осина обыкновенная (*Populus tremula* L.) является ценным сырьем для целлюлозно-бумажной промышленности, топливно-энергетического комплекса и строительной отрасли. Она характеризуется повышенной скоростью роста, что позволяет создавать специализированные плантации и получать качественную древесину в 1,5–2,0 раза быстрее, чем при ее естественном возобновлении в природных экосистемах [2]. Береза повислая (*Betula pendula* Roth.) занимает важное место в лесной отрасли стран Северной и Восточной Европы, в том числе в Беларуси, где доля насаждений с ее участием составляет около 23 %. Береза повислая характеризуется высокой продуктивностью и менее, чем осина, подвержена заболеваниям, поэтому ее также следует использовать в плантационном лесовыращивании [3].

Метод клонального микроразмножения древесных культур для создания лесных плантаций становится все более востребованным, так как позволяет в короткие сроки получить большое количество посадочного материала высокого качества. Кроме того, часто одним из основных препятствий в производстве лесных культур осины является ее поражение патогенными организмами, приводящими к развитию сердцевинных гнилей ствола. Эту проблему можно решить, используя посадочный материал, полученный методом микроклонального размножения деревьев, имеющих устойчивость к заболеваниям.

При этом широкомасштабное внедрение этой технологии ограничено тем, что растения-регенеранты трудно приживаются в условиях адаптации *ex vitro*. Проблемы адаптации микроклонально размноженных растений во многом обусловлены условиями культивирования *in vitro*: стерильностью, высокой влажностью, низким уровнем освещения, миксотрофным способом питания, наличием в питательных средах фитогормонов и др. В результате формируются растения со специфическими морфологией и метаболизмом (так называемый «культуральный» фенотип) [4, 5]. Такие приспособительные реакции микроклонально размноженных регенерантов соответствуют условиям выращивания *in vitro*, но создают проблемы при адаптации *ex vitro*. Низкое содержание в листьях растений-регенерантов кутикулярного воска и слабо развитая хлорофилл-апробинная система приводят к потере большого количества воды и необратимому обезвоживанию [4]. Формирующаяся в условиях *in vitro* корневая система регенерантов часто характеризуется отсутствием корневых волосков, а устьичный аппарат имеет низкую активность, поэтому у растений слабая водопоглощающая способность, что также отрицательно сказывается на их адаптации *ex vitro* [4]. При смене субстрата выращивания (с агарового, содержащего сахарозу, на почвогрунт) и условий освещения растения-регенеранты вынуждены переходить с миксотрофного на фототрофный способ питания, для чего требуются временные и энергетические затраты [5]. Поэтому для успешной адаптации микроклонально размноженных растений-регенерантов необходимо ускорить формирование у них фенотипа, устойчивого к изменению условий освещения и влажности воздуха. Очевидно, что при переходе на фототрофное питание особенно важным является развитие фотосинтетического аппарата (ФСА), обеспечивающего как поглощение света, так и трансформацию его энергии в энергию химических связей. Система ФСА является сложно организованной и может быть охарактеризована на разных уровнях: от молекулярного (фотосинтетические пигменты, компоненты электрон-транспортной цепи) до уровня листа как специализированного органа фотосинтеза. Немаловажную роль играет также образование проводящих систем, обеспечивающих транспорт ассимилятов между донорными и акцепторными органами.

Одним из ключевых стимулов, влияющих на морфогенез и формирование ФСА растений-регенерантов, является спектральный состав освещения. Растения воспринимают свет через систему основных белков-фоторецепторов: фитохромов (красный (К) и дальний красный (ДК) свет), криптохромов и фототропинов (синий (С), зеленый (З), ультрафиолетовый (УФ-А) [6–8]. Благодаря фоторецепторам и взаимодействиям между ними растения определенным образом реагируют на качество и количество света через активацию сигнальных систем и путей трансдукции световых сигналов. В результате регулируется синтез фотосинтетических пигментов, биогенез хлоропластов, создаются форма и ультраструктура листовой пластинки.

Наиболее эффективные источники света для регуляции морфогенеза растений могут быть созданы на основе светодиодов (LED – Light-Emitting Diodes). Использование LED позволяет создавать уникальные спектральные композиции для точного управления физиологическими реакциями в зависимости от целей и задач культивирования конкретного вида растения, в том числе регулировать формирование ФСА для оптимизации ростовых и адаптационных процессов [9, 10]. В настоящее время считается общепризнанным, что растениям для нормального функционирования недостаточно только красного или синего света (наиболее эффективных для фотосинтеза) – необходимо полнспектральное освещение. Однако вопрос о том, каким должно быть соотношение физиологически значимых спектральных диапазонов (К/С, К/(С + З), К/ДК), все еще открыт, так как растения обладают сложными механизмами фоторецепции, а их существование обеспечивается не только фотосинтетическими, но и фотоморфогенетическими процессами, регулируемые с помощью света разных длин волн и их соотношений.

Цель данной работы – установить особенности влияния LED-освещения различного спектрального состава с варьируемыми соотношениями физиологически значимых спектральных диапазонов на формирование фотосинтетического аппарата микроклонально размноженных растений осины обыкновенной и березы повислой в период их адаптации к условиям *ex vitro*.

Объекты и методы исследования. Для исследований были использованы микроклонально размноженные растения осины обыкновенной (клон V22) и березы повислой (клон 31) из коллекции Института леса НАН Беларуси [11]. V22 является одним из клонов осины белорусской селекции, относящийся к быстрорастущей зеленокорой форме с повышенной устойчивостью к поражению трутовыми грибами [11]. Микроклоны культивировали *in vitro* на агаризованной питательной среде, содержащей макроэлементы WPM с добавлением микроэлементов и витаминов по прописи состава MS и 30 г·л⁻¹ сахарозы, без фитогормонов, в течение 30 сут при люминесцентном (Luminescent Lamp – LL, контроль) и LED-освещении (400–800 нм) с различным содержанием квантов синей, красной, зеленой и дальней красной областей в спектре при плотности потока фотонов (ППФ) 15 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и температуре 23 ± 1 °С [12].

Адаптацию к условиям *ex vitro* проводили в торфяном субстрате Terra Vita (ЗАО «МНПП «Фарт»», Россия) при тех же вариантах освещения, но с увеличением ППФ до 150 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ (табл. 1). LED-облучатели были изготовлены в Центре светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси по техническому заданию Института экспериментальной ботаники НАН Беларуси [13].

Адаптация стерильных микроклональных регенерантов к нестерильным условиям роста до высадки растений в открытый грунт на постоянное место культивирования включала три этапа [11]:

- 1) 1–14-е сутки – микроклональные саженцы, высаженные в заполненные субстратом емкости, выращивали в климатоканере при влажности воздуха 80–90 %, температуре 21–23 °С, фотопериоде 16/8 ч.
- 2) 15–30-е сутки – влажность воздуха в климатоканере снижали до 50–60 %, остальные условия не изменяли.
- 3) 31–60-е сутки – влажность воздуха в климатоканере снижали до 30–40 %, остальные условия не изменяли.

Т а б л и ц а 1. Характеристика вариантов освещения

T a b l e 1. Characteristics of lighting options

Характеристика облучателей	LL	LED 1	LED 2	LED 3	
Плотность потока фотонов (ППФ), %	400–499 нм	27,5	34,9	21,4	14,7
	500–599 нм	20,9	14,5	14,5	14,6
	600–699 нм	48,6	38,9	52,9	59,2
	700–800 нм	3,1	11,7	11,3	11,5
Соотношение частей спектра	К/С	1,8	1,0	2,5	4,0
	К/(С+З)	1,0	0,8	1,5	2,0
	К/ДК	15,7	3,3	4,7	5,1

В течение периода адаптации оценивали высоту, количество и длину междоузлий, площадь листьев, диаметр стебля. Определение концентрации фотосинтетических пигментов проводили согласно Wettstein [14]. Удельную поверхностную плотность листьев (УППЛ) рассчитывали как отношение сухой массы листа к его площади [15]. Вышеперечисленные показатели определяли в конце каждого этапа адаптации не менее чем у 20 растений каждого варианта. Для обработки экспериментальных данных использовали общепринятые методы биологической статистики, данные в таблицах

и на гистограммах приведены в виде средних арифметических значений со стандартными ошибками. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [16].

Результаты и их обсуждение. Хорошо известно, что правильно подобранное LED-освещение позволяет регулировать рост растений, их развитие, накопление биомассы, процессы фотоморфогенеза и фотосинтеза, что особенно важно при адаптации *ex vitro* микроклонально размноженных растений-регенерантов. Прежде всего необходимо установить спектральные характеристики освещения, оптимальные для формирования ФСА конкретного вида растения, в зависимости от стадии развития, условий и целей культивирования.

Выбор спектрального состава использованных в данной работе источников LED-освещения был основан на анализе литературных данных и результатах наших предыдущих исследований влияния света на рост и развитие растений, в том числе микроклонально размноженных регенерантов древесных и кустарниковых культур [10, 13]. Важным представлялось установить в спектре оптимальное соотношение длин волн в красном, дальнем красном и синем+зеленом диапазонах, адресованных фитохромной и криптохромной системам, которые наиболее эффективно способствуют развитию фотоморфогенетических процессов, в том числе формированию ФСА (табл. 1).

Одним из ключевых контролируемых фоторецепторами фотоморфогенетических ответов растения является изменение биометрических параметров: длины стебля, количества и длины междоузлий. При этом количество формирующихся метамеров опосредованно характеризует число закладывающихся листьев. Поэтому в данной работе было изучено влияние LL- (контроль) и LED-освещения на изменение длины стебля и междоузлий растений-регенерантов осины обыкновенной и березы повислой в процессе адаптации (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Биометрические показатели растений осины обыкновенной и березы повислой при адаптации в разных условиях освещения

Table 2. Biometric indicators of aspen and birch plants during the adaptation in various lighting conditions

Параметр	Этап адаптации	Осина обыкновенная				Береза повислая			
		LL	LED 1	LED 2	LED 3	LL	LED 1	LED 2	LED 3
Длина стебля, см	1	6,8±0,42	5,3±0,34*	3,9±0,17*	5,3±0,34*	4,7±0,34	4,5±0,32	4,3±0,34	4,5±0,27
	2	12,5±0,53	14,1±0,56*	13,1±0,38	13,5±0,53	8,2±0,89	9,9±0,66	9,01±0,59	9,8±0,46
	3	16,5±1,47	25,1±2,28*	22,6±1,32*	25,0±1,37*	14,2±1,01	14,4±2,47	14,0±1,03	14,6±1,08
Прирост в высоту за 60 сут, см	1–3	13,9±1,53	22,9±2,27*	20,5±1,32*	22,6±1,42*	12,1±1,02	12,1±1,17	11,5±1,53	12,3±1,22
Длина междоузлий, см	1	0,7±0,03	0,6±0,04*	0,5±0,02*	0,6±0,035*	0,4±0,045	0,4±0,02	0,4±0,03	0,3±0,02
	2	0,9±0,03	0,9±0,04	0,6±0,03*	0,9±0,020	0,5±0,044	0,4±0,03	0,4±0,04	0,4±0,03
	3	1,1±0,06	1,3±0,09*	1,3±0,07*	1,3±0,070	0,8±0,067	0,9±0,10	0,7±0,10	0,7±0,07
Диаметр стебля, мм	3	2,1±0,13	3,5±0,13*	3,5±0,08*	3,4±0,11*	1,90±0,214	1,96±0,111	1,83±0,194	1,95±0,156

Примечание. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

В конце периода *in vitro* длина стебля и междоузлий у растений обоих видов достоверно не отличались даже при разных вариантах освещения, что, возможно, обусловлено низким уровнем ППФ ($15 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Так, например, длина стебля у микроклонов осины и березы составляла $2,3 \pm 0,12$ и $2,3 \pm 0,01$ см соответственно. На первом этапе адаптации прирост в высоту растений-регенерантов осины контрольного варианта составил $4,3 \pm 0,27$ см и был на 20–40 % больше, чем у растений, культивируемых при LED-освещении. На втором этапе после 30 сут культивирования *ex vitro* растения осины под светодиодными источниками света стали опережать по длине стебля растения контрольного варианта, и к 60-м суткам (этап 3) длина стебля у них была больше на 35–50 %. Прирост стебля растений осины в высоту к 60-м суткам адаптации составил в среднем 14 и 20–23 см при LL- и LED-освещении соответственно. При этом достоверных отличий в длине стебля при разных вариантах LED-освещения не отмечалось. Спектральный состав всех вариантов LED-освещения отличался от контрольного более высоким (в 3,7 раза) уровнем ДК света и, таким образом, более низким соотношением К/ДК. Также обращают на себя

внимание существенные различия длины стебля растений на всех этапах адаптации под облучателями LL и LED 2. Эти варианты освещения характеризуются наиболее близкими значениями уровня ППФ во всех областях ФАР, кроме ДК-диапазона и, соответственно, соотношения К/ДК (см. табл. 1). Обычно соотношение К/ДК в естественных условиях составляет 0,6–1,3, а его снижение приводит к эффекту «избегания тени» и увеличению высоты растений за счет удлинения междоузлий [17]. Хотя в данной работе соотношение К/ДК было больше 1 при всех вариантах освещения, его снижение привело к существенному увеличению длины стебля. Похожие эффекты отмечены также в работах других исследователей. Например, показано увеличение высоты растений *Petunia hybrida* и *Euphobia pulcherrima* в результате снижения соотношения К/ДК от 3,8 до 1 и от 5,7 до 1 соответственно [17–19].

Средняя длина междоузлий регенерантов осины под светодиодным освещением либо достоверно не отличалась (LED 1), либо была ниже (LED 2 (этапы 1–2), LED 3 (этап 2)) контроля. Увеличение длины междоузлий при всех вариантах LED-освещения по сравнению с контролем только на третьем этапе обусловлено, вероятно, затенением, возникающим в результате более активного образования метамеров, а следовательно, роста и развития листового аппарата.

Диаметр стебля растений осины при LED-освещении превышал в среднем в 1,8 раза этот показатель у растений контрольного варианта, что, возможно, свидетельствует о более развитой системе проводящих и механических тканей, лучшей обеспеченности растений водой и большей их устойчивости к повреждениям (табл. 2).

Реакция растений-регенерантов березы повислой на освещение с различным соотношением физиологически значимых спектральных диапазонов была менее выражена или отсутствовала (табл. 2). Достоверных отличий длины и диаметра стебля, а также длины междоузлий у растений-регенерантов березы повислой, культивируемых при освещении с различными спектральными характеристиками, не отмечалось на протяжении всего периода адаптации. Прирост стебля к 60-м суткам (этап 3) составил в среднем 12 см для всех вариантов, включая контрольный.

Таким образом, растения-регенеранты осины при LED-освещении характеризовались более высокими длиной и диаметром стебля и формировали больше метамеров. Рост растений березы не зависел от спектрального состава освещения (по крайней мере в исследованном диапазоне), от спектральных характеристик и соотношений длин волн.

Главным звеном сложной системы метаболизма, обеспечивающей рост и развитие растений, их адаптивный потенциал и продуктивность в соответствии с генетической программой развития и внешними условиями, являются процессы фотосинтеза и прежде всего формирование основных компонентов ФСА [20]. Ключевой компонент ФСА растений – фотосинтетические пигменты листьев. Нами определено их содержание в листьях растений-регенерантов *in vitro* перед пересадкой, а затем на разных этапах адаптации *ex vitro*. Установлено, что в листьях регенерантов осины при освещении LL, LED 1 и LED 2 количество хлорофиллов (Хл) и каротиноидов существенно увеличивалось в течение всего периода адаптации (рис. 1). Только под LED 3 облучателем (с максимальным содержанием красного света в спектре) на третьем этапе отмечено снижение содержания Хл и каротиноидов по сравнению с предыдущим этапом.

В листьях березы наблюдали рост содержания Хл только в течение первых двух этапов и существенное снижение – на третьем этапе адаптации *ex vitro* при всех вариантах освещения (рис. 2). Менее чувствительным к спектральному составу освещения оказался пул каротиноидов в листьях березы. При этом увеличение доли красного света в спектре (LED 3) приводило к снижению интенсивности роста содержания фотосинтетических пигментов в течение периода адаптации растений регенерантов обоих видов.

Установлено также более высокое содержание Хл *a*, Хл *b*, суммы Хл и каротиноидов в листьях растений обоих видов при освещении LED 1 (с наиболее высоким уровнем ППФ в диапазоне 400–500 нм) и в условиях *in vitro*, и в течение периода адаптации *ex vitro* по сравнению с другими LED-вариантами. Снижение уровня синего и увеличение уровня красного света в спектре светодиодного излучения (LED 2 и LED 3) приводило к уменьшению содержания фотосинтетических пигментов. При этом для регенерантов осины следует отметить более выраженные различия в количестве фотосинтетических пигментов в зависимости от спектрального состава LED-освещения. При сравнении вариантов LL и LED 2 выявлено достоверное снижение

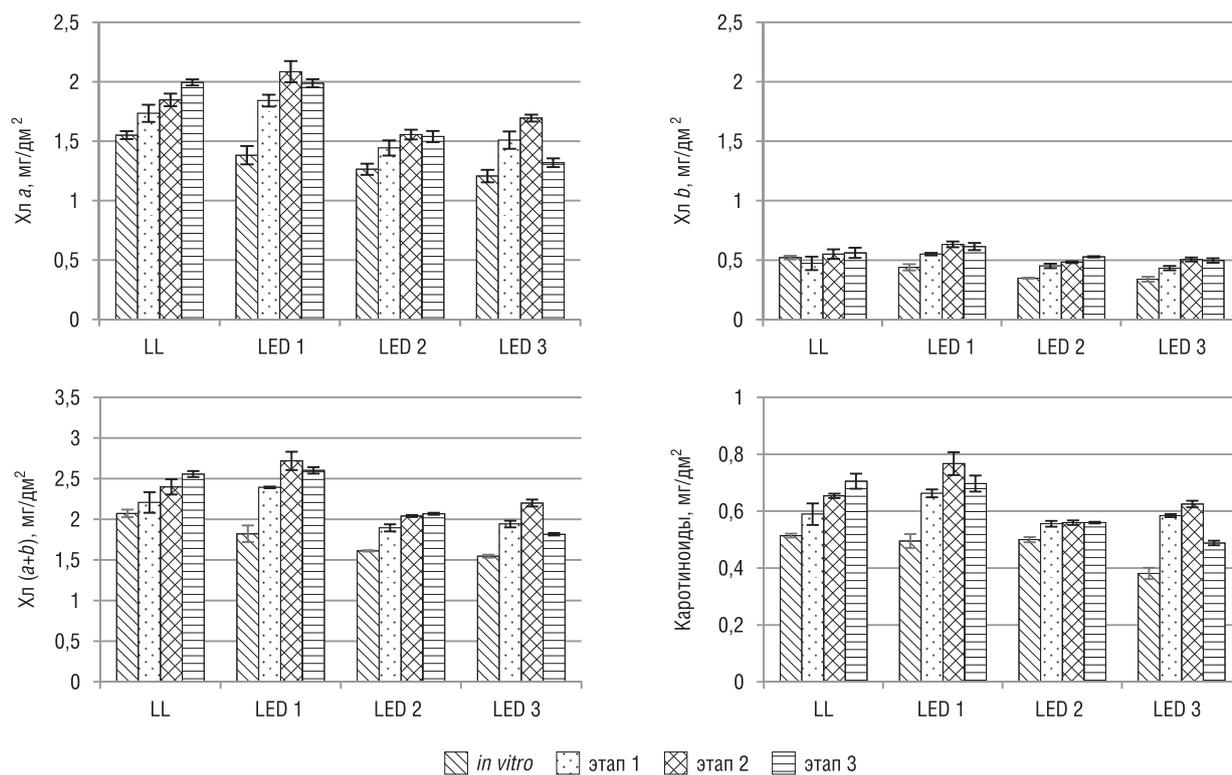


Рис. 1. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений-регенерантов осины при адаптации *ex vitro*

Fig. 1. The content of photosynthetic pigments in the leaves of regenerated plants of aspen during *ex vitro* adaptation

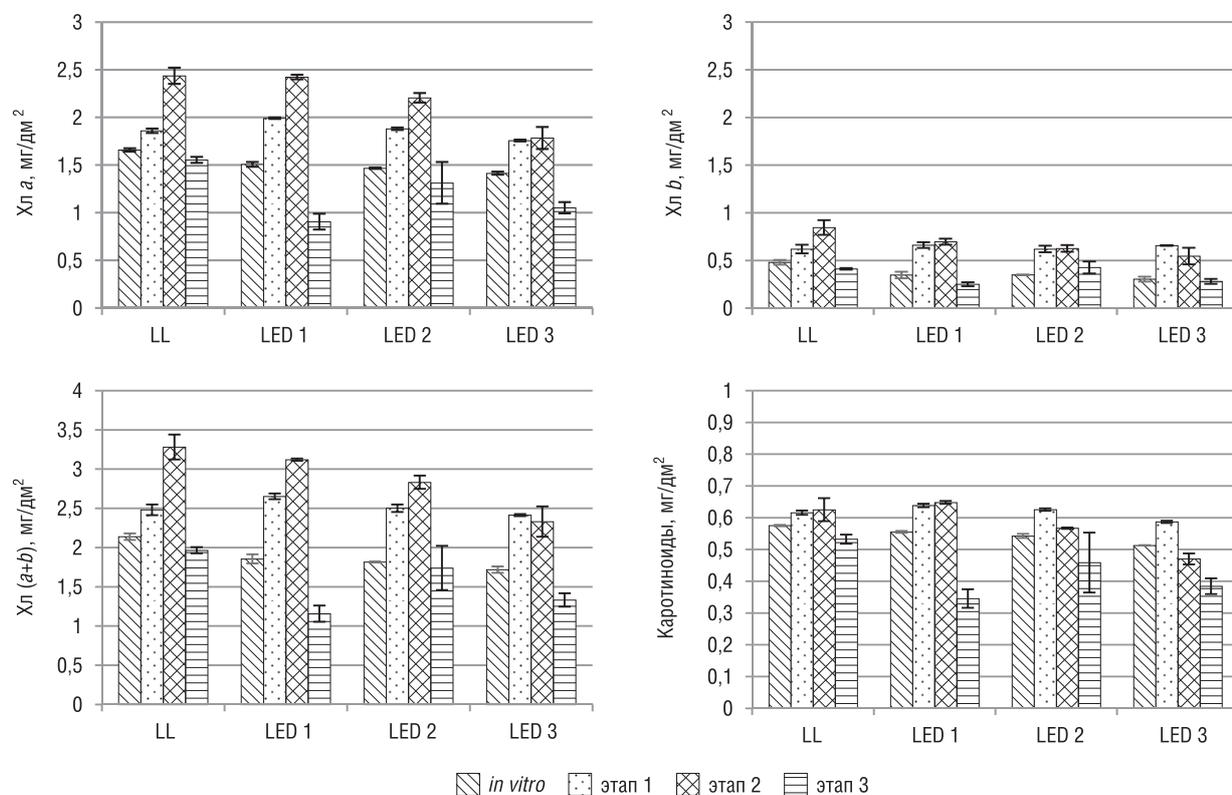


Рис. 2. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений-регенерантов березы повислой при адаптации *ex vitro*

Fig. 2. The content of photosynthetic pigments in the leaves of regenerated plants of birch during *ex vitro* adaptation

уровня Хл (особенно Хл *a*), но не каротиноидов в листьях регенерантов обоих видов растений при снижении соотношения К/ДК в спектре освещения (см. рис. 1, 2). Более выраженные эффекты света с различным спектральным составом на содержание пигментов в листьях осины согласуются с вышеописанными закономерностями влияния освещения на рост регенерантов (см. табл. 2) и свидетельствуют о более высокой чувствительности фоторецепторного аппарата регенерантов осины к исследуемым спектральным диапазонам.

В ряде работ также показана стимуляция образования Хл при освещении растений синим светом [21–23]. Так, в культуре *in vitro* *Dendrobium officinale* содержание Хл при использовании синих светодиодов было в 3 раза выше, чем при облучении растений красными светодиодами [21]. Кроме того, установлено, что на синем свету или с его преобладанием в спектре микроклонально размноженные растения хлопчатника обыкновенного *Gossypium hirsutum* L. характеризовались самым высоким содержанием Хл, а на красном свету его количество было ниже, но при этом происходило активное образование сахарозы и крахмала [22]. Повышенный синтез крахмала в условиях облучения красным светом на фоне снижения образования Хл, а также влияние спектрального состава освещения на структуру фотосинтетического аппарата были показаны и в культуре *in vitro* березы повислой Saebo с соавт. [23].

Известно, что свет различных длин волн, активируя системы соответствующих белков-фоторецепторов, регулирует большинство параметров морфогенеза, в том числе формирование листовой пластинки. В данной работе показано, что растения-регенеранты, выращиваемые при LED-освещении, также отличались по площади листовой пластинки от растений контрольного варианта, особенно на втором и третьем этапах адаптации *ex vitro*. Так, на первом этапе адаптации на 14-е сутки площадь листьев регенерантов осины варианта LED 1 была больше на 54 %, чем у растений варианта LL. На втором этапе на 30-е сутки средняя площадь листа растений осины всех опытных вариантов в 2–3 раза превышала контроль (рис. 3, *a*). К 40-м суткам площадь листьев у растений всех вариантов достигала максимума (данные не приведены) и затем сохранялась до конца третьего этапа адаптации (60-е сутки) (рис. 3, *a*). К этому времени площадь листьев растений варианта LED 1 (большая доля синего света в спектре) превышала в 1,5 раза данный показатель у растений варианта LL, а у растений вариантов LED 2 и LED 3 (большая доля красного света в спектре) – в 2 раза.

Достоверные отличия между растениями-регенерантами березы светодиодных и контрольного вариантов обнаружены только на 30-е сутки адаптации (этап 2) – площадь листьев при LED-освещении была выше в среднем на 20 %, а достоверные отличия между LED 1, LED 2 и LED 3 не выявлены (рис. 3, *b*).

Сравнение между собой растений-регенерантов осины, культивируемых при LED-освещении, показало, что площадь листьев была тем больше, чем ниже был уровень синего света и выше – красного, а следовательно, соотношений К/С, К/С + 3 и К/ДК. Площадь листьев регенерантов березы от спектрального состава LED-освещения практически не зависела.

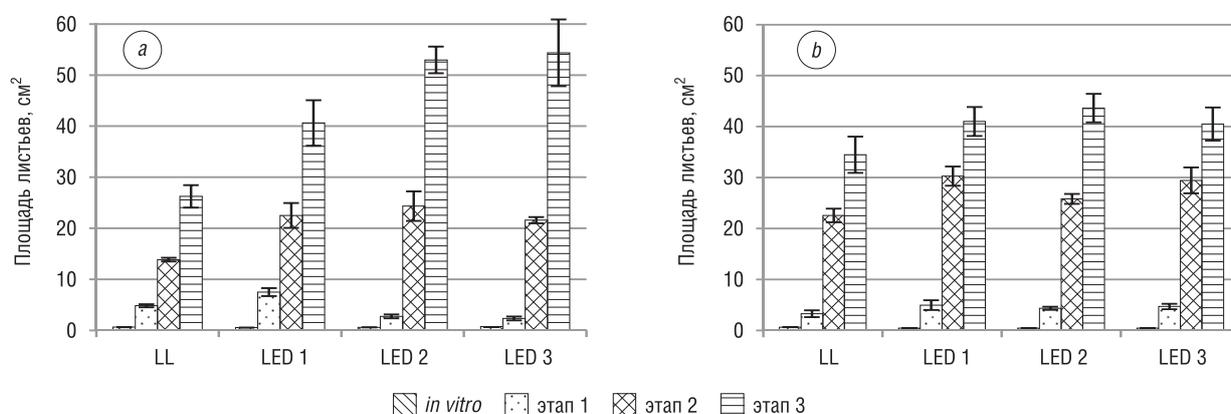


Рис. 3. Площадь листьев растений-регенерантов осины (*a*) и березы повислой (*b*), культивируемых при различных вариантах освещения

Fig. 3. Leaves area of regenerated plants of aspen (*a*) and birch (*b*) cultivated under various lighting options

Показатель УППЛ показывает уровень накопления сухого вещества в листе и косвенно характеризует толщину листовой пластинки. Часто данный параметр положительно коррелирует с интенсивностью фотосинтеза [15]. Максимальным значением показателя УППЛ в данной работе характеризовались растения-регенеранты осины варианта LED 1 (с самым высоким содержанием синего света в спектре) (рис. 4). В свою очередь, у регенерантов при LED 2 и LED 3 освещении УППЛ снижался с увеличением соотношений К/С, К/(С + З) и К/ДК в спектре. Таким образом, чем меньше была листовая пластинка, тем выше УППЛ. У березы повислой отмечалась аналогичная тенденция изменения средних значений УППЛ, однако различия не были достоверны.

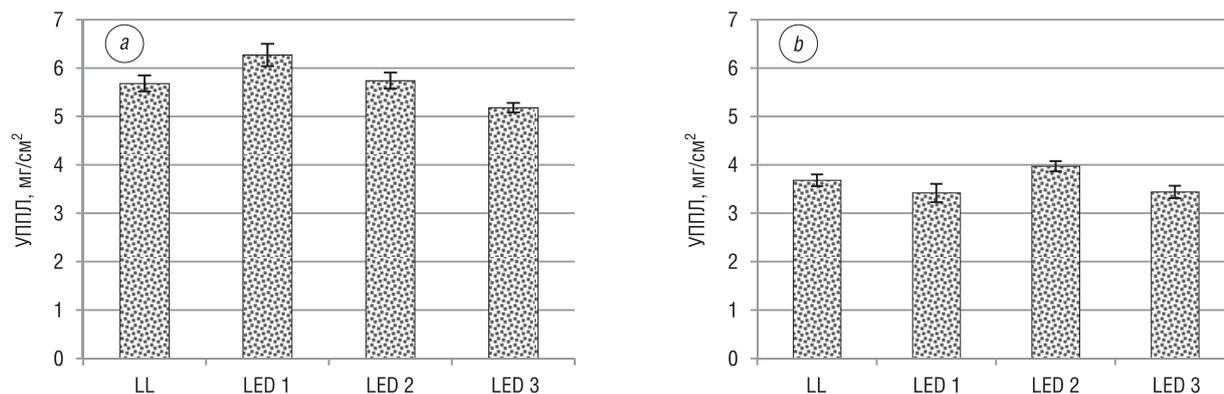


Рис. 4. Удельная поверхностная площадь листьев растений-регенерантов осины (a) и березы повислой (b), культивируемых при различных вариантах освещения на третьем этапе адаптации

Fig. 4. Specific surface area of the leaves of regenerated plants of aspen (a) and birch (b) cultivated under various lighting options in the third stage of adaptation

Таким образом, можно выделить следующие закономерности формирования ФСА растений-регенерантов осины *ex vitro* при разных условиях LED-освещения:

имеется обратная зависимость между содержанием Хл в листьях и площадью листовой пластинки растений осины;

у регенерантов осины при освещении LED 1 самое высокое содержание фотосинтетических пигментов, УППЛ, но меньшая листовая пластинка по сравнению с растениями при освещении LED 2 и LED 3.

Процесс формирования ФСА березы оказался значительно менее чувствительным к изменениям спектрального состава LED-излучения: различия в содержании Хл, площади листовой пластинки и УППЛ между растениями разных вариантов практически отсутствуют. Возможно, это связано с более высоким содержанием в листьях осины структур, поглощающих синий свет, относящихся к пигментам фенольной природы, например антоцианам [24], а следовательно, с лучше развитой системой регуляции их биосинтеза.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что растения-регенеранты *Populus tremula* L. в условиях адаптации *ex vitro* при LED-освещении характеризовались большим диаметром стебля, формировали больше метамеров и, следовательно, больше листьев. Отмечены хорошо выраженные различия в содержании фотосинтетических пигментов листьев микроклонов осины в зависимости от спектрального состава LED-освещения: увеличение К/С, (К/С + З) и К/Д в спектре от 1 до 4, от 0,8 до 2 и от 3,3 до 5,1 соответственно приводило к значительному уменьшению их количества. Площадь листьев у регенерантов осины была тем больше, чем ниже был уровень синего света и выше – красного. Таким образом, растения-регенеранты осины обыкновенной при соотношениях К/С, К/(С + З) и К/ДК, равным 4; 2; 5,1 соответственно, характеризовались самыми низкими содержанием фотосинтетических пигментов и УППЛ, но большей листовой пластинкой, чем растения двух других LED-вариантов.

Эффекты влияния освещения исследуемых спектральных диапазонов на рост и формирование ФСА растений березы были выражены меньше или отсутствовали. Содержание фотосинтетических пигментов и площадь листьев регенерантов березы от спектрального состава LED-освещения зависели в меньшей степени, чем у осины.

Таким образом, установлены особенности влияния LED-освещения различного спектрального состава с варьируемыми соотношениями физиологически значимых спектральных диапазонов (К/С, К/(С + 3), К/ДК) на формирование метамеров, диаметр стебля, УППЛ, пигментный состав и площадь листовой пластинки микроклонально размноженных растений осины обыкновенной и березы повислой в течение периода адаптации к условиям *ex vitro*.

Список использованных источников

1. Стратегия адаптации лесного хозяйства Республики Беларусь к изменению климата на период до 2050 года / М-во лес. хоз-ва Респ. Беларусь, Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси, Ин-т леса НАН Беларуси, НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам, ГУ «Беллесозащита». – Минск, 2011. – 119 с.
2. Цыганов, А.Р. Биоэнергетика: энергетические возможности биомассы / А.Р. Цыганов, А.В. Клочков. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 143 с.
3. Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth. and *Betula pubescens* Ehrh.) in Northern Europe / J. Hynynen [et al.] // Forestry. – 2008. – Vol. 83, N 1. – P. 103–119. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpp035>
4. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions: review / J. Pospóšilová [et al.] // Biologia Plantarum. – 1999. – Vol. 42, N 4. – P. 481–497. <https://doi.org/10.1023/A:1002688208758>
5. Kumar, K. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated Plants in – *ex vitro* conditions: a review / K. Kumar, I. U. Rao // J. Ornament. Hortic. Plants. – 2012. – Vol. 2, N 4. – P. 271–283.
6. Furuya, M. Phytochromes: their molecular species, gene family and functions / M. Furuya // Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. – 1993. – Vol. 44, N 1. – P. 617–645. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.003153>
7. Lin, C. Cryptochrome structure and signal transduction / C. Lin, D. Shalitin // Ann. Rev. Plant Biol. – 2003. – Vol. 54, N 1. – P. 469–496. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.110901.160901>
8. The phototropin family of photoreceptors / W.R. Briggs [et al.] // Plant Cell. – 2001. – Vol. 13, N 5. – P. 993–997. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.993>
9. Gupta, S.D. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis: review / S.D. Gupta, B. Jatothu // Plant Biotechnol. Rep. – 2013. – Vol. 7, N 3. – P. 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>
10. LED-освещение в производстве продукции растениеводства закрытого грунта / О.В. Молчан [и др.] // Наука и инновации. – 2017. – № 12. – С. 38–43.
11. Кулагин, Д.В. Разработка схемы акклиматизации микрорастений осины (*Populus tremula* L.) к условиям *ex vitro* / Д.В. Кулагин, А.В. Константинов, Е.Н. Химченко // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2011. – Вып. 71 : Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 279–287.
12. Owen, H.R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations / H.R. Owen, A.R. Miller // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 1992. – Vol. 28, N 2. – P. 147–150. <https://doi.org/10.1007/BF00055509>
13. Установить спектры и плотность потока квантов светодиодного излучателя, позволяющие оптимизировать производственный процесс эксплантов голубики и розы : отчет о НИР (заключ.) / Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси ; рук. В.Г. Реуцкий. – Минск, 2014. – 84 с.
14. Wettstein, D. Formula of chlorophyll determination / D. Wettstein // Exp. Cell Res. – 1957. – Vol. 12, N 3. – P. 427–489.
15. Терминология количественных характеристик при изучении роста, продуктивности и фотосинтеза сельскохозяйственных растений : метод. указания / Акад. с.-х. наук, НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова ; сост. : М.И. Зеленский, О.Д. Быков. – Ленинград, 1982. – 45 с.
16. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск : Выш. шк., 1973. – 320 с.
17. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture / S. Demotes-Mainard [et al.] // Environ. Exp. Bot. – 2016. – Vol. 121. – P. 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>
18. Far-red light filtering by plastic film, greenhouse-cladding materials: effects on growth and flowering in *Petunia* and *Impatiens* / J.M. Fletcher [et al.] // J. Hortic. Sci. Biotechnol. – 2005. – Vol. 80, N 3. – P. 303–306. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511934>
19. Mata, D.A. Manipulation of light environment to produce highquality poinsettia plants / D.A. Mata, J.F. Botto // HortSci. – 2009. – Vol. 44, N 3. – P. 702–706. <https://doi.org/10.21273/hortsci.44.3.702>
20. Регуляция первичных стадий фотосинтеза при изменении физиологического состояния растений / А.А. Рубин [и др.] // Фотосинтез и производственный процесс / отв. ред. А.А. Ничипорович. – М., 1988. – С. 24–39.
21. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro* / Y. Lin [et al.] // Plant Cell, Tiss Organ Cult. – 2011. – Vol. 105, N 3. – P. 329–335. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9871-9>
22. Li, H. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro* / H. Li, Z. Xu, C. Tang // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2010. – Vol. 103, N 2. – P. 155–163. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9763-z>
23. Saebo, A. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of brich plantlets *in vitro* / A. Saebo, T. Krekling, M. Appelgren // Plant Cell, Tiss. Organ Cult. – 1995. – Vol. 41, N 2. – P. 177–185. <https://doi.org/10.1007/bf00051588>

24. The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂ reveals increased anthocyanin biosynthesis during delayed autumnal senescence / M. J. Tallis [et al.] // *New Phytologist*. – 2010. – Vol. 186, N 2. – P. 415–428. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03184.x>

References

1. *Strategy of adaptation of forestry of the Republic of Belarus to climate change for the period till 2050*. Minsk, Ministry of Forestry of the Republic of Belarus, 2011. 119 p. (in Russian).
2. Tsyganov A. R., Klochkov A. V. *Bioenergy: biomass energy potential*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2012. 143 p. (in Russian).
3. Hynynen J., Niemistö P., Viherä-Aarnio A., Brunner A., Hein S., Velling P. Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth. and *Betula pubescens* Ehrh.) in Northern Europe. *Forestry*, 2008, vol. 83, no. 1, pp. 103–119. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpp035>
4. Pospóšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., Plzánková Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions: review. *Biologia Plantarum*, 1999, vol. 42, no. 4, pp. 481–497. <https://doi.org/10.1023/A:1002688208758>
5. Kumar K., Rao I. U. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in – *ex vitro* conditions: a review. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 2012, vol. 2, no. 4, pp. 271–283.
6. Furuya M. Phytochromes: their molecular species, gene family and functions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 44, no. 1, pp. 617–645. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.003153>
7. Lin C., Shalitin D. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, vol. 54, no. 1, pp. 469–496. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.110901.160901>
8. Briggs W. R., Beck C. F., Cashmore A. R., Christie J. M., Hughes J., Jarillo J. A. [et al.]. The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell*, 2001, vol. 13, no. 5, pp. 993–997. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.993>
9. Gupta S. D., Jatothu B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis: review. *Plant Biotechnology Reports*, 2013, vol. 7, no. 3, pp. 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>
10. Molchan O. V., Obukhovskaya L. V., Trofimov Yu. V., Pugachevskii A. V. LED-lighting in the production of greenhouse crop production *Nauka i innovatsii = Science and innovations*, 2017, no. 12, pp. 38–43 (in Russian).
11. Kulagin D. V., Konstantinov A. V., Khimchenko E. N. Development of the scheme for acclimatization of aspen microplants (*Populus tremula* L.) to *ex vitro* conditions. *Sbornik nauchnykh trudov Instituta lesa Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Collection of scientific papers of the Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus]. Gomel', 2011, iss. 71, pp. 279–287 (in Russian).
12. Owen H. R., Miller A. R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, vol. 28, no. 2, pp. 147–150. <https://doi.org/10.1007/BF00055509>
13. *Establish the spectra and flux density of quanta of the LED emitter, allowing to optimize the production process of blueberry and rose explants*. Minsk, 2014. 84 p.
14. Wettstein D. Formula of chlorophyll determination. *Experimental Cell Research*, 1957, vol. 12, no. 3, pp. 427–489.
15. *Terminology of quantitative characteristics in the study of growth, productivity and photosynthesis of agricultural plants*. Leningrad, 1982. 45 p. (in Russian).
16. Rokitskii P. F. *Biological statistics*. 3rd ed. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 320 p. (in Russian).
17. Demotes-Mainarda S., Pérona T., Corot A., Bertheloot J., Gourrierec J., Pelleschi-Travierb S. [et al.]. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 2016, vol. 121, pp. 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>
18. Fletcher J. M., Tatsiopoulou, A., Mpezamihigo M., Carew J. G., Henbest R. G. C., Hadley P. Far-red light filtering by plastic film, greenhouse-cladding materials: effects on growth and flowering in *Petunia* and *Impatiens*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2005, vol. 80, no. 3, pp. 303–306. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511934>
19. Mata D. A., Botto J. F. Manipulation of light environment to produce highquality poinsettia plants. *HortScience*, 2009, vol. 44, no. 3, pp. 702–706. <https://doi.org/10.21273/hortsci.44.3.702>
20. Rubin A. B., Venediktov P. S., Krendeleva T. E., Pashchenko V. Z. Regulation of the primary stages of photosynthesis with a change in the physiological state of plants. *Fotosintez i produkcionnyi process* [Photosynthesis and production process], Moscow, 1988, pp. 24–39 (in Russian).
21. Lin Y., Li J., Li B., He T. Effects of light quality on growth and development of procorm-like bodied of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, vol. 105, no. 3, pp. 329–335. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9871-9>
22. Li H., Xu Z., Tang C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2010, vol. 103, no. 2, pp. 155–163. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9763-z>
23. Saebo A., Krekling T., Appelgren M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, vol. 41, no. 2, pp. 177–185. <https://doi.org/10.1007/BF00051588>
24. Tallis M. J., Lin Y., Rogers A., Zhang J., Street N. R., Miglietta F., Karnosky D. F., De Angelis P., Calfapietra C., Taylor G. The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂ reveals increased anthocyanin biosynthesis during delayed autumnal senescence. *New Phytologist*, 2010, vol. 186, no. 2, pp. 415–428. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03184.x>

Информация об авторах

Куделина Татьяна Николаевна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 10tan10@mail.ru

Константинов Андрей Вячеславович – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246001, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: avkonstantinof@mail.ru

Обуховская Людмила Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olv_8@mail.ru

Молчан Ольга Викторовна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga_molchan@mail.ru

Information about the authors

Tatiana N. Kudelina – Researcher. V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 10tan10@mail.ru

Andrei V. Konstantinov – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: avkonstantinof@mail.ru

Lyudmila V. Obukhovskaya – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olv_8@mail.ru

Olga V. Molchan – Ph. D. (Biol.), Assistant professor, Head of the Laboratory. V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga_molchan@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 582.287.238:608.2

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-467-471>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

В. В. Сакович, А. М. Груша, В. В. Ревенко, Д. Д. Жерносеков

Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *PLEUROTUS OSTREATUS*

Аннотация. Проведена первичная очистка ферментного препарата, обладающего протеолитической активностью, из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus*. Используются методы осаждения, диализа, ионообменной хроматографии на DEAE- и КМ-сефарозе. Установлено, что в результате хроматографии на КМ-сефарозе ферментный препарат из культуральной жидкости разделяется на три фракции, одна из которых обладает молокосвертывающей активностью (МСА). Хроматография на DEAE-сефарозе позволила значительно очистить фермент, обладающий МСА.

Ключевые слова: базидиомицеты, протеолитические ферменты, молокосвертывающая активность, бэтч-метод, ионообменники

Для цитирования: Хроматографическая очистка ферментного препарата из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* / В. В. Сакович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 467–471. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-467-471>

V. V. Sakovich, A. M. Hrusha, V. V. Revenko, D. D. Zhernossekov

Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION OF THE ENZYME PREPARATION FROM THE CULTURAL LIQUID OF *PLEUROTUS OSTREATUS*

Abstract. The primary purification of the proteolytic enzyme preparation from the *Pleurotus ostreatus* culture fluid was carried out. Methods of salting out, dialysis, ion-exchange chromatography on DEAE- and KM-sepharose were used. It was shown that during the chromatography on KM-sepharose, the enzyme preparation from the culture liquid was divided into three fractions, one of which possessed milk-clotting activity (MCA). Chromatography on DEAE-sepharose allowed us to reach the significant purity of the enzyme with MCA.

Keywords: basidiomycetes, proteolytic enzymes, milk-clotting activity, batch method, ion exchanger

For citation: Sakovich V. V., Hrusha A. M., Revenko V. V., Zhernossekov D. D. Chromatographic purification of the enzyme preparation from the cultural liquid of *Pleurotus ostreatus*. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 467–471 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-467-471>

Введение. Протеолитические ферменты широко используются в молочной промышленности (сыроделии) в качестве сычужных ферментных препаратов. Основным источником получения данных энзимов служат сычуги – отделы желудков телят и ягнят. Однако ввиду ограниченности данного ресурса необходим поиск альтернативных источников получения протеолитических ферментов [1].

Одними из перспективных продуцентов являются базидиальные грибы. Известно, что *Pleurotus ostreatus* содержит протеиназы, обладающие молокосвертывающей активностью (МСА) [2]. В литературе имеются данные, что экстракт плодовых тел *P. ostreatus* имеет сходство с препаратами, используемыми в молочной промышленности, поэтому после проведения очистки он может быть применен в сыроделии [3–6]. Нами подобраны питательные среды и оптимальные условия для глубинного культивирования *P. ostreatus* [7], а кроме того, показано, что *P. ostreatus* обладает МСА [8].

Начальный этап очистки ферментов, обладающих МСА, включал осаждение ферментов солями: хлоридом натрия и сульфатом аммония. Наилучший результат дало полное насыщение раствора хлоридом натрия в течение 12 ч при температуре 4 °С, рН 4,7, и перемешивании при скорости

60 об/мин. Также экспериментально подобраны условия для последующего диализа полученного препарата: температура 4 °С, перемешивание в течение 20 ч при скорости 60 об/мин [9].

Цель работы – хроматографическая очистка ферментного препарата из культуральной жидкости *P. ostreatus*.

Для достижения цели необходимо было решить ряд задач:

1. Проведение катионообменной хроматографии.
2. Проведение анионообменной хроматографии.
3. Проведение бэтч-метода.
4. Определение содержания белка, уровней МСА и общей протеолитической активности на каждом этапе очистки.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на диком штамме *P. ostreatus*, который был выделен из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus* sp.). В ходе исследований использовали картофельно-сахарозную среду. Инокулом вводили в виде фрагментов маточника мицелия площадью 1 см². Культивировали в течение 14 дней в темноте при температуре 27 °С на шейкере WiseShakeSHO при скорости 70 об/мин. По окончании инкубации производили отбор и замораживание культуральной жидкости, не подвергая ее дополнительному разведению.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, предполагая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ опт. ед. в кювете толщиной 1 см [10].

МСА определяли по общепринятой методике: пробирку с субстратом (объемом 10 мл молока), содержащим 0,0015 М раствор CaCl₂, нагревали до 35 °С и вносили 2 мл исследуемого ферментного препарата. Активность препарата оценивали по времени образования плотного молочного сгустка. За единицу МСА принимали количество фермента, которое сворачивает 100 мл молока за 40 мин при 35 °С [11].

Общую протеолитическую активность (ПА) определяли по лизису желатина в тонком слое агарового геля [12]. Объем образца, наносимого на белок-агаровые пластины, составлял 10 мкл. Активность препарата рассчитывали, измеряя площадь белок-агаровых пластин с гидролизованым субстратом вокруг каждой лунки. За единицу активности (Е) фермента принимали тот уровень активности, который обуславливает гидролиз субстрата на участке геля размером 1 см².

Для получения сычужных ферментов из культуральной жидкости применяли метод высаливания с использованием разных солей: сульфата аммония и хлорида натрия. Для удаления соли применяли метод диализа.

Для длительного хранения препарата использовали метод лиофильной сушки при сочетании температуры –51 °С и давления 137 Па.

Катионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 × 3) с КМ-сефарозой (Bio-Rad, США), уравновешенной 0,2 М ацетатным буфером (рН 5,0). Элюцию проводили со скоростью 10 мл/ч, используя ступенчатый градиент со следующими концентрациями NaCl: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 М.

Анионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 × 3) с DEAE-сефарозой (Bio-Rad, США), уравновешенной 0,2 М ацетатным буфером (рН 5,0). Элюцию проводили со скоростью 10 мл/ч, используя ступенчатый градиент со следующими концентрациями NaCl: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 М.

Бэтч-метод проводили следующим образом. DEAE-сефарозу уравновешивали 0,2 М ацетатным буфером (рН 5,0), смешивали с раствором лиофильного препарата, учитывая количество белка, который способен связывать данный анионообменник. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 4 °С. Затем суспензию центрифугировали при скорости

Т а б л и ц а 1. Начальные этапы очистки молокосвертывающих ферментов *P. ostreatus*

Т а б л е 1. Initial stages of purification of milk-clotting enzymes *P. ostreatus*

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	МСА, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Культуральная жидкость	200	0,185	5	1000	27	1
Осаждение хлоридом натрия	50	0,22	5	250	22,7	0,84
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14

12000 об/мин при температуре 4 °С в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли концентрацию белка и уровень МСА. Для определения остаточной МСА процедуру повторяли с буфером, содержащим 0,1; 0,25; 1 М NaCl.

Результаты и их обсуждение. Первый этап очистки культуральной жидкости позволил сохранить практически всю исходную МСА (табл. 1).

Часть лиофильного порошка использовали для дальнейшей очистки препарата, содержащего МСА и ПА на ионообменниках (КМ- и ДЭАЭ-сефарозе).

Хроматография на КМ-сефарозе показала, что ПА исходного препарата представлена тремя фракциями:

ферментами, которые элюируются с колонки буфером без добавления соли;

ферментами, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,25 М NaCl;

ферментами, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,75 М NaCl (табл. 2).

Таким образом, произошло частичное разделение молокосвертывающей и общей ПА препарата.

Данный метод можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований свойств протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат, например, субстратной специфичности.

При хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе фермент, обладающий МСА, не связывается с носителем, при этом достигается его очистка в 22,7 раза. Это обусловлено тем, что большинство белков (более 50 % от общего количества белка, наносимого на колонку) связывается с анионообменником. Кроме того, в процессе хроматографического разделения происходит автоактивация ферментов или фермента, обладающего МСА. Данное явление обнаружено ранее для ферментного препарата, содержащего МСА из плодовых тел *P. ostreatus* [6]. Как видно из табл. 3, при данном виде хроматографии МСА и общая ПА не разделяются.

Так как данный метод можно рекомендовать для использования в молочной промышленности (сыроделии) на этапе получения сырного сгустка, целесообразно предложить использование бэтч-метода при очистке на DEAE-сефарозе. Результаты очистки бэтч-методом приведены в табл. 4.

В результате применения такого метода достигнута степень очистки в 21 раз. При этом значительно экономится время проведения эксперимента, что является важным при использовании данного метода в промышленности. В качестве носителя можно рекомендовать недорогие анионообменники, например DEAE-целлюлозу.

Таблица 2. Очистка ферментного препарата на КМ-сефарозе

Table 2. Purification of the enzyme preparation on KM-sepharose

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	МСА, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Раствор лиофильного порошка	10	1,07	33	165	30,8	1,14
МСА: объединенная фракция	20	0,15	90	900	300	11
ПА: фракция 1	20	0,15	16,9	338	113	2,7
ПА: фракция 2	10	0,16	15,7	157	98	2,3
ПА: фракция 3	10	0,07	20	200	285,7	6,8

Таблица 3. Очистка ферментного препарата на DEAE-сефарозе

Table 3. Purification of the enzyme preparation on DEAE-sepharosa

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	Активность, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1
МСА: объединенная фракция	8	0,13	92,5	740	698	22,7
ПА: объединенная фракция	8	0,13	24,31	194,5	183,5	5,2

Таблица 4. Очистка ферментного препарата на DEAE-сефарозе с помощью бэтч-метода

Table 4. Purification of the enzyme preparation on DEAE-sepharose using the batch method

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	МСА, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14
Объединенная фракция	7	0,15	100	700	648	21

Заключение. Хроматографическое разделение МСА и ПА на КМ-сефарозе можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат. Очистку ферментного препарата, обладающего МСА, с помощью хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе предлагаем использовать в сыроделии на этапе образования сырного сгустка. Планируется дальнейшая очистка препарата, обладающего МСА, и изучение субстратной специфичности ферментов, входящих во фракции, разделяемые с помощью хроматографии на ионообменных носителях.

Список использованных источников

1. Дьяконова, Г.В. Исследование некоторых физико-химических свойств молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.04 / Г.В. Дьяконова ; Юж. федер. ун-т. – Ростов н/Д, 2010. – 23 с.
2. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringaoleifera* flowers / E. V. Pontual [et al.] // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 135, N 3. – P. 1848–1854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.087>
3. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease / M. Esposito [et al.] // *Food Chem.* – 2016. – Vol. 204. – P. 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.060>
4. Purification, characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus* / G. Palmieri [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67, N 6. – P. 2754–2759. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2754-2759.2001>
5. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit / M. Salehi [et al.] // *Int. J. Biol. Macromolecules.* – 2017. – Vol. 98. – P. 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>
6. Лебедева, Г.В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г.В. Лебедева, М.Т. Проскураков, М.А. Кожухова // *Изв. высш. учеб. заведений. Пищевая технология.* – 2008. – № 1. – С. 114–115.
7. Сакович, В.В. Подбор оптимальных питательных сред и условий глубинного культивирования на эффективность выращивания вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) / В.В. Сакович, Д.Д. Жерносеков // *Актуальні питання біологічної науки : IV Міжнар. заочна наук.-практ. конф., присв. 100-річчю від дня народження акад. П.Г. Богача, 12 квіт. 2018 р. : зб. ст. / Ніжин. держ. ун-т ; ред. кол. : М. Давіташвілі [та ін.]. – Ніжин, 2018. – С. 88–89.*
8. Сакович, В.В. Влияние экстракта мицелия и культуральной жидкости вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) на формирование сырного сгустка / В.В. Сакович, О.Н. Жук // *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы XI Междунар. молод. науч.-практ. конф., Пинск, 7 апр. 2017 г. : в 2 ч. / Полес. гос. ун-т ; ред. кол. : К.К. Шебеко (гл. ред.) [и др.]. – Пинск, 2017. – Ч. 1. – С. 340–342.*
9. Сакович, В.В. Разработка методов очистки фермента, обладающего молокосвертывающей активностью из *Pleurotus ostreatus* / В.В. Сакович, А.М. Груша, Д.Д. Жерносеков // *Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : материалы II Белорус. биохим. конгресса (г. Гродно, 17–18 мая 2018 г.) / ред. : И.Н. Семененя, А.Г. Мойсеенок. – Минск, 2018. – С. 507–511.*
10. Секретируемая металлопротеиназа *Bacillus intermedius*: получение гомогенного препарата фермента и исследование физико-химических свойств / Н.Л. Рудакова [и др.] // *Уч. зап. Казан. гос. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2010. – Т. 152, № 2. – С. 145–154.
11. ГОСТ ISO 11815-2015. Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента. – М. : Стандартформ, 2015. – 10 с.
12. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза. / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии : методы исследований / Е.В. Барковский [и др.] ; под ред. А.А. Чиркина. – Минск, 2013. – Гл. 5. – С. 132–157.*

References

1. Diakonova G. V. *Investigation of some physical and chemical properties of milk-clotting enzymes of common oyster mushroom.* Abstract of Ph. D. diss. Rostov na Donu, 2010. 23 p. (in Russian).
2. Pontual E. V., Carvalho B. E. A., Bezerra R. S., Coelho L. C. B. B., Napoleão T. H., Paiva P. M. G. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringaoleifera* flowers. *Food Chemistry*, 2012, vol. 135, no. 3, pp. 1848–1854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.087>
3. Esposito M., di Pierro P., Dejonghe W., Mariniello L., Porta R. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, 2016, vol. 204, pp. 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.060>
4. Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., Sannia G. Purification, characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 6, pp. 2754–2759. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2754-2759.2001>
5. Salehi M., Aghamaali M. R., Sajedi R. H., Asghari S. M., Jorjani E. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol. 98, pp. 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>

6. Lebedeva G. V., Proskuryakov M. T., Kozhukhova M. A. Isolation and characterization of rennet action from the fruit bodies of oyster mushroom. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = Food technology*, 2008, no. 1, pp. 114–115 (in Russian).

7. Sakovich V. V., Zhernosekov D. D. Selection of optimal culture media and conditions of deep cultivation for the effectiveness of cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Aktual'ni pytannja biologichnoi nauky: IV Mizhnarodna zaochna naukovo-praktychna konferencija, prysvechana 100-richchju vid dnja narodzhennja akademika P. G. Bogacha (12 kvitnja 2018 roku, Nizhyn): zbirnyk statej* [Actual questions of biological science: IV International correspondence scientific-practical conference, dedicated to the 100th anniversary of the birth of academician P. G. Bogachy (April 12, 2018, Nizhyn): a collection of articles]. Nizhyn, 2018, pp. 88–89 (in Russian).

8. Sakovich V. V., Guk O. N. Effect of mycelium extract and common oyster culture fluid (*Pleurotus ostreatus*) on the formation of cheese clot. *Nauchnyi potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi: materialy XI mezhdunarodnoi molodezhnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Pinsk, 7 aprelya 2017 goda). Chast' 1* [The scientific potential of young people – the future of Belarus: materials of the XI International Youth scientific and practical conference (Pinsk, April 7, 2017). Part 1]. Pinsk, 2017, pp. 340–342 (in Russian).

9. Sakovich V. V., Grusha A. M., Zhernosekov D. D. Development of methods for purification of the enzyme with milk-converting activity from *Pleurotus ostreatus*. *Sovremennyye problemy biokhimii i molekulyarnoi biologii: sbornik nauchnykh statei II Belorusskogo biokhimicheskogo kongressa (Grodno, 17–18 maya 2018 goda)* [Modern problems of biochemistry and molecular biology: a collection of scientific articles of the II Belarusian biochemical congress (Grodno, May 17–18, 2018)]. Minsk, 2018, pp. 507–511 (in Russian).

10. Rudakova N. L., Sabirova A. R., Kayumov A. R., Mardanova A. M., Balaban N. P., Sharipova M. R. Secreted metalloproteinase *Bacillus intermedius*: preparation of a homogeneous enzyme preparation and investigation of physical and chemical properties. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennyye nauki* [Scientific notes of the Kazan University. Series Natural Sciences], 2010, vol. 152, no. 2, pp. 145–154 (in Russian).

11. GOST ISO 11815-2015. *Milk. Determination of total milk-clotting activity of bovine rennet*. Moscow, Standartinform Publ., 2015. 10 p. (in Russian).

12. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. Research methods of proteolysis. Chapter 5. *Sovremennyye problemy biokhimii: metody issledovaniy* [Modern problems of biochemistry: research methods]. Minsk, 2013, pp. 132–157 (in Russian).

Информация об авторах

Сакович Валерия Васильевна – магистр биол. наук. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: mrs.valeryia@mail.ru

Груша Александр Михайлович – студент. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: grusha.alex.98@gmail.com

Ревенько Вадим Вячеславович – студент. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: mrs.valeryia@mail.ru

Жерносеков Дмитрий Данилович – канд. биол. наук, доцент. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: chemikdd@mail.ru

Information about the authors

Valeryia V. Sakovich – Master of biological sciences. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: mrs.valeryia@mail.ru

Aliaksandr M. Hrusha – Student. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: grusha.alex.98@gmail.com

Vadim V. Revenko – Student. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: revenko@mail.ru

Dmitri D. Zhernosekov – D. Sc. (Biol.), Assistant Professor. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: chemikdd@mail.ru

А. В. Черноморец

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

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ, УСПЕШНОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И ТЕРРИТОРИАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛОГО АИСТА В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ БЕЛАРУСИ

Аннотация. Представлены результаты анализа популяционных показателей (численности и плотности гнездования, территориального распределения, успешности размножения, использования различных видов опор для гнездования) белого аиста на территории постоянного мониторингового стационара площадью 100 км², расположенного в Воложинском районе Минской области, за период с 2004 по 2018 г. За время исследований на мониторинговом участке отмечено значительное снижение гнездовой численности белого аиста и среднего размера выводка. Также существенно изменились предпочтения в использовании разного типа опор для постройки гнезд. В первую половину периода исследования гнезда располагались преимущественно на деревьях, но с каждым годом все больше гнездящихся пар используют для гнездования столбы линий электропередачи (ЛЭП). В связи с повышенным риском аварий из-за роста частоты использования хозяйственно важных конструкций для строительства гнезд и возрастанием вероятности гибели самих птиц от электроповреждений предпринимаются меры по предотвращению использования ЛЭП. В то же время наличие указанных отрицательных трендов позволяет сделать неблагоприятный прогноз для популяции.

Ключевые слова: белый аист, *Ciconia ciconia*, численность, плотность гнездования, успешность размножения, динамика

Для цитирования: Черноморец, А. В. Динамика численности, успешности размножения и территориального распределения белого аиста в центральной части Беларуси / А. В. Черноморец // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 472–477. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-472-477>

A. V. Chernomorets

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

DYNAMICS OF NUMBER, SUCCESS OF REPRODUCTION AND TERRITORIAL DISTRIBUTION OF WHITE STORK IN THE CENTRAL PART OF BELARUS

Abstract. The results of White Stork *Ciconia ciconia* study on monitoring plot (area of 100 km², Volozhin district, Minsk Region) in 2004–2018 are analyzed: numbers, spatial distribution, breeding success and location of nests on different supports. Decrease of numbers, significant reduction of breeding success and grow the rate of using electric pylons for nesting are allowed to make an unfavourable prognosis for population.

Keywords: White Stork, *Ciconia ciconia*, numbers, nesting density, breeding success, dynamics

For citation: Chernomorets A. V. Dynamics of number, success of reproduction and territorial distribution of White Stork in the central part of Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 472–477 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-472-477>

Введение. Белый аист – один из наиболее хорошо изученных видов птиц. Данные исследования представляют не только познавательный интерес, но и имеют практическую значимость. Аисты играют важную роль не только в населенных ими природных сообществах. Обитая по соседству с людьми, они оказывают заметное влияние и на многие отрасли хозяйственной деятельности человека. Кроме того, вследствие относительно высокой численности и положения у вершины трофической пирамиды белый аист имеет большое индикаторное значение при оценке степени трансформации биоценозов в связи с мелиорацией и другими видами антропогенного воздействия. В связи с этим результаты мониторинга белого аиста могут быть исполь-

зованы для разработки подходов по охране и управлению нарушенных ценных местообитаний, снижению рисков и угроз для популяции вида, связанных с последствиями широкомасштабной мелиорации, с урбанизацией, интенсификацией сельского хозяйства, развитием энергетики, а также для экологического воспитания и просвещения населения [1]. Долговременные мониторинговые исследования на одних и тех же контрольных участках позволяют накапливать данные о состоянии отдельных гнездовых группировок, на основе которых далее оценивается динамика основных популяционных показателей, проводится сравнительный анализ состояния вида в различных местообитаниях и регионах [2–4].

Цель исследования – анализ динамики основных популяционных показателей белого аиста (численности и плотности гнездования, территориального распределения, успешности размножения, использования различных видов опор для гнездования) на мониторинговом участке в центральной Беларуси.

Условия обитания вида в центральной части Беларуси позволяют отнести территорию региона к субоптимальным местообитаниям ввиду того, что показатели плотности гнездования вида и успешности размножения несколько выше средних по стране [4]. Одни из самых высоких в стране показателей гнездования аистов на протяжении последних десятилетий регистрировали в пойме р. Припять, где многолетние исследования проводили с начала 1990-х годов [2]. Анализ результатов абсолютных учетов для центральной части Беларуси до недавнего времени не проводили, однако благодаря накопленному к настоящему времени материалу появилась возможность не только оценить условия обитания белого аиста в центральной части Беларуси, но и сравнить эти данные с результатами учета в других регионах страны.

Материалы и методы исследования. В настоящей работе использованы результаты абсолютных учетов, которые были проведены с 2004 г. на территории общей площадью около 100 км² на западе Воложинского района Минской области (рис. 1).

В пределах стационара расположено 18 населенных пунктов сельского типа. По территории данного мониторингового участка протекает р. Западная Березина, являющаяся правым притоком р. Неман. Лесистость территории участка составляет около 50 %, значительная часть открытых пространств представлена сельскохозяйственными угодьями, площадь открытых пойменных участков незначительна. В свою очередь в пойме р. Припять условия обитания обеспечивают одни из самых высоких показателей гнездования аистов. Оптимальные условия обеспечиваются

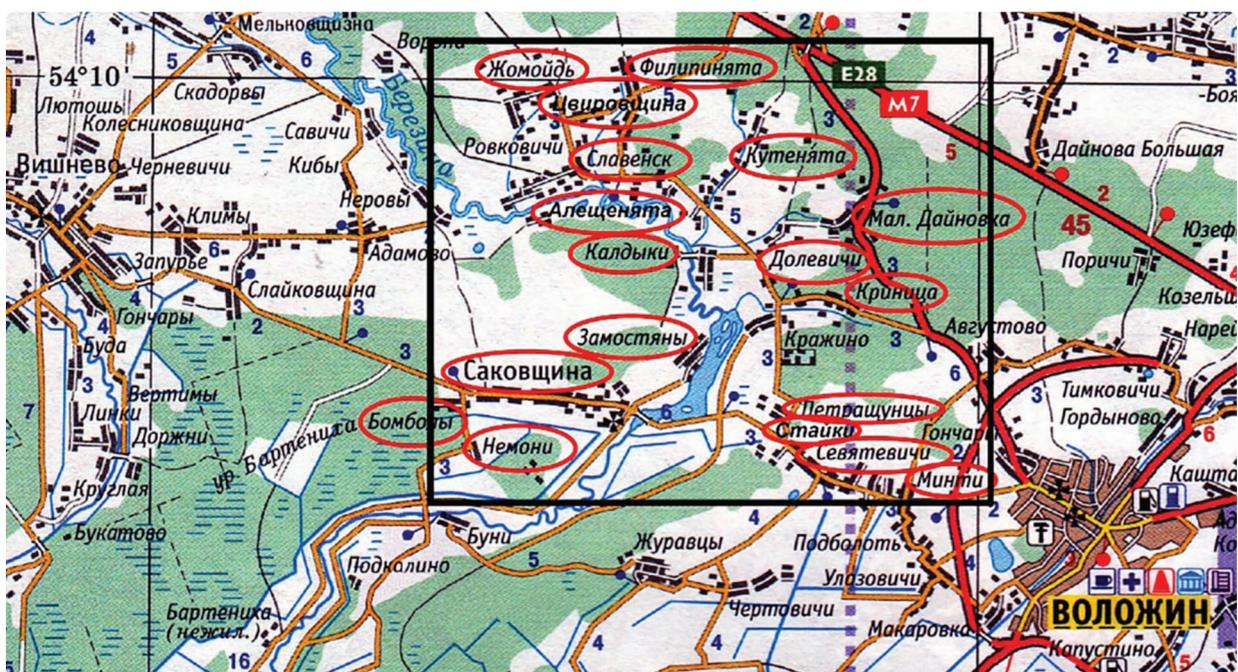


Рис. 1. Схема Воложинского стационара
 Fig. 1. The scheme of Volozhin plot

большой площадью открытых территорий, представленных в основном сельхозугодьями, и значительными по площади участками пойменных лугов. Однако для данной территории существует ряд проблем, вызванных осушением большей части болот в водосборе реки и сужением отдельных участков поймы в процессе ее обвалования для предупреждения наводнений, а также определенными изменениями масштабов сельскохозяйственной деятельности [2].

Полевые работы проводили ежегодно, и в разные годы к ним привлекались студенты биологического факультета БГУ во время прохождения полевой практики под руководством преподавателей на геостанции «Западная Березина». Сбор полевых данных в последние четыре года (2015–2018 гг.), а также обработка и анализ ранее полученной информации осуществлены непосредственно автором. Исходные данные учетов за 2011 г. были утеряны, поэтому не включены в общий анализ.

Полевые работы на стационаре заключались в учетах гнезд белого аиста, определении характера их занятости и расположения на различных опорах, а также в выявлении количества слетков в выводках накануне вылета. Сбор материала проводили с конца июня до середины – конца июля. При сборе и анализе популяционных показателей использована общепринятая международная методика, согласно которой гнездящейся считалась пара (НРа), занимающая гнездо не менее половины гнездового периода, т. е. 1,5 мес. [5, 6]. За неуспешную принимали гнездящуюся пару, по различным причинам не имеющую вылетевших из гнезда птенцов (НРо). Информацию о причинах неуспеха гнездования в более ранний период собирали путем опроса местного населения. Для характеристики успеха размножения рассчитывали среднее количество слетков на гнездящуюся пару (JZa) и на успешную пару (JZm), а также долю неуспешных пар в процентах (%НРо). Плотность гнездования рассчитывали как соотношение количества гнездящихся пар на 100 км² общей площади стационара (StD).

Статистическая обработка материала проведена при помощи программы Statistica 7.0. Достоверными считались различия и выявленные зависимости при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На территории мониторинговой площадки в Воложинском районе занятые гнезда белых аистов регистрировали в разные годы в 16 из 18 населенных пунктов, ни разу не были отмечены лишь в двух из них – Малой Дайновке и Жомойди. В разные годы плотность гнездования вида изменялась в пределах 14,0–26,0 гн. пары/100 км² общей площади. Данный показатель несколько выше, чем средний по стране, рассчитанный для территории всех мониторинговых площадок – 17,9 гн. пары/100 км² в 2014–2015 гг. Однако он ниже, чем в оптимальных для вида местообитаниях в пойме р. Припять с более высокой площадью открытых местообитаний и значительной обводненностью всей территории [3].

Как видно на рис. 2, численность белого аиста на территории Воложинского стационара подвержена значительным колебаниям. И если с 2009 по 2012 г. наблюдался ее существенный подъем максимум до 26 гнездящихся пар, то в последние годы их количество здесь значительно уменьшилось, достигнув минимума за весь период наблюдений – 14 гнездящихся пар. Продолжающееся сокращение численности вида в последние годы связано с крайне низким успехом размножения аистов в предыдущие годы.

В среднем в разные годы на один населенный пункт приходилось от 0,8 до 1,4 гнездящейся пары белого аиста. Максимальное их количество ежегодно регистрировалось в а. г. Саковщина – от 5 пар в 2015–2016 гг. до 11 пар в 2010 г. В целом за последние 14 лет в пределах мониторингового участка наблюдается территориальное перераспределение белого аиста на гнездовании. Так, в трех населенных пунктах аисты вообще перестали гнездиться (деревни Алещенята, Криница, Минти), и наоборот, появились на гнездовании в д. Севятевичи, где в первую половину периода наших исследований не регистрировались. Причинами территориального перераспределения послужили биотопические изменения, вызванные сужением и зарастанием отдельных участков поймы Западной Березины, сокращением масштабов сельскохозяйственной деятельности на отдельных участках, а также антропогенный фактор (разрушение гнезд).

Средний размер выводка за последние годы стремительно уменьшался ($p < 0,001$): с 3,06 птенца на гнездящуюся пару в 2004 г. до 1,31 птенца в 2016 г. (рис. 3). Для успешных пар этот показатель также значительно снизился – с 3,24 птенца на пару в 2004 г. до 1,91 птенца в 2016 г., хотя в 2017–2018 гг. данный показатель несколько увеличился – до 2,07 и 1,85 птенца соответственно.

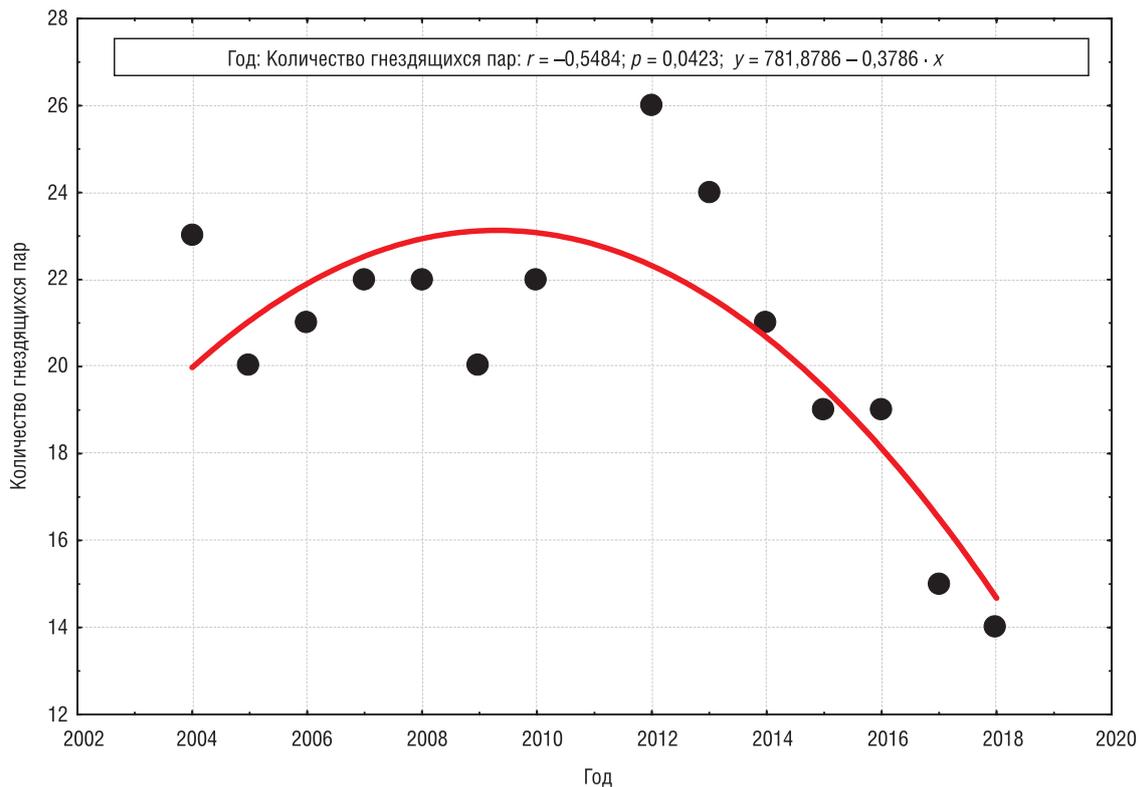


Рис. 2. Динамика численности белого аиста на Воложинском стационаре в 2004–2018 гг.

Fig. 2. Dynamics of White Stork number at Volozhin plot in 2004–2018

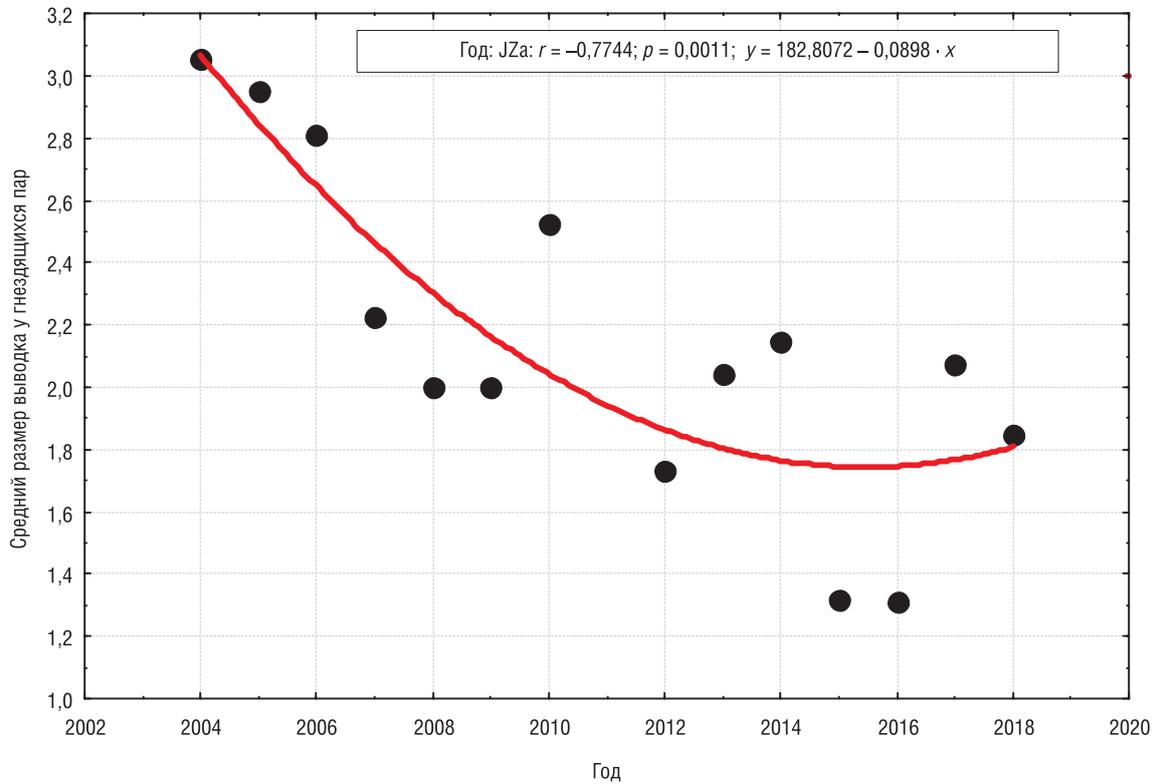


Рис. 3. Динамика среднего размера выводка гнездящихся пар белого аиста на Воложинском стационаре в 2004–2018 гг.

Fig. 3. Dynamics of average brood size in breeding pairs of White Stork at Volozhin plot in 2004–2018

Крайне низкий успех размножения в 2015–2016 гг., вероятно, вызван продолжительным периодом засухи, а улучшение успешности гнездования на протяжении последних двух сезонов размножения можно связать с более благоприятными климатическими и погодными условиями не только на территории стационара, но и в целом по стране.

О снижении репродуктивного успеха на территории мониторинговой площадки говорит и другой показатель: за время наших наблюдений в Воложинском районе постоянно росла доля неуспешных пар ($p < 0,05$). Если с 2004 по 2010 г. она варьировалась в пределах 4,8–15,0 %, то с 2012 по 2016 г. не имели потомства от 9,5 до 37,0 % приступивших к гнездованию пар. Основными причинами неуспешного гнездования были неблагоприятные погодные условия (сильный ветер, ливни), выбрасывание яиц или птенцов самими птицами (как реакция на ухудшение кормовой базы), а также разрушение гнезд на «нежелательных» для человека опорах. В 2017–2018 гг. все гнездящиеся пары имели вылетевших из гнезд птенцов, что говорит о некотором улучшении условий обитания вида.

На территории Воложинского стационара белые аисты гнездятся преимущественно на деревьях, опорах ЛЭП и водонапорных башнях. Так, если в первую половину периода наших исследований около 2/3 аистов гнездились на деревьях, то к 2018 г. доля таких гнезд сократилась до 42,9 %. Единственный случай устройства гнезда на крыше жилого дома был отмечен в а. г. Саковщина в 2015 г. Доля гнезд на водонапорных башнях за весь период исследований составила от 4,5 до 10,0 %. Напротив, стремительными темпами увеличивается количество птиц, гнездящихся на опорах ЛЭП: доля таких гнезд возросла в 3 раза – от 8,7 % в 2004 г. до 42,9 % в 2016 г. Такое явление, как смена предпочитаемых типов гнездовых опор, характерно для популяции белого аиста в целом, в том числе на территории Беларуси, хотя в отдельных регионах могут быть свои особенности, например в скорости данного процесса. В частности, до недавнего времени в центральной части Беларуси преобладающим типом опор являлись деревья, но с каждым годом доля таких гнезд уменьшается [2, 3].

Происходящие в выборе гнездовых опор изменения для группировки вида в центральной части Беларуси могут негативно отразиться на состоянии популяции вида, поскольку с ростом частоты использования для строительства гнезд хозяйственно важных конструкций усиливаются меры со стороны человека по предотвращению их использования из-за повышенного риска аварий на ЛЭП, возрастает вероятность гибели самих птиц от электроповреждений.

Заключение. В целом по результатам мониторинга белого аиста на территории площадки в Воложинском районе в 2004–2018 гг. можно судить о наблюдающемся в последние годы ряде негативных процессов. В частности, это выражается в сокращении численности вида при некотором территориальном перераспределении в границах участка. Значительное снижение репродуктивного потенциала во многом обусловлено естественными причинами, однако все более частое использование аистами для гнездования столбов ЛЭП усиливает негативное воздействие на популяцию антропогенных факторов.

Благодарности. Автор выражает благодарность преподавателям кафедры зоологии и кафедры общей экологии и методики преподавания биологии В. В. Гричику, А. В. Балашу, В. В. Сахвону, а также студентам биологического факультета БГУ, в различное время принимавшим участие в сборе информации о белом аисте на территории стационара: О. В. Лукшиц, И. И. Ротенко, М. Ю. Соловьевой, Е. М. Яшченко, О. М. Волоткевич, О. В. Гусаровой, О. С. Ежовой, Т. П. Липинской, Н. В. Удавидчик, А. В. Юрченко, В. А. Яковлеву, В. А. Асива, А. В. Костюкович, М. О. Стрельциной, С. И. Ханкевич, Л. А. Лекунович, Ю. М. Богдан, Я. К. Минич, Ю. П. Ефимович, В. А. Мищенко, Е. З. Гицевич, Т. Е. Коляго, Т. Г. Дунец, А. Р. Мамедову, Д. В. Посредник, Т. Г. Гакун, В. С. Костюниной, А. Е. Макаревич, Д. П. Ермакович, Д. А. Рамзаевой, Е. С. Синявской и А. А. Ветошкину.

Особую благодарность автор выражает И. Э. Самусенко за ценные советы при планировании исследования и за рекомендации по оформлению статьи.

Acknowledgements. The author expresses his gratitude to the lecturers of the Department of Zoology and the Department of General Ecology and the Methodology of Teaching Biology V. V. Grichik, A. V. Balash, V. V. Sahvon, as well as students of the Biological Faculty of the Belarusian State University who took part at various times information about the white stork in the hospital: O. V. Lukshits, I. I. Rotenko, M. Yu. Soloveva, E. M. Yashchenko, O. M. Volotkevich, O. V. Gusarova, O. S. Ezhova, T. P. Lipinskaya, N. V. Udavidchik, A. V. Yurchenko, V. A. Yakovlev, V. A. Asiva, A. V. Kostyukovich, M. O. Streltsina, S. I. Khankevich, L. A. Lekunovich, Yu. M. Bogdan, Ya. K. Minich, Yu. P. Efimovich, V. A. Mishchenkov, E. Z. Gitsevich, T. E. Kolyago, T. G. Dunets, A. R. Mamedov, D. V. Posrednik, T. G. Gakun, V. S. Kostyunina, A. E. Makarevich, D. P. Ermakovich, D. A. Ramzaeva, E. S. Sinyavskaya and A. A. Vetoshkin.

The author is especially grateful to I. E. Samusenko for valuable advice in planning the study and recommendations on the design of the article.

Список использованных источников

1. Основные результаты мониторинга белого аиста *Ciconia ciconia* в Воложинском районе Минской области (2004–2016 гг.) / А. В. Черноморец [и др.] // Зоологические чтения : сб. ст. междунар. науч.-практ. конф. (Гродно, 15–17 марта 2017 г.) / редкол. : О. В. Янчуревич (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 219–222.
2. Самусенко, И. Э. Значение поймы реки Припять для сохранения европейской популяции белого аиста *Ciconia ciconia* / И. Э. Самусенко // Проблемы рационального использования природных ресурсов и устойчивое развитие Полесья : сб. докл. Междунар. науч. конф. (Минск, 14–17 сент. 2016 г.) : в 2 т. / редкол. : В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 2. – С. 437–441.
3. Самусенко, И. Э. Предварительные итоги учета белого аиста *Ciconia ciconia* на территории Беларуси в 2014–2015 гг. / И. Э. Самусенко // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов : материалы III Междунар. конф., посвящ. 110-летию со дня рождения акад. Н. В. Смольского (7–9 окт. 2015 г., Минск) : в 2 ч. / редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2015. – Ч. 2. – С. 270–273.
4. Черноморец, А. В. Сравнительный анализ состояния и динамики популяции белого аиста в оптимальных и субоптимальных местообитаниях на территории Беларуси / А. В. Черноморец, И. Э. Самусенко // Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси : сб. ст. XI Зоол. Междунар. науч.-практ. конф. (г. Минск, 13 нояб. 2017 г.) : в 2 т. / редкол. : О. И. Бородин (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – Т. 1. – С. 407–416.
5. Schüz, E. Zur Methode der Storchforschung / E. Schüz // Beiträge zur Vogelkunde. – Leipzig, 1952. – Bd. 2. – S. 287–298.
6. Якубец, З. Международная методика учета аистов и замечания о программе и направлениях дальнейших исследований / З. Якубец, И. Самусенко // Аисты: распространение, экология, охрана : материалы II (Минск, окт. 1990 г.) и III (Канев, сент. 1991 г.) Всесоюз. совещ. рабочей группы по аистам Всесоюз. орнитол. о-ва / редкол. : И. Э. Самусенко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 1992. – С. 164–172.

References

1. Chernomorets A. V., Samusenko I. E., Grichik V. V., Balash A. V. Main results of monitoring of the White Stork *Ciconia ciconia* in the Volozhin district of the Minsk region (2004–2016). *Zoologicheskie chteniya: sbornik statei mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Grodno, 15–17 marta 2017 goda)* [Zoological readings: a collection of articles of the international scientific-practical conference (Grodno, March 15–17, 2017)]. Grodno, 2017, pp. 219–222 (in Russian).
2. Samusenko I. E. The importance of the Pripyat river floodplain for the preservation of the European population of the White Stork *Ciconia ciconia*. *Problemy ratsional'nogo ispol'zovaniya prirodnykh resursov i ustoychivoe razvitie Poles'ya: sbornik dokladov Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (Minsk, 14–17 sentyabrya 2016 goda). Tom 2* [Problems of rational use of natural resources and sustainable development of Polesie: a collection of reports of the International scientific conference (Minsk, September 14–17, 2016). Vol. 2]. Minsk, 2016, pp. 437–441 (in Russian).
3. Samusenko I. E. Preliminary results of accounting for White Stork *Ciconia ciconia* in Belarus in 2014–2015. *Problemy sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya i ispol'zovaniya biologicheskikh resursov: materialy III Mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchenoi 110-letiyu so dnya rozhdeniya akademika N. V. Smol'skogo (7–9 oktyabrya 2015 g., Minsk). Chast' 2* [Problems of conservation of biological diversity and use of biological resources: Proceedings of the III International conference dedicated to the 110th anniversary of the birth of Academician N. V. Smolsky (7–9 October 2015, Minsk). Pt. 2]. Minsk, 2015, pp. 270–273 (in Russian).
4. Chernomorets A. V., Samusenko I. E. Comparative analysis of the status and dynamics of White Stork population in optimal and suboptimal habitats on the territory of Belarus. *Aktual'nye problemy zoologicheskoi nauki v Belarusi: sbornik statei XI Zoologicheskoi Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Minsk, 1–3 noyabrya 2017 goda). Tom 1* [Actual problems of zoological science in Belarus: a collection of articles of the XI Zoological International scientific and practical conference (Minsk, 1–3 November 2017). Vol. 1]. Minsk, 2017, pp. 407–416 (in Russian).
5. Schüz E. Zur Methode der Storchforschung. *Beiträge zur Vogelkunde*. Leipzig, 1952, Bd. 2, S. 287–298.
6. Yakubets Z., Samusenko I. International methodology for storing Storks and comments on the program and directions for further research. *Aisty: rasprostraneniye, ekologiya, okhrana: materialy II (Minsk, oktyabr' 1990 goda) i III (Kanev, sentyabr' 1991 goda) Vsesoyuznykh soveshchaniy rabochei gruppy po aistam Vsesoyuznogo ornitologicheskogo obshchestva* [Storks: distribution, ecology, protection: materials II (Minsk, October 1990) and III (Kanev, September 1991) All-Union meetings of the working group on storks of the All-Union Ornithological Society]. Minsk, 1992, pp. 164–172 (in Russian).

Информация об авторе

Черноморец Анна Вадимовна – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: avchernomorets@mail.ru

Information about the author

Anna V. Chernomorets – Junior 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: avchernomorets@mail.ru

А. С. Пышко

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

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СОСТАВ ВОДНО-БОЛОТНЫХ ПТИЦ ПРИ РЕНАТУРАЛИЗАЦИИ ВЫРАБОТАННЫХ ТОРФЯНИКОВ

Аннотация. В работе приведены результаты исследований численности и пространственного распределения 17 видов водно-болотных птиц на территории торфоразработки «Докудовское» в Лидском районе Гродненской области в 2012–2018 гг. На основании анализа динамики популяционных показателей и изменений структуры местообитания выделены три основных фактора, воздействующих на сообщество птиц затопленного торфяника: гидрологический, биотопический и фактор беспокойства.

Ключевые слова: факторы, водно-болотные птицы, сукцессия, затопленный торфяник

Для цитирования: Пышко, А. С. Факторы, определяющие состав водно-болотных птиц при ренатурализации выработанных торфяников / А. С. Пышко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 478–483. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-478-483>

A. S. Pyshko

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

FACTORS DETERMINING THE COMPOSITION OF THE WETLAND COMMUNITY AT RENATURALIZATION OF THE DEVELOPED PEATBOARDS

Abstract. The paper presents the results of studies of the number and spatial distribution of 17 species of waterbirds on the territory of the “Dokudovskoye” peat development in the Lida district of the Grodno region. in 2012–2018. Based on the analysis of the dynamics of population indicators and changes in the structure of the habitat, three main factors affecting the bird community of the flooded peatland were identified: hydrological, biotopic, and disturbance factors.

Keywords: factors, wetland birds, succession, flooded peatland

For citation: Pyshko A. S. Factors determining the composition of the wetland community at renaturalization of the developed peatboards. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya byalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 478–483 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-478-483>

Введение. С начала XXI в. на территории Беларуси проводятся работы по искусственному восстановлению гидрологического режима отработанных торфяников («Торфяники-1», «Торфяники-2», «Ветландс») [1]. По результатам проведенных мероприятий на данных участках формируются водные угодья, которые активно заселяются представителями водно-болотной авифауны, а продолжающиеся сукцессии растительных комплексов на восстановленных участках способствуют постоянным изменениям сообщества водно-болотных птиц. В связи с этим необходимы организация постоянного орнитологического мониторинга, накопление многолетних данных по качественному и количественному составу населения птиц, их биологии.

Цель исследования – установление механизмов, определяющих динамику фауны на территории торфоразработки «Докудовское», для совершенствования методов управления как нарушенными, так и естественными природными объектами и обеспечения охраны птиц и ценных местообитаний.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на территории торфоразработки «Докудовское», расположенной в восточной части Лидского района Гродненской области. В 2007 г. часть отработанного торфяника площадью 2,74 км² подверглась искусственной ренатурализации путем вторичного заболачивания. Для этого были построены дамба протяженно-

стью около 1 км и два гидрорегулирующих сооружения. В итоге образовался непересыхающий в течение года водоем со сформированным зеркалом, началось образование участков болотной и водной растительности [2].

Изучение сообщества водно-болотных птиц проводили в южной части затопленного участка торфоразработки вблизи автомагистрали М6 «Минск–Гродно» с 2012 по 2018 г. (за исключением 2013–2014 гг.). Площадь мониторингового участка составила 1,3 км².

В 2012 г. территория мониторингового участка представляла собой водоем, который был пересечен сетью каналов и межкарьерными бровками – выступающими участками суши вдоль каналов. Длина каналов варьировалась от 90 до 300 м, а расстояние между ними составляло 90–200 м. Глубина воды достигала 0,5–1,5 м, а в каналах – 3 м. Сообщества надводной растительности на начальных стадиях были слабо сформированы, участки мелководий лишь местами поросли манником, крупными осоками, а также небольшими куртинами рогоза широколистного [2].

В 2015–2017 гг. вследствие прогрессирующего зарастания территории участка площадь открытой водной поверхности значительно сократилась [3]. Увеличилась площадь зарослей рогоза, а по северо-восточному периметру мониторинговой площадки сформировалась полоса тростников. Мелководные участки постепенно покрывались ивовым кустарником. Площадь межкарьерных бровок увеличилась, а рядом с ними начали образовываться сплавины. Сами бровки поросли ивняком и травянистой растительностью. Уровень воды по сравнению с 2012 г. несколько снизился [4].

В 2018 г. в результате увеличения территории участков надводной растительности площадь открытой водной поверхности сократилась – ее доля составляла 42 % от общей площади исследуемой территории. Заметно снизился уровень воды (глубина ее не превышала 1 м), и только в каналах она достигала 2 м.

Полевые работы проводили преимущественно в конце апреля – середине мая, в период наиболее массового гнездования водно-болотных птиц. Характер пребывания на данной территории и учеты численности водно-болотных птиц оценивали с использованием стандартных орнитологических методик, таких как маршрутные учеты (пешие вдоль береговой линии или по межкарьерным бровкам), абсолютные учеты (с использованием надувной резиновой лодки), картирование обнаруженных гнезд и мест локализации отдельных гнездовых пар и колониальных поселений.

Факторы, которые могли стать причиной изменений в сообществе водно-болотных птиц на территории затопленного торфяника, оценивали путем сравнительного анализа численности, видового разнообразия и территориального распределения водно-болотных птиц с динамикой биотических характеристик территории мониторингового участка.

Результаты и их обсуждение. Всего за период исследований на территории мониторингового участка установлено обитание 17 видов водно-болотных птиц, относящихся к четырем отрядам: Поганкообразные (Podicipedidae), Гусеобразные (Anseriformes), Ржанкообразные (Charadriiformes) и Журавлеобразные (Gruidae). Наиболее разнообразным был видовой состав гусеобразных – 10 видов. Остальные три отряда птиц были представлены 1–4 видами.

Установлено, что общая численность водно-болотных птиц на мониторинговой площадке на протяжении всего периода исследований неуклонно снижалась. Так, в 2012 г. она составляла 2662 пары, а в 2018 г. – всего 64 пары (рис. 1).

Видовой состав орнитофауны мониторингового участка, в отличие от численности, не подвергался столь значительным изменениям. Так, в 2012 г. здесь было зарегистрировано 14 видов, в 2016–2017 гг. разнообразие птиц достигло максимума – 17 видов, а в 2018 г. резко понизилось до 12 видов (рис. 2).

Резкое снижение к 2018 г. общей численности водно-болотных птиц обусловлено в первую очередь исчезновением крупной колонии озерной чайки (*Larus ridibundus*). Данный вид являлся доминантным в 2012–2017 гг., составляя более 80 % от общего числа учтенных пар. Резкое снижение численности озерной чайки в последнем сезоне обусловлено снижением привлекательности данного участка для размножения вида в результате прогрессирующей растительной сукцессии. У других представителей отряда ржанкообразных (речной (*Sterna hirundo*), черной (*Chlidonias nigra*) и белошекой крачек (*Chlidonias hybrida*)) также наблюдалась отрицательная динамика численности.

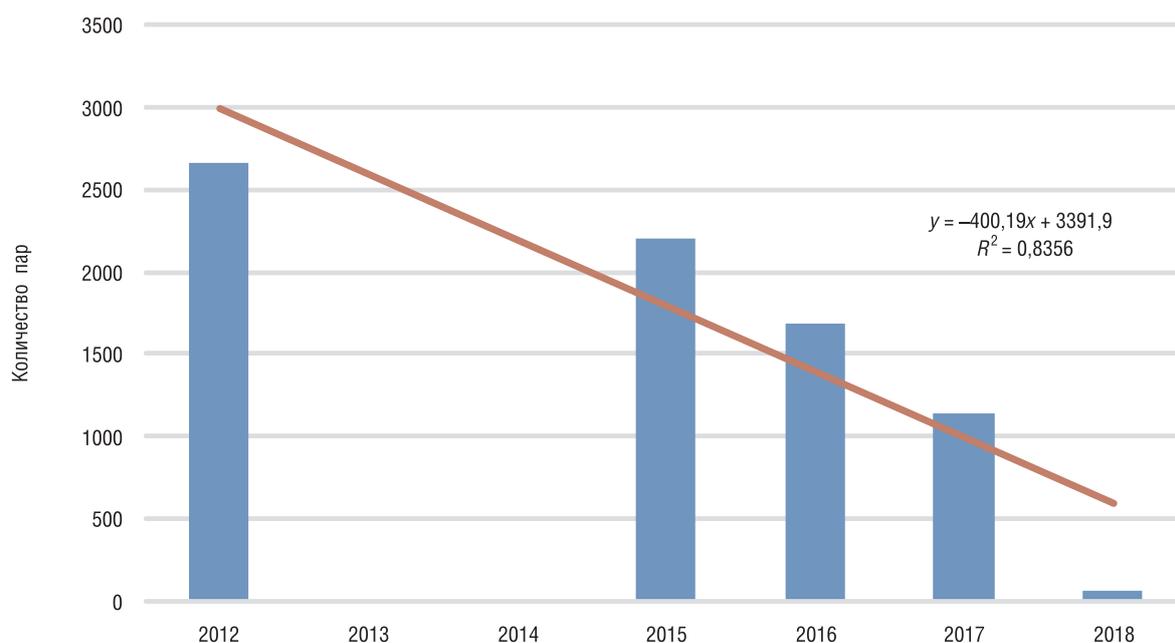


Рис. 1. Динамика численности водно-болотных птиц на мониторинговой площадке

Fig. 1. Dynamics of waterfowl numbers on the monitoring plot

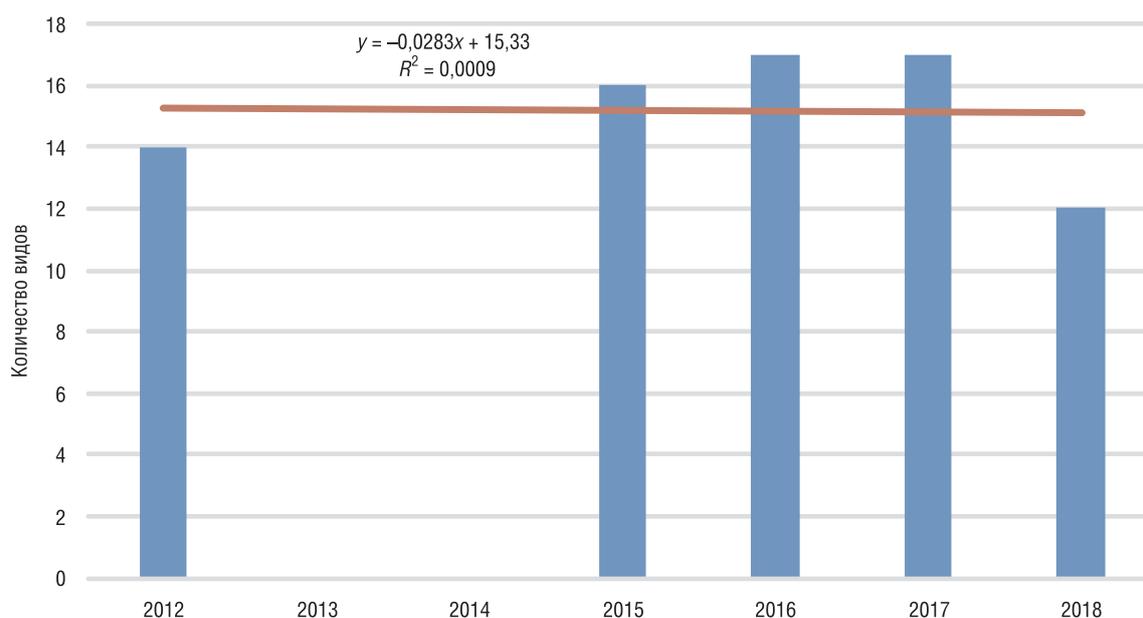


Рис. 2. Динамика видового разнообразия водно-болотных птиц на мониторинговой площадке

Fig. 2. Dynamics of species diversity of waterfowl at the monitoring plot

В 2018 г. отмечалось полное исчезновение достаточно крупной колонии черношейной поганки (*Podiceps nigricolis*), численность которой варьировалась в 2012–2017 гг. от 45 до 70 гнездящихся пар. Данный вид тесно взаимосвязан с озерной чайкой в период гнездования [5]. Поэтому очевидно, что исчезновение черношейной поганки происходило параллельно с деградацией колонии озерной чайки.

Негативный тренд численности отмечен также для лысухи (*Fulica atra*), численность которой катастрофически снизилась: с 25 пар в 2012 г. до 2 пар в 2018 г.

Заращение водной поверхности отрицательно сказалось и на большинстве видов утиных. Так, численность наиболее массового вида этой группы – кряквы (*Anas platyrhynchos*) – снизилась почти в 3 раза: с 30 пар в 2012 г. до 13 пар в 2018 г. Количество гнездящихся пар красно-

головой чернети (*Aythya ferina*) снизилось с 6 пар в 2012 г. до 4 пар в 2018 г. Численность хохлатой чернети (*Aythya fuligula*) на начальных этапах исследования достигала 10 пар, а к 2018 г. данный вид исчез с территории. Сокращение численности кряквы, хохлатой и красноглазой чернетей, видимо, явилось следствием уменьшения площади открытой водной поверхности, где предпочитают кормиться данные виды. Другие представители утиных – чирок-трескунок (*Anas querquedula*) и серая утка (*Anas strepera*) – гнездились на данной территории в 2012–2017 гг. с достаточно стабильной, хоть и невысокой, численностью: 2–4 и 1–5 пар соответственно. Однако в 2018 г. чирок-трескунок исчез с данной территории, а численность серой утки вновь снизилась до минимума.

С другой стороны, происходящие на мониторинговой площадке растительные сукцессии способствовали росту численности некоторых видов и привлекли ранее не обитавших на данной территории птиц, способствуя увеличению видового разнообразия водно-болотных птиц по крайней мере до 2016–2017 гг. В частности, численность большой поганки (*Podiceps cristatus*) за весь период исследований увеличилась в 2 раза – от 6 до 12 пар. В 2015 г. список обитателей обследуемой территории пополнился широконосой (*Anas clypeata*) и серым гусем (*Anser anser*), а в 2016 г. – свизью (*Anas penelope*). Следует отметить, что за период исследований постоянно регистрировали пару лебедей-кликунов (*Cygnus cygnus*) и от 2 до 4 пар лебедя-шипуну (*Cygnus olor*). Примечательно, что в 2017 г., когда было обнаружено 4 пары шипуна, минимальное расстояние между соседними жилыми гнездами составляло 30 м.

В целом, на основании анализа динамики численности и видового состава водно-болотных птиц, а также биотопической структуры территории мониторингового участка было выделено три группы факторов, которые способствовали изменениям орнитофауны, – гидрологический, биотопический и фактор беспокойства.

Гидрологический фактор. Возведенные в ходе ренатурализации отработанного торфяника гидрорегулирующие сооружения были предназначены для поддержания уровня воды на относительно постоянном уровне. Однако в период наших исследований уровень воды затопленной торфоразработки значительно колебался в зависимости от климатических условий конкретного сезона, в первую очередь – от уровня и продолжительности весеннего паводка [6]. Так, в 2012 г. уровень воды держался на отметке 1–1,5 м, а глубина в каналах достигала 3 м. В период с 2015 по 2017 г. при некоторых колебаниях произошло его незначительное снижение – уровень воды держался в основном на отметке в 1 м [2], однако в каналах он оставался без изменений. Это связано с неустойчивыми гидрологическими показателями за этот период. Весенний паводок заканчивался к началу второй декады апреля, а количество осадков держалось на среднем уровне. Однако в мае 2017 г., в частности в начале мая, фиксировались ночные заморозки и количество осадков было ниже нормы, что приводило к снижению уровня воды в реках и озерах [7]. В 2018 г. тенденция продолжилась и уровень воды не превышал 1 м. Даже в каналах наблюдалось его снижение с 3 до 2 м. Такое значительное падение уровня воды по сравнению с таковым в 2012 г. стало результатом засушливых погодных условий в мае. В то же время, несмотря на то что, по данным гидрометцентра Беларуси, уровень воды в реках и водоемах в конце апреля превышал среднестатистическую норму, в последующем он значительно снизился [7].

Биотопический фактор. В результате происходящих на мониторинговой площадке гидрологических изменений увеличилась площадь межкарьерных бровок и мелководных участков, начали появляться новые участки суши (островки) и сплавины. Сказалось это и на характере распределения водной и надводной растительности, что выразилось в прогрессирующем зарастании модельного участка. В процессе сукцессионных изменений происходило увеличение территории участков надводной растительности, что влекло за собой уменьшение площади открытой водной поверхности, которая в 2012 г. составляла около 70 % от общей площади мониторинговой площадки, а в 2018 г. – 42 %. Повышенное увлажнение почвы на открытых участках способствовало быстрому зарастанию территории травянистой и древесно-кустарниковой растительностью. Сукцессионные изменения сказались на численности и видовом разнообразии обитающих здесь представителей водно-болотной орнитофауны.

Фактор беспокойства – еще один важный фактор, который мог влиять на сообщество водно-болотных птиц на мониторинговой площадке. Наличие у границы территории оживленной

трассы М6 Минск – Гродно позволило добираться сюда жителям других деревень и городов, а в результате изменения гидрорежима участка данная территория стала более посещаемой. Это повлекло за собой увеличение негативного антропогенного воздействия на гнездящихся водно-болотных птиц. Прежде всего, частое вспугивание неизбежно нарушает ритм суточной активности животного – прерывает его отдых, добывание пищи и т. п. [8]. Приближение человека заставляет населяющую особь слетать с кладки, вызывает волнение у птиц, что может привести к хаосу, в результате которого могут быть разрушены гнезда или утоплена часть яиц. Неосторожность людей также может стать причиной разрушения гнезд и уничтожения кладок. Таким образом, фактор беспокойства мог оказать дополнительное отрицательное воздействие на большинство видов (в частности, таких, как озерная чайка, черношейная поганка, лысуха и др.), значительно снизивших численность. Так, лысуха предпочитает располагать гнезда в прибрежной полосе зарослей рогаза, тростника и камыша. У озерной чайки гибель птенцов при беспокойстве колонии может достигать серьезных масштабов в результате агрессивного поведения взрослых по отношению к чужим птенцам [9]. Кроме того, с увеличением доступности данной территории воздействие факторов беспокойства на птиц также возрастало, что в конечном итоге могло влиять как на выбор места для размножения, так и на численность вида в общем.

Заключение. Таким образом, нами выявлен ряд факторов, которые влияли на изменения в сообществе водно-болотных птиц на территории заболоченной торфоразработки. Все они оказывали комплексное воздействие, причем изменение степени влияния одного фактора могло изменять силу воздействия другого. Следует также отметить неодинаковое воздействие различных факторов на разные виды водно-болотных птиц. Так, в результате изменения гидрорежима, который способствовал растительным сукцессиям (зарастанию территории), уменьшилась численность видов птиц, нуждающихся в значительной обводненности местообитания (озерная чайка, черношейная поганка, лысуха, кряква, нырковые утки и др.). Однако при этом были созданы новые условия (кормовые, защитные), благоприятные для таких видов, таких как серый гусь, лебедь-кликун и большая поганка.

Список использованных источников

1. Отчет о реализации проекта ПРООН/ГЭФ «Ренатурализация и устойчивое управление торфяными болотами для предотвращения деградации земель, изменений климата и обеспечения сохранения глобально значимого биологического разнообразия». – Минск, 2010. – 47 с.
2. Гричик, В. В. Численность и особенности биологии массовых видов водоплавающих и околоводных птиц отработанных торфяных карьеров «Докудовское» после их повторного заболачивания / В. В. Гричик, А. С. Пышко // Зоологические чтения : сб. ст. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. К. М. Ельского (Гродно, 15–17 марта 2017 г.) / редкол. : О. В. Янчуревич (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 72–73.
3. Пышко, А. С. Видовой состав и динамика численности водно-болотных птиц на территории ренатуризованных торфяных месторождений (на примере торфоразработки «Докудовское») / А. С. Пышко, В. В. Гричик // Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси : материалы XI Зоол. Междунар. науч.-практ. конф. (г. Минск, 1–3 нояб. 2017 г.) : в 2 т. / редкол. : О. И. Бородин (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – Т. 1. – С. 336–341.
4. Гричик, В. В. Гнездящиеся водоплавающие и околоводные птицы отработанных торфоразработок на ранних стадиях ренатурализации / В. В. Гричик, А. С. Пышко // Рус. орнитол. журн. – 2017. – Т. 26, № 1515. – С. 4415–4422.
5. Лямехов, Ю. Г. Биология гнездовой жизни колониальных видов птиц (на примере черношейной поганки и озерной чайки) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.08 / Ю. Г. Лямехов ; Перм. гос. пед. ун-т. – Пермь, 1998. – 17 с.
6. Чудненко, Д. Е. Факторы, определяющие сукцессию орнитокомплексов торфоразработок Восточного Верхневолжья / Д. Е. Чудненко // Вестн. Костром. гос. ун-та. им. Н. А. Некрасова. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 16–18.
7. MeteoInfo.by [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://meteoinfo.by/news/>. – Дата доступа : 08.09.2018.
8. Юргенсон, П. Б. Роль фактора беспокойства в экологии зверей и птиц / П. Б. Юргенсон // Рус. орнитол. журн. – 2013. – Т. 22, № 891. – С. 1683–1689.
9. Птицы СССР. Чайковые / В. О. Авданин [и др.] ; отв. ред. : В. Д. Ильичев, В. А. Зубакин. – М. : Наука, 1988. – 414 с.

References

1. *Renaturalization and sustainable management of peat bogs to prevent land degradation, climate change and ensure conservation of globally significant biological diversity*. Minsk, 2010. 47 p. (in Russian).
2. Grichik V. V., Pyshko A. S. *Number and peculiarities of the biology of mass species of waterfowl and waterbirds of the dug peat pits "Dokudovskoe" after their repeated bogging*. *Zoologicheskie chteniya: sbornik statei mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi pamyati professora K. M. El'skogo (Grodno, 15–17 marta 2017 goda)*

[Zoological readings: a collection of articles of the international scientific-practical conference dedicated to the memory of Professor K. M. Yelsky (Grodno, March 15–17, 2017)]. Grodno, 2017, pp. 72–73 (in Russian).

3. Pyshko A. S., Grichik V. V. Species composition and dynamics of the number of waterbird birds in the territory of renaturalized peat deposits (for example, peat extraction «Dokudovskoe»). *Aktual'nye problemy zoologicheskoi nauki v Belarusi: materialy XI Zoologicheskoi Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Minsk, 1–3 noyabrya 2017 goda). Tom 1* [Actual problems of zoological science in Belarus: materials of the XI Zoological International scientific and practical conference (Minsk, 1–3 November 2017). Vol. 1]. Minsk, 2017. 336 p. (in Russian).

4. Grichik V. V., Pyshko A. S. Nesting waterfowl and waterbirds of spent peat extraction in the early stages of renaturalization. *Russkii ornitologicheskii zhurnal* [Russian ornithological journal], 2017, vol. 26, no. 1515, pp. 4415–4422 (in Russian).

5. Lyamekhov Yu. G. *Biology of nesting life of colonial bird species (on the example of black-eared toadstool and black-headed gull)*. Abstract of Ph. D. diss. Permian, 1998. 17 p. (in Russian).

6. Chudnenko D. E. Factors determining the succession of the ornithocomplexes of peat cultivation in the Eastern Upper Volga Region]. *Vestnik Kostromskogo gosudarstvennogo universiteta imeni N. A. Nekrasova* [Bulletin of the Kostroma State University named after N. A. Nekrasov], 2007, vol. 13, no. 1, pp. 16–18 (in Russian).

7. *MeteoInfo.by*. Available at: <http://meteoinfo.by/news/> (accessed 08.09.2018) (in Russian).

8. Yurgenson P. B. Role of the factor of concern in the ecology of animals and birds. *Russkii ornitologicheskii zhurnal* [Russian ornithological journal], 2013, vol. 22, no. 891, pp. 1683–1689 (in Russian).

9. Avdanin V. O., Avdanin V. O., Viksne Ya. A., Zubakin V. A., Kishchinskii A. A., Litvinenko N. M. [et al.]. *Birds of the USSR. Seagulls*. Moscow, Nauka Publ., 1988. 414 p. (in Russian).

Информация об авторе

Пышко Александр Сергеевич – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleksandr.ph95@gmail.com

Information about the author

Alexander S. Pyshko – Junior 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: aleksandr.ph95@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 591.533:595.76:633.853.494

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-484-487>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

Лянь Уян

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

ВИДОВОЙ СОСТАВ ЖЕСТКОКРЫЛЫХ (COLEOPTERA) НА ПОСЕВАХ ЯРОВОГО РАПСА В БЕЛАРУСИ

Аннотация. В результате проведенных исследований выявлен видовой состав жесткокрылых (Coleoptera) на посевах ярового рапса в разные летние месяцы 2016 и 2017 гг. Установлено, что видовое разнообразие жесткокрылых зависит от времени сбора образцов. В 2016 и 2017 гг. на опытных полях обнаружены представители 9 семейств жесткокрылых (блестянки, божьи коровки, быстрянки, скрытники, скрытноеды, мягкотелки, мертвоеды, карапузики и шелкоуны), в том числе 27 видов жуков.

Ключевые слова: жесткокрылые, семейство, род, вид, блестянки, божьи коровки

Для цитирования: Лянь Уян. Видовой состав жесткокрылых (Coleoptera) на посевах ярового рапса в Беларуси / Лянь Уян // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, №4. – С. 484–487. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-484-487>

Lian Wuyang

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

SPECIES COMPOSITION OF BEETLES (COLEOPTERA) ON THE FIELDS OF SPRING RAPE IN BELARUS

Abstract. It was identified the species composition of beetles (Coleoptera) on the fields of spring rape was revealed in different months of the summer periods of 2016 and 2017. A conclusion is made about the dependence of the species diversity of coleopterans on the collection time of the samples. In 2016 and 2017 years on the experimental fields, representatives of 9 families of Coleoptera were found: sap beetles (Nitidulidae), ladybird beetles (Coccinellidae), antlike flower beetles (Anthicidae), minute scavenger beetles (Latridiidae), silken fungus beetles (Cryptophagidae), soldier beetles (Cantharidae), burying beetles (Silphidae), clown beetles (Histeridae) and click beetles (Elateridae). A total of them were 27 species of beetles.

Keywords: coleoptera, family, genus, species, litters, ladybugs

For citation: Wuyang Lian. Species composition of beetles (Coleoptera) on the fields of spring rape in Belarus. *Vestsii Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya byalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 484–487 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-484-487>

Введение. Насекомые составляют более 80 % от всех известных в мире видов животных. Являясь важной частью агроэкосистем, они участвуют в регулировании многих биологических процессов, тесно связанных с функционированием экосистемы.

Биом представляет собой структурную единицу, состоящую из различных биологических популяций в определенном регионе. Изучение сообщества членистоногих – важная составляющая борьбы с вредителями. В агроэкосистеме сообщество членистоногих представлено различными трофическими группами, включающими сапрофагов, фитофагов и зоофагов. Именно зоофаги, в частности жужелицы, являются хищниками и уничтожают вредителей сельхозкультур.

В настоящее время профилактика и борьба с вредителями по-прежнему основываются на применении химических средств. По нашему мнению, в борьбе с вредителями должны применяться биологические методы [1, 2]. Жужелицы как составная часть зооценоза представляют собой интерес с точки зрения борьбы с вредителями, а изучение их видового состава является важной задачей для проведения биологических методов борьбы [3–5].

Изучение популяционной структуры сообщества членистоногих на посевах рапса проводится в целях обеспечения и осуществления экологического контроля вредителей. Такие исследова-

ния имеют важное научное и теоретическое значение для выращивания ценных сельскохозяйственных культур.

Цель данной работы – изучение динамики сезонной структуры жесткокрылых на посевах ярового рапса в разные летние месяцы 2016, 2017 гг.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на территории г. п. Прилуки (Минский район) на полях, принадлежащих Институту защиты растений НАН Беларуси. Сезонную динамику активности насекомых изучали в агроценозе ярового рапса. Для отлова активных на поверхности почвы беспозвоночных использовали почвенные ловушки Барбера (в 2016 и 2017 гг. по 20 ловушек соответственно). Время посева ярового рапса на поле 2016 г. – 13 мая, а время сбора – 28 августа. Время посева рапса в 2017 г. – 16 мая, а сбора урожая – 14 сентября.

Результаты и их обсуждение. В летний период с 16 июня по 15 июля 2016 г. на опытном поле обнаружены представители 9 семейств жесткокрылых: блестянки, божьи коровки, быстрянки, скрытники, скрытноеды, мягкотелки, мертвоеды, карапузики и щелкуны. Эти семейства отнесены нами к редким. Представителей этих семейств собрано в общей сложности 47 экз. Блестянки представлены двумя родами – *Glischrochilus* (Reitter, 1873) и *Meligethes* (Stephens, 1830), тремя видами – *G. grandis* (Tournier, 1872), *M. aeneus* (Fabricius, 1775) и *M. denticulatus* (Heer, 1841). Быстрянки представлены двумя родами – *Anthicus* (Paykull, 1798) и *Notoxus* (Geoffroy, 1762), двумя видами – *A. antherinus* (Linnaeus, 1760) и *N. monoceros* (Linnaeus, 1761). Божьи коровки представлены только одним родом – *Coccinella* (Linnaeus, 1758) и видом *C. septempunctata* (Linnaeus, 1758). Скрытники представлены двумя родами – *Corticarina* (Reitter, 1881) и *Stephostethus* (Le Conte, 1878), двумя видами – *C. minuta* (Fabricius, 1792) и *S. lardarius* (De Geer, 1775). Скрытноеды представлены только родом – *Atomaria* (Stephens, 1829) с одним видом – *A. fuscata* (Schönherr, 1808). Мягкотелки представлены двумя родами – *Ancistronycha* (Markel, 1851) и *Cantharis* (Linnaeus, 1758), двумя видами – *A. cyanipennis* (Faldermann, 1835), *C. rustica* (Fallen, 1807). Мертвоеды представлены одним родом – *Silpha* (Latreille, 1807) и единственным видом – *S. obscura* (Linnaeus, 1758). Карапузики представлены также одним родом – *Margarinotus* (Marseul, 1853) и единственным видом – *M. ventralis* (Marseul, 1854). Щелкуны представлены только родом *Agriotes* (Eschscholtz, 1829) с одним видом – *A. lineatus* (Linnaeus, 1767). Среди всех видов доминируют *M. aeneus* (38,3 %) и *C. septempunctata* (14,9 %).

С 15 июля по 12 августа 2016 г. на опытном поле обнаружены представители 5 семейств: блестянки, божьи коровки, скрытники, скрытноеды и мертвоеды. Представителей этих семейств было собрано в общей сложности 37 экз. Блестянки представлены двумя родами – *Glischrochilus* и *Meligethes*, двумя видами – *G. grandis* и *M. aeneus*. Божьи коровки представлены родом *Propylea* (Mulsant, 1846) – *P. quatuordecimpunctata* (Linnaeus, 1758). Скрытники представлены двумя родами – *Corticarina* и *Enicmus* (C.G. Thomson, 1859), тремя видами – *C. gibbosa* (Herbst, 1793) и *C. minuta*, *E. transversus* (Olivier, 1790). Скрытноеды представлены тремя родами – *Antherophagus* (Dejean, 1821), *Atomaria* и *Cryptophagus* (Herbst, 1863), четырьмя видами – *An. pallens* (Linnaeus, 1758), *At. analis* (Erichson, 1846), *At. fuscata* и *C. denticulatus* (Heer, 1841). Мертвоеды представлены двумя родами – *Nicrophorus* (Fabricius, 1775) и *Silpha*, двумя видами – *N. vespillo* (Linnaeus, 1758), *S. obscura*. Среди всех видов доминируют *P. quatuordecimpunctata* (16,2 %), *M. aeneus* (18,9 %), *C. minuta* (27 %).

Проведенный анализ популяции жесткокрылых с начала и в конце лета 2016 г. показал, что в течение всего летнего периода доминируют следующие виды семейств: блестянки – 35,7 %, скрытники – 20,2 %, божьи коровки – 15,5 %. Среди видов доминируют *M. aeneus* (29,8 %) и *C. minuta* (11,9 %).

В летний период с 23 июня по 11 августа 2017 г. на опытном поле обнаружены представители 5 семейств: блестянки, скрытники, скрытноеды, мягкотелки и щелкуны. Представителей этих семейств было собрано в общей сложности 66 экз. Блестянки представлены одним родом – *Meligethes*, тремя видами – *M. aeneus*, *M. ater* (Brisout de Barneville, 1863) и *M. denticulatus*. Скрытники представлены тремя родами – *Corticarina*, *Enicmus* и *Stephostethus*, четырьмя видами – *C. Gibbosa*, *C. minuta*, *E. transversus* и *S. lardarius*. Скрытноеды представлены двумя родами – *Atomaria* и *Cryptophagus*, двумя видами – *A. fuscata*, *C. denticulatus*. Мягкотелки представлен только родом *Cantharis* – *C. lateralis* (Linnaeus, 1758). Щелкуны представлены двумя родами – *Adrastus* и *Agriotes*, тремя видами – *Ad. Pallens*, *Ad. Rachifer* и *Ag. ustulatus*. Среди всех видов доминируют *Ad. pallens* (21,2 %) и *M. aeneus* (42,4 %).

С 11 августа по 4 сентября 2017 г. на опытном поле обнаружены представители 5 семейств: блестянки, быстрянки, скрытники, скрытноеды, щелкуны. Представителей этих семейств было собрано в общей сложности 55 экз. Блестянки представлены двумя родами – *Glischrochilus* и *Meligethes*, четырьмя видами – *G. Grandis*, *M. aeneus*, *M. denticulatus* и *M. flavimanus* (Stephens, 1830). Быстрянки представлены только родом *Anthicus* с единственным видом *A. antherinus*. Скрытники представлены одним родом – *Corticarina*, двумя видами – *C. gibbosa* и *C. minuta*. Скрытноеды представлены двумя родами – *Atomaria* и *Cryptophagus*, двумя видами – *A. fuscata*, *C. denticulatus*. Щелкуны представлены двумя родами – *Adrastus* и *Agriotes*, двумя видами – *Ad. pallens*, *Ag. ustulatus*. Среди всех видов доминируют: *C. minuta* (14,5 %), *C. denticulatus* (21,8 %), *M. aeneus* (36,4 %).

Анализ популяции жесткокрылых в начале и в конце лета 2017 г. показал, что в течение всего летнего периода доминируют виды следующих семейств: скрытноеды – 14,9 %, щелкуны – 17,4, скрытники – 19,8, блестянки – 44,6 %. Среди всех видов доминируют *C. denticulatus* (10,7 %), *Ad. pallens* (11,6 %) и *M. aeneus* (39,7 %).

Результаты исследования показали, что количество видов жесткокрылых, собранных в 2016 г., были выше, чем в 2017 г. За весь период исследований доминировал вид *Meligethes aeneus* – рапсовый цветоед (38 % от общего количества собранных жесткокрылых (см. таблицу).

Видовой состав жесткокрылых на посевах ярового рапса в 2016 и 2017 гг.

Species composition of beetles on the fields of spring rape in 2016 and 2017

Семейство	Род	Вид	2016 г.		2017 г.	
			Июнь–июль	Июль–август	Июнь–август	Август–сентябрь
Блестянки	<i>Glischrochilus</i>	<i>G. grandis</i>	+	+	–	+
		<i>Meligethes</i>	<i>M. aeneus</i>	+	+	+
	<i>M. ater</i>		–	–	+	–
	<i>M. denticulatus</i>		+	–	+	+
	<i>M. flavimanus</i>	–	–	–	+	
Божьи коровки	<i>Coccinella</i>	<i>C. septempunctata</i>	+	–	–	–
	<i>Propylea</i>	<i>P. quatuordecimpunctata</i>	–	+	–	–
Быстрянки	<i>Anthicus</i>	<i>A. antherinus</i>	+	–	–	+
	<i>Notoxus</i>	<i>N. monoceros</i>	+	–	–	–
Скрытники	<i>Corticarina</i>	<i>C. minuta</i>	+	+	+	+
		<i>C. gibbosa</i>	–	+	+	+
	<i>Enicmus</i>	<i>E. transversus</i>	–	+	+	–
	<i>Stephostethus</i>	<i>S. lardarius</i>	+	–	+	–
Скрытноеды	<i>Antherophagus</i>	<i>An. pallens</i>	–	+	–	–
	<i>Atomaria</i>	<i>A. analis</i>	–	+	–	–
		<i>A. fuscata</i>	+	+	+	+
	<i>Cryptophagus</i>	<i>C. denticulatus</i>	–	+	+	+
Мягкотелки	<i>Ancistronycha</i>	<i>A. cyanipennis</i>	+	–	–	–
	<i>Cantharis</i>	<i>C. lateralis</i>	–	–	+	–
		<i>C. rustica</i>	+	–	–	–
Мертвояды	<i>Necrophorus</i>	<i>N. vespillo</i>	–	+	–	–
	<i>Silpha</i>	<i>S. obscura</i>	+	–	–	–
Карапузики	<i>Margarinotus</i>	<i>M. ventralis</i>	+	–	–	–
Щелкуны	<i>Adrastus</i>	<i>Ad. pallens</i>	–	–	+	+
		<i>Ad. rachifer</i>	–	–	+	–
	<i>Agriotes</i>	<i>A. lineatus</i>	+	–	–	–
		<i>Ag. ustulatus</i>	–	–	+	+

П р и м е ч а н и е. «+» – есть, «–» – нет.

Заклучение. Таким образом, установлено, что большинство насекомых, собранных во время эксперимента, были фитофагами. За весь период исследований доминировал вид *Meligethes aeneus* – рапсовый цветоед (38 % от общего количества собранных жесткокрылых).

Список использованных источников

1. Бабабекова, Л. А. Сезонная динамика активности почвообитающих насекомых в разных звеньях агробиоценоза / Л. А. Бабабекова, Н. Г. Самедов // Проблемы почвенной зоологии: материалы IV Всесоюз. совещ., Баку, 1972 г. / отв. ред. М. С. Гиляров. – М., 1972. – С. 19.
2. Григорьева, Т. Г. Влияние обработки почвы на фауну пшеничного поля / Т. Г. Григорьева // Проблемы почвенной зоологии: материалы IV Всесоюз. совещ., Баку, 1972 г. / отв. ред. М. С. Гиляров. – М., 1972. – С. 42.
3. Бельская, Е. А. Жужелицы в агроценозе яровой пшеницы на юге свердловской области и влияние некоторых средств химизации на их популяции / Е. А. Бельская, Е. В. Зиновьев, М. А. Козырев // Экология. – 2002. – № 1. – С. 42–49.
4. Блинцов, А. И. Изменение почвенной мезофауны под влиянием инсектицидов / А. И. Блинцов // Проблемы почвенной зоологии: тез. докл. VII Всесоюз. совещ. (Киев, 1981 г.) / отв. ред. В. Г. Долин. – Киев, 1981. – С. 33–34.
5. Добровольский, Б. В. Решение проблемы защиты растениеводства СССР от проволочников / Б. В. Добровольский // Почвенная фауна и почвенное плодородие: тр. 9-го Междунар. коллоквиума по почв. зоологии, Москва, 16–20 авг. 1985 г. / отв. ред. Б. Р. Стриганова. – М., 1987. – С. 310–311.

References

1. Bababekova L. A., Samedov N. G. Seasonal dynamics of activity of soil-inhabiting insects in different links of agrobiocenosis. *Problemy pochvennoi zoologii: materialy IV vsesoyuznogo soveshchaniya (Baku, 1972 god)* [Problems of soil zoology: materials of the IV All-Union Conference (Baku, 1972)]. Moscow, 1972, p. 19 (in Russian).
2. Grigoryeva T. G. Effect of soil cultivation on the wheat field fauna. *Problemy pochvennoi zoologii: materialy IV vsesoyuznogo soveshchaniya (Baku, 1972 god)* [Problems of soil zoology: materials of the IV All-Union conference (Baku, 1972)]. Moscow, 1972, p. 42 (in Russian).
3. Belskaya E. A., Zinovev E. V., Kozyrev M. A. Carabids in a spring wheat agrocenosis to the south of Sverdlovsk oblast and the effect of insecticide treatment on their populations. *Ekologiya [Ecology]*, 2002, no. 1, pp. 42–49. <https://doi.org/10.1023/A:1013671722178> (in Russian).
4. Blintsov A. I. Changes in soil mesofauna under the influence of insecticides. *Problemy pochvennoi zoologii: tezisy dokladov VII Vsesoyuznogo soveshchaniya (Kiev, 1981 god)* [Problems of soil zoology: Abstracts of the VII All-Union conference (Kiev, 1981)]. Kiev, 1981, pp. 33–34 (in Russian).
5. Dobrovolsky B. V. Solution of the problem of protecting the plant growing of the USSR from wireworms. *Pochvennaya fauna i pochvennoe plodorodie: trudy 9-go Mezhdunarodnogo kollokviuma po pochvennoi zoologii (Moskva 16–20 avgusta 1985 goda)* [Soil fauna and soil fertility: works of the Ninth International colloquium on soil zoology (Moscow, August 16–20, 1985)]. Moscow, 1987, pp. 310–311 (in Russian).

Информация об авторе

Лянь Уян – аспирант. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 1053776457@qq.com

Information about the author

Lian Wuyang – Postgraduate student. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 1053776457@qq.com

М. С. Шабета

Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СОЗОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БРИОКОМПОНЕНТА ЛИСТВЕННЫХ ЛЕСОВ БЕЛАРУСИ

Аннотация. В статье представлен созологический анализ бриокомпонента лиственных лесов в пределах Беларуси. Вывлено 270 видов мохообразных (отдел Briobionta), из которых 63 – печеночники (отдел Marchantiophyta) и 207 – мхи (отдел Bryophyta). В настоящее время 94 вида являются в разной степени редкими или слабо изученными, в том числе 13 охраняемых видов и 13 видов, нуждающихся в профилактической охране.

Ключевые слова: бриофлора, мохообразные, мхи, печеночники, созологический анализ, лиственные леса

Для цитирования: Шабета, М. С. Созологический анализ бриокомпонента лиственных лесов Беларуси / М. С. Шабета // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 488–491. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-488-491>

M. S. Shabeta

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

SOZOLOGICAL ANALYSIS OF THE BIOC COMPONENT BELARUSIAN FORESTRY

Abstract. The sociological analysis of the briocomponent of deciduous forests within Belarus is presented in the article. There are 270 species of bryophytes (Bryobionta), 63 of which are liverworts (Marchantiophyta) and 207 mosses (Bryophyta). 94 species are at present to some extent rare or have long been not found, including 13 rare species, and 13 – species in need of preventive protection.

Keywords: bryoflora, bryophytes, mosses, liverworts, sozological analysis, deciduous forests

For citation: Shabeta M. S. Sozological analysis of the biocomponent Belarusian forestry. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 488–491 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-488-491>

Введение. В природных комплексах Беларуси лиственные леса относятся к наиболее экологически сложным сообществам, и для их детальной характеристики необходимо изучение всех их составляющих, в частности бриокомпонента. Спецификой лиственных лесов является менее развитый, чем у хвойных, напочвенный моховой покров, что связано с ежегодным обильным листовым опадом в первых. Для лиственных сообществ также имеет важное значение сезонное изменение микроклимата в осенне-зимний период. Также в данных сообществах сравнительно с хвойными наиболее развита эпифитная бриосоставляющая на высоковозрастных древостоях, исторически связанная с позднедетритными лиственными лесами. Прежде всего это относится к группе широколиственных лесов, имеющих наиболее благоприятные условия для поселения мохообразных на коре древесных растений. Данный комплекс видов мохообразных дополняет и разнообразит бриофлору Беларуси в целом и в связи с его ценотической спецификой заслуживает детального изучения.

Материалы и методы исследования. Использованы собственные бриологические сборы. Определение мохообразных проводилось по стандартным методикам с использованием фундаментальных изданий цикла «Флора Беларуси» по мохообразным [1], а также монографической работы М. С. Игнатова, Е. А. Игнатовой [2]. Классификация таксонов и цитирование видовых названий приводятся согласно современной таксономии [3, 4] с некоторой корректировкой [5, 6]. Авторы таксонов не указываются, но соответствуют данным источникам.

Результаты и их обсуждение. В составе листовных сообществ Беларуси выявлено 270 видов мохообразных (надотдел Bryobionta) из 128 родов, 65 семейств, 19 порядков, 4 классов, 2 отделов. Наряду с широко распространенными видами в листовных лесах Беларуси обнаружен и ряд редких и очень редких видов, в том числе подлежащих строгой или профилактической охране. Всего к редким и слабо изученным бриофитам листовных лесов Беларуси относится 94 вида.

Согласно Красной книге Республики Беларусь [7], к числу охраняемых бриофитов листовных лесов Беларуси относится 13 видов, из них 2 вида – I категории (CR – виды, находящиеся на грани исчезновения – *Moerckia hibernica*, *Plagiothecium undulatum*), 4 вида – II (EN – исчезающие виды – *Scapania apiculata*, *Orthotrichum lyellii*, *Bryum schleicheri*, *Pelekium minutulum*), 6 видов – III (VU – уязвимые виды – *Cephalozia catenulata*, *Porella platyphylla*, *Riccia canaliculata*, *Dicranum viride*, *Pseudobryum cinclidoides*, *Haplocladium microphyllum*) и 1 вид – IV (VU – потенциально уязвимые виды – *Neckera pennata*) категории.

Профилактической охране подлежат 13 видов (DD – недостаточно изученные – печеночники *Fossombronia foveolata*, *Orthocaulis attenuates*, *Scapania nemorea*, *Geocalyx graveolens*, мхи *Fissidens exilis*, *Orthotrichum gymnostomum*, *Orthotrichum tenellum*, *Orthotrichum patens*, *Philonotis marchica*, *Mnium hornum*, *Thamnobryum alopecurum*, *Hamatocaulis vernicosus*, *Hygroamblystegium fluviatile*). Эти виды не равноценны по степени своего распространения в Беларуси. Среди них в настоящее время по своей редкости выделяется *Geocalyx graveolens*.

Такие вышеупомянутые охраняемые или подлежащие профилактической охране виды, как *Hamatocaulis vernicosus* и *Neckera pennata*, не являются редкими на территории Беларуси, но подлежат охране, поскольку включены в Красную книгу мохообразных Европы или в другие охраняемые документы общеевропейского значения.

В составе бриокомпонента листовных сообществ очень редкими в Беларуси являются такие виды, как *Moerckia hibernica*, *Cephalozia lacinulata*, *Barbilophozia barbata*, *Barbilophozia lycopodioides*, *Scapania apiculata*, *Scapania nemorea*, *Scapania paludicola*, *Tritomaria quinquedentata*, *Nardia geoscyphus*, *Solenostoma gracillimum*, *Geocalyx graveolens*, *Sphagnum quinquefarium*, *Atrichum angustatum*, *Atrichum flavisetum*, *Physcomitrella patens*, *Orthotrichum pallens*, *Orthotrichum patens*, *Orthotrichum tenellum*, *Bryum elegans*, *Bryum knowtonii*, *Bryum schleicheri*, *Mnium hornum*, *Bartramia pomiformis*, *Plagiothecium undulatum*, *Neckera crispa*, *Thamnobryum alopecurum*, *Antitrichia curtipendula*, *Ctenidium molluscum*, *Sciuro-hypnum reflexum*, *Haplocladium microphyllum*, *Hygroamblystegium humile*, *Hygroamblystegium tenax*. Данные виды приводятся для территории Беларуси в одном-двух местообитаниях.

Из числа других редких (или слабо изученных хорологически) в составе бриофлоры Беларуси видов в листовных лесах встречаются *Riccia cavernosa*, *Riccia glauca*, *Riccia sorocarpa*, *Schistochilopsis incisa*, *Calypogeia integristipula*, *Nardia geoscyphus*, *Sphagnum auriculatum*, *Sphagnum compactum*, *Sphagnum majus*, *Sphagnum platyphyllum*, *Sphagnum riparium*, *Sphagnum wulfianum*, *Dicranella schreberiana*, *Dicranum fuscescens*, *Dicranum tauricum*, *Dicranum undulatum*, *Dichodontium pellucidum*, *Dicranoweisia cirrata*, *Hymenoloma crispulum*, *Didymodon fallax*, *Tortula subulata*, *Weissia controversa*, *Orthotrichum stramineum*, *Orthotrichum striatum*, *Bryum amblyodon*, *Bryum bimum*, *Bryum creberrimum*, *Bryum moravicum*, *Bryum pallens*, *Bryum pallescens*, *Bryum rubens*, *Bryum turbinatum*, *Bryum weigeli*, *Pohlia cruda*, *Pohlia filum*, *Mnium lycopodioides*, *Mnium marginatum*, *Plagiomnium medium*, *Aulacomnium androgynum*, *Antitrichia curtipendula*, *Kindbergia praelonga*, *Homomallium incurvatum*, *Stereodon fertilis*, *Campylidium sommerfeltii*, *Serpoleskea confervoides*.

Такие виды, как *Riccia glauca*, *Barbilophozia barbata*, *Solenostoma gracillimum*, *Sphagnum compactum*, *Dicranum fuscescens*, *Didymodon fallax*, *Tortula subulata*, *Weissia controversa*, *Orthotrichum striatum*, *Bryum rubens*, *Bryum weigeli*, *Pohlia cruda*, *Mnium hornum*, *Mnium marginatum*, не выявлены на территории Поозерья. А такие виды, как *Scapania apiculata*, *Scapania paludicola*, *Sphagnum quinquefarium*, *Dicranum majus*, *Hymenoloma crispulum*, *Orthotrichum diaphanum*, *Sciuro-hypnum reflexum*, известны в листовных лесах на территории Беларуси только в Поозерье.

Ряд видов (*Cephalozia lacinulata*, *Schistochilopsis incisa*, *Sphagnum wulfianum*, *Dicranum undulatum*, *Dicranoweisia cirrata*, *Orthotrichum diaphanum*, *Orthotrichum lyellii*, *Orthotrichum stramineum*, *Bryum knowtonii*, *Bartramia pomiformis*, *Plagiothecium undulatum*, *Neckera crispa*, *Thamnobryum alopecurum*, *Antitrichia curtispindula*, *Pelekium minutulum*, *Hygroamblystegium fluviatile*) не заходят южнее границы сплошного распространения ели.

Виды *Moerckia hibernica*, *Barbilophozia lycopodioides*, *Scapania nemorea*, *Tritomaria quinquentata*, *Nardia geoscyphus*, *Dicranum tauricum*, *Bryum elegans*, *Bryum schleicheri*, *Aulacomnium androgynum*, *Ctenidium molluscum* отмечены в лиственных лесах только для территории Полесья.

Среди редких видов следует различать редкие по естественным причинам (реликтовые и др.) и редкие вследствие воздействия комплекса антропогенных факторов. Негативные факторы последнего характера легче определяются и лучше поддаются антропогенной регулировке. Однако, ослабляя в некоторой мере конкурентные отношения в сообществах и создавая различные ниши, антропогенное воздействие может способствовать сохранению и даже расселению некоторых редких видов. Исчезновение многих пионерных видов – объективный процесс, который не может быть приостановлен, хотя более реально сохранение редких видов в составе растительных сообществ и их комплексов, в том числе лесных.

Следует отметить, что в отличие от флоры сосудистых растений, которая пополняется за счет значительного проникновения на территорию республики адвентивных видов, в составе бриофлоры таких видов пока не обнаружено. Отсутствие их поступления приводит к одностороннему сокращению биоразнообразия мохообразных, его неуклонному обеднению. Такую ситуацию следует учитывать в подходе к вопросу охраны растительного мира. При этом необходимо принимать во внимание, что мохообразные относятся к тем автотрофам, которые заполняют бреши в растительном покрове и являются уплотняющим его фактором.

В настоящее время более трети видов (34,8 %) в составе бриокомпонента лиственных лесов Беларуси относится к редким, хотя и в разной степени, в том числе некоторые из них являются очень редкими, обнаруженными давно и долгое время не подтвержденными, причем следует учитывать, что многие из них значительно сократили свое распространение, а некоторые виды вообще могли исчезнуть. Это, возможно, вызвано воздействием комплекса антропогенных факторов и, главным образом, антропогенной трансформацией природной среды, прежде всего осушением и сельскохозяйственным освоением земель, их промышленным и транспортным загрязнением, а также рубкой высоковозрастных древостоев природного происхождения на обширной территории.

Заключение. Изложенное выше подтверждает актуальность проводимых исследований и дополняет характеристику лиственных сообществ на территории Беларуси. Бриокомпонент лиственных лесов может иметь индикаторное значение как чувствительный показатель экологического режима и современного состояния исследуемых экосистем, а также их прогнозной характеристики.

Список использованных источников

1. Рыковский, Г.Ф. Флора Беларуси. Мохообразные : в 2 т. / Г.Ф. Рыковский, О.М. Масловский ; под ред. В.И. Парфенова. – Минск : Тэхналогія, 2004–2009.
2. Checklist of mosses of East Europe and North Asia / M. S. Ignatov [et al.] // Arctoa. – 2006. – Vol. 15, N 1. – P. 1–130. <https://doi.org/10.15298/arctoa.15.01>
3. Игнатов, М.С. Флора мхов средней части европейской России: в 2 т. / М.С. Игнатов, Е.А. Игнатова. – М. : КМК, 2003–2004. – Т. 1: Sphagnaceae – Hedwigiaceae. – 2003. – 608 с.
4. Потемкин, А.Д. Печеночники и антоцеротовые России / А.Д. Потемкин, Е.В. Софронова. – СПб. ; Якутск : Бостон-спектр, 2009. – Т. 1. – 368 с.
5. Рыковский, Г.Ф. Происхождение и эволюция мохообразных / Г.Ф. Рыковский. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 433 с.
6. Stebel, A. Mosses of the pieniny range : (Polish Western Carpatians) = Mchy Pienin : (Polskie Karpaty Zachodnie) / A. Stebel, R. Ochuga, G. Vončina. – Poznań : Sorus Wydaw. i Druk. Cyfrowa, 2010. – 113 s.
7. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / редкол. : И.М. Качановский [и др.]. – 4-е изд. – Минск : Беларус. энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. – 448 с.

References

1. Rykovskii G. F., Maslovskii O. M. *Flora of Belarus. Bryophytes. Vol. 1–2*. Minsk, Tekhnalogiya Publ., 2004–2009 (in Russian).
2. Ignatov M. S., Afonina O. M., Ignatova E. A., Abolina A. A., Akatova T. V., Baisheva E. Z. [et al]. Checklist of mosses of East Europe and North Asia. *Arctoa*, 2006, vol. 15, no. 1, pp. 1–130. <https://doi.org/10.15298/arctoa.15.01>
3. Ignatov M. S., Ignatova E. A. *Flora of mosses in the middle part of European Russia. Vol. 1. Sphagnaceae – Hedwigiaceae*. Moscow, KMK Publ. 608 p. (in Russian).
4. Potemkin A. D., Sofronova E. V. *Liverbirds and anthoceroids in Russia. Vol. 1*. St. Petersburg, Yakutsk, Boston-Spectr Publ., 2009. 368 p. (in Russian).
5. Rykovskii G. F. *Origin and evolution of bryophytes*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 433 p. (in Russian).
6. Stebel A., Ochyra R., Vončina G. *Mosses of the pieniny range: (Polish Western Carpatians) = Mchy Pienin: (Polskie Karpaty Zachodnie)*. Poznań, Sorus Wydawnictwo i Drukarnia Cyfrowa, 2010. 113 s.
7. *The Red Book of the Republic of Belarus. Plants: rare and endangered species of wild plants. 4th ed.* Minsk, Belarusian encyclopedia named after P. Brovka, 2015. 448 p. (in Russian).

Информация об авторе

Шабета Марина Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Zentsova2009@gmail.com

Information about the author

Marina S. Shabeta – Ph. D. (Biol.), Researcher. V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Zentsova2009@gmail.com

А. П. Григорчик

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

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПУГОЛОВКИ ЗВЕЗДЧАТОЙ *BENTHOPHILUS STELLATUS* (SAUVAGE, 1874) ИЗ РЕКИ ДНЕПР (БЕЛАРУСЬ)

Аннотация. Пуголовка звездчатая *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) – один из 5 представителей семейства Бычковые (Gobiidae) в Беларуси, обнаруженный в 2011 г. в р. Днепр в непосредственной близости от Киевского водохранилища. До настоящего времени данный вид в пределах Беларуси практически не исследован и представляет интерес для изучения как новый вид в условиях пресных водотоков.

В работе использованы стандартные ихтиологические методы отлова и методики обработки материала. Всего исследовано 39 морфометрических признаков, однако сравнение с особями из естественного ареала проведено по 24 признакам посредством двухвыборочного t -критерия для независимых выборок (t_{st}).

Впервые представлен анализ пластических показателей пуголовки звездчатой из верхнего течения р. Днепр (Беларусь) и дополнены данные по меристическим признакам вида на данном участке реки. Установлены достоверные различия по 3 меристическим и 11 пластическим признакам с особями пуголовки звездчатой из Каховского водохранилища (Украина, нижнее течение р. Днепр).

Ключевые слова: чужеродные виды, пуголовка звездчатая, меристические признаки, пластические признаки, река Днепр

Для цитирования: Григорчик, А. П. Морфометрическая характеристика пуголовки звездчатой *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) из реки Днепр (Беларусь) / А. П. Григорчик // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 492–498. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-492-498>

А. Р. Hryhorchuk

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

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF STELLATE TABPOLE-GOBY *BENTHOPHILUS STELLATUS* (SAUVAGE, 1874) FROM THE DNIEPER RIVER (BELARUS)

Abstract. Stellate tabpole-goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) is one of 5 representatives of the goby family (Gobiidae) in Belarus, discovered in 2011 in the Dnieper River. Until now, this species within Belarus is practically haven't been studied and is of interest for the study as a new species in the freshwater watercourses. Standard ichthyological methods of trapping and methods of processing the material have been used in the study. A total of 39 morphometric characteristics are investigated, however, the comparison with the specimens from the natural habitat was carried out by individual indicators using a two-sample t -test for independent samples (t_{st}).

The analysis of stellate tabpole-goby plastic characteristics from the Belarusian section of the Dnieper River is presented for a first time and the meristic characteristics data of the species on this section of the river is supplemented. There were significant differences on 3 meristic and 11 plastic features from the individuals of the stellate tabpole-goby from the Kakhovka reservoir (Ukraine, the lower reaches of the Dnieper River).

Keywords: alien species, stellate tabpole-goby, meristic characteristics, plastic characteristics, the Dnieper River

For citation: Hryhorchuk A. P. Morphometric characteristics of stellate tabpole-goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) from the Dnieper River (Belarus). *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 492–498 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-492-498>

Введение. Изучение инвазии видов за пределы естественного ареала на сегодняшний день является одним из актуальных направлений современных исследований животного и растительного мира. Процесс проникновения и натурализации видов в новые регионы земного шара в большинстве случаев носит стихийный характер и предопределяется совокупным действием как факторов среды, так и хозяйственной деятельностью человека.

Классическим примером биологической инвазии рыб в водоемы Беларуси является распространение представителей семейства Бычковые: бычка-песочника *Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814) [1], бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814), бычка-гонца *Neogobius gymnotrachelus* (Kessler, 1857) [2], бычка-цуцика *Proterorhinus marmoratus* (Pallas, 1814) [3] и пуголовки звездчатой *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) [4]. Расселение этих понто-каспийских видов происходит по р. Днепр со стороны Черного моря.

В литературе пуголовка звездчатая описывается как солоноватоводный немигрирующий донный вид, населяющий преимущественно заливы, лиманы, а также прибрежные озера и устья рек бассейнов Черного, Азовского и Каспийского морей [5–7].

Статус этого вида различается в зависимости от его численности в регионе обитания. По данным И. А. Акимова [8], в Молочном лимане и Керченском проливе Азовского моря пуголовка не является массовым видом и имеет редкий природоохранный статус. На болгарском участке Дуная (бассейн Черного моря) и его притоках данный вселенец [9] считается уязвимым видом, а, согласно сведениям Ф. К. Гавлены [10], Э. П. Цыплакова [11], И. А. Евланова и др. [12, 13], пуголовка, отмеченная в бассейне Волги начиная с 1950-х годов, на сегодняшний день на многих ее участках является обычным представителем ихтиофауны. Примерно в 1960-е годы наблюдались вспышки численности пуголовки в Днепре (бассейн Черного моря), о чем известно из работ Г. Б. Мельникова [14], в которых также приводятся сведения о продвижении вида вверх по течению до Киевского водохранилища и в устье Десны [15].

Впервые пуголовка звездчатая (2 экз.) на территории Беларуси обнаружена в р. Днепр недалеко от д. Нижние Жары Брагинского района в 2011 г. [4]. Других находок пуголовки звездчатой зафиксировано не было вплоть до 2014 г. (наши данные). До настоящего времени вид в пределах страны практически не изучался, и любая информация о нахождении объекта исследования, его биологии и экологии в водных экосистемах Беларуси вносит весомый вклад в изучение вида за пределами естественного ареала.

Цель данной работы – изучить морфометрические показатели пуголовки звездчатой в условиях белорусского участка р. Днепр (Брагинский р-н).

Материалы и методы исследования. Материал собран в августе 2014 г. на мелководных участках русла р. Днепр в окрестностях д. Нижние Жары Брагинского района Гомельской области в непосредственной близости от Киевского водохранилища.

В качестве орудий лова использовали мелкочейстый невод длиной 30 м с размером ячеи 8–10 мм. Всего в общем улове молоди рыб было обнаружено 6 экз. пуголовки звездчатой.

Отловленный материал был зафиксирован в 4%-ном растворе формалина. Обработку материала производили в лабораторных условиях, каждую особь пуголовки взвешивали на электронных весах CAS MWP-600 с точностью до 0,02 г. Морфометрические измерения рыбы проводили в соответствии со стандартными ихтиологическими методиками [16].

Всего проанализировано 39 морфометрических признаков: D_1 an gam. – количество неветвистых лучей в первом спинном плавнике, D_2 an gam. и gam. – количество неветвистых и ветвистых лучей во втором спинном плавнике, A an gam. и gam. – количество неветвистых и ветвистых лучей в анальном плавнике, P gam. – количество ветвистых лучей в грудном плавнике, V gam. – количество ветвистых лучей в брюшном плавнике, ad – длина рыбы без хвостового плавника, rd – длина туловища, H – наибольшая высота тела, iH – наибольшая толщина тела, h – наименьшая высота тела, ih – наименьшая толщина тела, aD – антедорсальное расстояние, pD – постдорсальное расстояние, aP – антелекторальное расстояние, aV – антевентральное расстояние, aA – антеанальное расстояние, pl – длина хвостового стебля, PV – пектоцентрального расстояния, VA – вентроанальное расстояние, ID_1 – длина основания первого спинного плавника, hD_1 – высота первого спинного плавника, ID_2 – длина основания второго спинного плавника, hD_2 – высота второго спинного плавника, IA – длина основания анального плавника, hA – высота анального плавника, IP – длина грудного плавника, IV – длина брюшного плавника, IC – длина хвостового плавника, c – длина головы, ic – ширина головы по краю предкрышки, r – длина рыла, o – диаметр глаза, op – заглазничный отдел головы, og – расстояние между углами рта, hc – высота головы у затылка, io – ширина лба, mn – длина нижнечелюстной кости, mx – длина верхнечелюстной кости.

Для статистической обработки данных использовали пакет Microsoft Excel. Полученные данные сопоставляли с результатами исследований других авторов по виду в ареале. Различия между особями пуголовки звездчатой из р. Днепр (Беларусь) и Каховского водохранилища (р. Днепр, Украина) оценивали с помощью двухвыборочного t -критерия для независимых выборок (t_{st}). Принимая во внимание отсутствие полных сведений по морфометрии вида в естественном ареале, сравнение проводили по отдельно взятым признакам, имеющимся в литературе, ориентируясь на средний показатель длины особей.

Результаты и их обсуждение. Особи пуголовки звездчатой, согласно полученным нами данным, имели длину тела (ad) от 21,10 до 32,40 ($25,58 \pm 1,57$) мм и массу от 0,28 до 0,80 ($0,43 \pm 0,08$) г. Меристические признаки отловленных особей были представлены следующими предельными значениями: в первом спинном плавнике (D_1) – III–IV неветвистых луча; во втором спинном плавнике (D_2) – I неветвистый 6–7 ветвистых луча, в анальном плавнике (A) – I неветвистый 7–8 ветвистых луча, в грудном плавнике (P) – 16–17 ветвистых луча, в брюшном плавнике (V) – 12 ветвистых лучей (табл. 1, выделены жирным шрифтом).

Сравнение меристических признаков пуголовки звездчатой из различных мест обитания естественного и приобретенного ареала показало, что отдельные авторы при написании кратких формул используют суммарный показатель, не разделяя лучи в плавниках на ветвистые и неветвистые (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Меристические признаки пуголовки звездчатой из различных регионов

Table 1. Meristical characteristics of stellate tabpole-goby from different regions

Регион		D_1	D_2	A	P	V	Источник
Естественный ареал	Азовское море	III (IV)	I 6–10	I 7–9	–	–	[17]
	Бассейн Черного и Азовского морей	III–IV	I 6–10	I 7–9	–	–	[5]
	Черное море	III (IV)	I 7–9 (11)	I 7–9	–	–	[6]
	Азовское море	III	I 7–8	I 6–7	15–17	–	[18]
Приобретенный ареал	Каховское вдхр. (р. Днепр, Украина)	III	I 7–11	I 7–10	14–16	12	[19]
	р. Днепр (Беларусь)	4	9	9	17	12	[4]
		III–IV	I 6–7	I 7–8	16–17	12	Наши данные
	Саратовское вдхр. (р. Волга, Россия)	3–4	I 7–9	I 8	15–16	10	[20]
	Чебоксарское вдхр. (р. Волга, Россия)	II–IV	8–12	7–9	11–17	9–18	[21]
	Рыбинское вдхр. (р. Волга, Россия)	4	I 10	I 9	17	12	[20]

Меристические признаки особей, отловленных в верхнем течении р. Днепр (наши данные, Беларусь), существенно не отличались от таковых у особей из Азово-Черноморского бассейна [4–6, 17–19]. В то же время предельные значения меристических признаков у пуголовки из бассейна Каспийского моря (Чебоксарское водохранилище) [21] заметно отличались от таковых у особей из других мест обитания, в том числе и у изученных нами (см. табл. 1). В частности, это касается первого спинного плавника, грудных и брюшных плавников и, несомненно, указывает на различное происхождение популяций (Каспийское и Черное моря).

Показано, что предельные значения полученных нами суммарных показателей плавников пуголовки дополняют опубликованные ранее сведения по данному виду на территории Беларуси [4] (см. табл. 1). В частности, два меристических показателя пуголовки по нашим данным представлены шире, чем в первичных результатах, и составляют III–IV неветвистых луча в первом спинном плавнике и 7–8 ветвистых лучей во втором спинном.

В целом следует заключить, что полученные нами показатели входят в диапазон варьирования признаков для вида в ареале.

Отдельно было проведено сравнение наших данных с меристическими показателями пуголовки звездчатой из Каховского водохранилища (нижнее течение р. Днепр, Украина) с расчетом t -критерия при уровне значимости $p < 0,05$ ($t_{st} > 1,96$) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Сравнение меристических признаков пуголовки звездчатой из р. Днепр (наши данные) и Каховского водохранилища (А. И. Смирнов)

Table 2. Compare meristical characteristics of stellate tabpole-goby in the Dnieper River (our data) and the Kakhovka reservoir (A. I. Smirnov)

Показатель	Наши данные, 2014 (n = 6 экз.)		А. И. Смирнов, 1985 [19] (n = 33 экз.)		t_{st}
	lim	M±m	lim	M±m	
ad, мм	21,10–32,40	25,58±1,57	14,0–54,0	32,1±0,29	–
<i>Меристические признаки</i>					
D ₁ an ram.	III–IV	3,67±0,21	III	–	–
D ₂ an ram. и ram.	I 6–7	6,67±0,21	I 7–11	8,40±0,12	–7,15
A an ram. и ram.	I 7–8	7,33±0,21	I 7–10	8,13±0,09	–3,50
P ram.	16–17	16,33±0,21	14–16	15,63±0,12	2,89
V an ram. и ram	12	12	12	–	–

П р и м е ч а н и е. Знак «–» указывает на меньшее значение показателей особей первой группы по сравнению со второй; полужирным шрифтом обозначены значения t_{st} , достоверные при $p < 0,05$.

Достоверные отличия между особями из разных водных объектов (р. Днепр и Каховское водохранилище) отмечены нами по всем анализируемым меристическим признакам.

Так, в пределах белорусского участка р. Днепр абсолютное значение ветвистых лучей во втором спинном плавнике особей пуголовки колебалось в пределах 6–7, в то же время по сведениям А. И. Смирнова [19] этот показатель имел нижний предел на единицу выше и составлял 7 ветвистых лучей, а максимальное число ветвистых лучей во втором спинном плавнике достигало 11. Число ветвистых лучей в анальном плавнике, согласно нашим данным, колебалось в пределах 7–8, в то время как максимальное значение данного показателя для особей из Каховского водохранилища достигало 10. Таким образом, число ветвистых лучей во втором спинном и анальном плавниках у отловленных нами особей пуголовки звездчатой достоверно ниже такового у особей из Каховского водохранилища ($t_{st} = -7,15$ и $t_{st} = -3,50$ соответственно).

Число ветвистых лучей в грудном плавнике было достоверно выше у особей, отловленных в Днепре на территории Беларуси ($t_{st} = 2,89$). Согласно А. И. Смирнову, максимальное число ветвистых лучей в грудном плавнике составляло 16 лучей, в то время как в нашем материале это значение являлось минимальным, а максимальное число составляло 17 лучей.

Показанные различия по меристическим показателям пуголовки могут быть обусловлены различием условий среды обитания на анализируемых участках р. Днепр (верхнее и нижнее течение).

Сравнение пластических признаков пуголовки из р. Днепр (верхнее течение, территория Беларуси) и Каховского водохранилища (нижнее течение р. Днепр, территория Украины) показало достоверные отличия по 11 из 19 проанализированных признаков (табл. 3). Достоверные различия указаны при уровне значимости $p < 0,05$ ($t_{st} > 2,07$).

По нашим расчетам пуголовка звездчатая из верхнего течения Днепра имеет достоверно большие значения по 5 признакам, характеризующим относительные размеры плавников и расстояние между ними (антепекторальное расстояние ($t_{st} = 4,59$), антевентральное расстояние (4,66), пектоцентральное расстояние (6,52), длина основания первого спинного плавника (5,21), высота первого спинного плавника (2,70)), и 4 показателям в головном отделе (длина рыла (11,69), диаметр глаза (5,59), ширина лба (7,04) и длина верхнечелюстной кости (2,18)), чем у особей на нижнем участке Днепра (Каховское водохранилище).

В то же время у пуголовки из Каховского водохранилища статистически отмечалось большее значение по наименьшей высоте тела ($t_{st} = -2,43$) и длине головы ($t_{st} = -5,86$), чем у пуголовки из р. Днепр.

Выявленные различия в пластических признаках исследованных особей могут быть обусловлены разнокачественностью (разноразмерностью) особей, а также различием условий среды обитания на верхнем и нижнем участках Днепра.

Т а б л и ц а 3. Пластические признаки пугловки звездчатой в р. Днепр (наши данные) и Каховском водохранилище (А. И. Смирнов)

Table 3. Plastic characteristics of stellate tabpole-goby in the Dnieper River (our data) and the Kakhovka reservoir (A. I. Smirnov)

Показатель	Наши данные, 2014 (n = 6 экз.)		А. И. Смирнов, 1985 [19] (n = 18 экз.)		t_{st}
	lim	M±m	lim	M±m	
ad, мм	21,10–32,40	25,58±1,57	14,0–54,0	32,1±0,29	–
<i>Пластические признаки в % от длины тела (ad)</i>					
pd	62,26–97,19	71,34±5,41	–	–	–
H	15,21–19,91	17,17±0,76	–	–	–
iH	13,69–18,01	15,84±0,58	–	–	–
h	4,63–8,53	6,81±0,58	6,4–9,4	8,28±0,17	–2,43
ih	3,42–6,16	5,10±0,39	–	–	–
aD	38,91–43,60	41,37±0,74	40,7–44,7	42,43±0,34	–1,30
pD	18,48–21,29	19,87±0,44	–	–	–
aP	33,95–39,34	36,59±0,89	23,5–41,6	32,41±0,19	4,59
aV	29,01–33,18	31,44±0,67	23,7–30,6	27,63±0,47	4,66
aA	58,37–62,56	60,14±0,66	–	–	–
pl	19,14–22,09	20,70±0,56	–	–	–
PV	7,39–8,53	7,85±0,18	4,8–8,2	6,19±0,18	6,52
VA	24,51–30,92	28,45±0,90	24,5–38,5	28,38±0,30	0,07
ID ₁	6,17–9,48	7,55±0,46	3,2–6,9	4,82±0,25	5,21
hD ₁	6,08–7,58	6,69±0,23	3,0–9,5	5,42±0,41	2,70
ID ₂	15,66–19,01	17,11±0,49	–	–	–
hD ₂	12,06–13,58	12,74±0,23	10,1–13,9	12,04±0,27	1,97
lA	17,27–21,80	19,76±0,74	–	–	–
hA	10,12–14,69	12,01±0,67	9,7–13,2	11,04±0,22	1,38
lP	21,67–27,49	23,98±0,79	–	–	–
lV	25,93–34,12	28,90±1,15	22,8–30,9	27,11±0,54	1,41
lC	19,75–23,70	21,74±0,68	19,0–24,9	21,92±0,39	–0,23
c	31,56–34,12	32,80±0,44	31,6–37,4	35,92±0,30	–5,86
<i>Пластические признаки в % от длины головы (c)</i>					
ic	84,15–102,88	93,32±2,75	–	–	–
r	25,00–27,88	26,61±0,49	18,3–21,7	20,33±0,22	11,69
o	16,35–20,73	18,64±0,62	10,5–19,6	13,97±0,56	5,59
op	53,01–63,41	58,88±1,43	–	–	–
or	36,59–48,72	43,54±1,66	–	–	–
hc	46,15–58,33	51,40±1,83	41,8–58,6	51,24±0,16	0,09
io	15,66–22,12	17,94±0,91	8,9–13,7	10,88±0,42	7,04
mx	27,78–36,14	31,88±1,22	18,3–37,1	27,84±1,39	2,18
mn	35,90–38,89	37,46±0,46	31,0–45,4	39,25±1,16	–1,43

П р и м е ч а н и е. Знак «←» указывает на меньшее значение показателей особей первой группы по сравнению со второй; полужирным шрифтом обозначены значения t_{st} , достоверные при $p < 0,05$.

Закключение. Впервые представлен анализ пластических показателей пугловки звездчатой из р. Днепр на территории Беларуси и дополнены ранее полученные сведения по меристическим признакам вида на данном участке реки.

Полученные значения меристических признаков пугловки на территории Беларуси, с учетом опубликованных ранее сведений, входят в диапазоны значений, показанные для вида в естественном ареале, и составляют: D₁ III–IV, D₂ I 6–8, A I 7–8, P 16–17, V 12.

Достоверные различия пугловки звездчатой на верхнем и нижнем участках р. Днепр (Брагинский р-н, Беларусь, и Каховское водохранилище, Украина, соответственно) показаны по 3 меристическим и 11 пластическим признакам. Число ветвистых лучей во втором спинном и анальном плавниках у особей пугловки из верхнего течения р. Днепр достоверно ниже, чем у особей из нижнего течения р. Днепр (Каховское водохранилище), а число ветвистых лучей в грудном плавнике – достоверно выше.

По пластическим признакам у пугловки из верхнего течения р. Днепр достоверно большие значения по 9 показателям (антепекторальное расстояние, антевентральное расстояние, пекто-вентральное расстояние, длина основания первого спинного плавника, высота первого спинного плавника, длина рыла, диаметр глаза, ширина лба и длина верхнечелюстной кости) и меньшие по 2 показателям (наименьшая высота тела и длина головы), чем у пугловки на нижнем участке р. Днепр (Каховское водохранилище).

Список использованных источников

1. Воронцов, Е. М. Состав ихтиофауны водоемов Западной области и БССР и характеристика ихтиофауны Верхнеднепровского бассейна / Е. М. Воронцов // Фауна и экология. – 1937. – Вып. 3. – С. 59–86.
2. Гулюгин, С. Ю. Новые данные по расширению ареала бычков рода *Neogobius*: песочника *N. fluviatilis*, кругляка *N. melanostomus*, гонца *N. gymnotrachelus* / С. Ю. Гулюгин, Д. Ф. Куницкий // Тез. докл. междунар. науч.-техн. конф., посвящ. 40-летию пребывания КГТУ на Калининградской земле и 85-летию высшего рыбохозяйственного образования в России (Калининград, 17–19 нояб. 1998 г.) / Калинингр. гос. техн. ун-т. – Калининград, 1999. – Ч. 1. – С. 5.
3. Новый для ихтиофауны Беларуси вид рыб – бычок-цуцик *Proterorhinus marmoratus* / В. К. Ризевский [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2010. – № 1. – С. 100–103.
4. First record of the Ponto-Caspian stellate tadpole-goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) from the Dnieper River, Belarus / V. Rizevsky [et al.] // Bioinvasions Records. – 2013. – Vol. 2, N 2. – P. 159–161. <https://doi.org/10.3391/bir.2013.2.2.12>
5. Берг, Л. С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран : в 3 т. / Л. С. Берг. – 4-е изд., испр. и доп. – М. : Изд-во и 1-я тип. Изд-ва Акад. наук СССР, 1949. – Т. 3. – С. 926–1382.
6. Световидов, А. Н. Рыбы Черного моря / А. Н. Световидов. – М. ; Л. : Наука. Ленингр. отд-ние, 1964. – 551 с. – (Определители по фауне СССР, издаваемые Зоологическим институтом Академии наук СССР ; вып. 86).
7. Miller, P. J. Gobiidae / P. J. Miller // Check-list of the fishes of the North-Eastern Atlantic and of the Mediterranean (Clofnam). – Paris, 1986. – P. 483–515.
8. Акімов, І. А. Бичок-пуголовок зірчастий / І. А. Акімов // Червона книга України. Тваринний світ. – К., 2009. – С. 377.
9. Атлас на Попчетата (Gobiidae) в България. Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания / Ин-т по биоразнообразие и екосистемни изследвания ; М. Василев [и др.]. – София : Българска акад. на науките, 2012. – 114 с.
10. Гавлена, Ф. К. Звездчатая пугловка *Benthophilus stellatus* (Sauvage) в Куйбышевском водохранилище / Ф. К. Гавлена // Вопр. ихтиологии. – 1973. – Т. 13, вып. 1. – С. 174–175.
11. Цыплаков, Э. П. Расширение ареалов некоторых видов рыб в связи с гидростроительством на Волге и акклиматизационными работами / Э. П. Цыплаков // Вопр. ихтиологии. – 1974. – Т. 14, вып. 3. – С. 396–405.
12. Евланов, И. А. Кадастр рыб Самарской области / И. А. Евланов, С. В. Козловский, П. И. Антонов. – Тольятти : Ин-т экологии Волж. бассейна РАН, 1998. – 222 с.
13. Frolova, E. A. Some data on a feeding of starry Goby *Benthophilus stellatus* Sauvage, 1874 in the Cheboksary Reservoir / E. A. Frolova, N. G. Baynov // Invasion of alien species in Holarctic (Borok-3) : III International symposium (5–9 October, 2010, Myshkin – Borok) : programme and book of abstracts / Russian Academy of Sciences [et al.]. – Yaroslavl, 2010. – P. 45–46.
14. Мельников, Г. Б. Состояние ихтиофауны и пути рыбохозяйственного освоения озер, водохранилищ и малых водоемов Украины / Г. Б. Мельников // Вопр. ихтиологии. – 1955. – Вып. 3. – С. 32–49.
15. Лапицкий, И. И. Направленное формирование ихтиофауны и укрепление численности популяции рыб в Цимлянском водохранилище / И. И. Лапицкий // Тр. Волгogr. отд-ния Гос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва. – 1970. – Т. 4. – С. 3–18.
16. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных) / И. Ф. Правдин. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Пищ. пром-сть, 1966. – 376 с.
17. Slastenenko, E. P. Les poisons de la mer Noire et de la mer d'Asov / E. P. Slastenenko // Annales scientifiques de l'Université de Jassy. Seconde section, Sciences naturelles. – 1939. – Vol. 25. – P. 3–194.
18. Манило, Л. Г. Пуголовка азовская, *Benthophilus magistri* (Gobiidae, Perciformes) – редкий вид в ихтиофауне Украины / Л. Г. Манило // Зб. праць Зоол. музею. – 2011. – № 42. – С. 92–99.
19. Смирнов, А. И. Фауна Украины : в 40 т. / А. И. Смирнов. – Киев : Наук. думка, 1986. – Т. 8, вып. 5 : Рыбы. Окунеобразные (бычководные), скорпенообразные, камбалообразные, присоскопериобразные, удильщикообразные. – 320 с.
20. Kodukhova, Yu. V. First record of stellate tadpole goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) (Actinopterygii: Gobiidae) in the Rybinsk Reservoir / Yu. V. Kodukhova, E. A. Borovikova, D. P. Karabanov // Inland Water Biol. – 2016. – Vol. 9, N 4. – P. 428–430. <https://doi.org/10.1134/s1995082916030081>
21. Касьянов, А. Н. Звездчатая пуголовка *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) Чебоксарского водохранилища / А. Н. Касьянов, А. А. Клевакин // Рос. журн. биол. инвазий. – 2011. – Т. 4, № 3. – С. 2–6.

References

1. Vorontsov E.M. The composition of the ichthyofauna of the reservoirs of the Western Region and the BSSR and the characteristics of the ichthyofauna of the Upper Dnieper Basin. *Fauna i ekologiya* [Fauna and ecology], 1937, iss. 3, pp. 59–86 (in Russian).
2. Gulyugin S. Yu., Kunitskii D.F. New data on the area expansion of gobies species: monkey goby *N. fluviatilis*, round goby *N. melanostomus*, racer goby *N. gymnotrachelus*. *Tezisy dokladov Mezhdunarodnoi nauchno-tehnicheskoi konferentsii, posvyashchennoi 40-letiyu prebyvaniya Kaliningradskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta na Kaliningradskoi zemle i 85-letiyu vysshego rybokhozyaystvennogo obrazovaniya v Rossii (Kaliningrad, 17–19 noyabrya 1998 goda). Chast' 1* [Abstracts of the International scientific and technical conference dedicated to the 40th anniversary of the Kaliningrad State Technical University on Kaliningrad land and the 85th anniversary of higher fisheries education in Russia (Kaliningrad, November 17–19, 1998). Pt. 1]. Kaliningrad, 1999, p. 5 (in Russian).
3. Rizevskii V. K., Plyuta M. V., Leshchenko A. V., Ermolaeva I. A. New to the Belarusian fish fauna species of fish – tubenose-goby *Proterorhinus marmoratus*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2010, no. 1, pp. 100–103 (in Russian).
4. Rizevsky V., Leshchenko A., Ermolaeva I., Pluta M. First record of the Ponto-Caspian stellate tadpole-goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) from the Dnieper River, Belarus. *Bioinvasions Records*, 2013, vol. 2, no. 2, pp. 159–161. <https://doi.org/10.3391/bir.2013.2.2.12>
5. Berg L.S. *Freshwater fish of the USSR and neighboring countries. Vol. 3. 4th ed.* Moscow, Leningrad, Publishing House and First Printing House of the Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1949, pp. 926–1382 (in Russian).
6. Svetovidov A.N. *Fish of the Black Sea*. Moscow, Leningrad, Nauka, Leningradskoe otdelenie Publ., 1964. 551 p. (in Russian).
7. Miller P.J. *Gobiidae, Check-list of the fishes of the North-Eastern Atlantic and of the Mediterranean (Clofnam)*. Paris, 1986, pp. 483–515.
8. Akimov I. A. *Benthophilus stellatus*. *Red Book of Ukraine. Fauna*. Kiev, 2009, p. 377 (in Ukrainian).
9. Vasilev M., Apostolu A., Velkov B., Dobrev D., Zarev V. *Atlas of gobies (Gobiidae) in Bulgaria*. Sofia, Bulgarian Academy of Sciences, 2012. 114 p. (in Bulgarian).
10. Gavlena F.K. Stellate tabpole-goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage) in the Kuibyshev reservoir. *Voprosy ikhtiologii* [Ichthyology issues], 1973, vol. 13, iss. 1, pp. 174–175 (in Russian).
11. Tsyplakov E.P. Expansion of the ranges of some species due to construction on the Volga and acclimatization. *Voprosy ikhtiologii* [Ichthyology issues], 1974, vol. 14, iss. 3, pp. 396–405 (in Russian).
12. Evlanov I. A., Kozlovskii S. V., Antonov P.I. *Cadastr of the fish of the Samara Region*. Togliatti, Publishing House of the Institute of Ecology of the Volga Basin of the Russian Academy of Sciences, 1998. 222 p. (in Russian).
13. Frolova E. A., Baynov N.G. Some data on a feeding of starry Goby *Benthophilus stellatus* Sauvage, 1874 in the Cheboksary Reservoir. *Invasion of alien species in Holartic (Borok-3): III International symposium (5–9 October, 2010, Myshkin – Borok): programme and book of abstracts*. Yaroslavl, 2010, pp. 45–46.
14. Mel'nikov G. B. The state of the ichthyofauna and the ways of fishery development of lakes, reservoirs and small reservoirs of Ukraine. *Voprosy ikhtiologii* [Ichthyology issues], 1955, iss. 3, pp. 32–49 (in Russian).
15. Lapitskii I.I. Directed formation of ichthyofauna and strengthening of fish population in Tsimlyansk reservoir. *Trudy Volgogradskogo otdeleniya Gosudarstvennogo nauchno-issledovatel'skogo instituta ozernogo i rechnogo rybnogo khozyaystva* [Proceedings of the Volgograd branch of the State Research Institute of Lake and River Fisheries], 1970, vol. 4, pp. 3–18 (in Russian).
16. Pravdin I.F. *Guide to the study of fish (mainly freshwater). 4th ed.* Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1966. 376 p. (in Russian).
17. Slastenenko E.P. *Les poisons de la mer Noire et la mer d'Asov. Annales scientifiques de l'Université de Jassy. Seconde section, Sciences naturelles*, 1936, vol. 25, pp. 3–194.
18. Manilo L.G. The Azov tabpole-goby, *Benthophilus magistri* (Gobiidae, Perciformes) – rare species in the ichthyofauna of Ukraine. *Zbirnik prats' Zoologichnogo muzeyu* [Proceedings of the Zoological museum], 2011, no. 42, pp. 92–99 (in Ukrainian).
19. Smirnov A. I. *Pisces. Perciformes (Gobioidei), Scorpaeniformes, Pleuronectiformes, Gobiesociformes, Lophiiformes. Vol. 8, iss. 5*. Kiev, Naukova Dumka Publ., 1986. 320 p. (in Ukrainian).
20. Kodukhova Yu. V., Borovikova E. A., Karabanov D.P. First record of stellate tadpole goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) (Actinopterygii: Gobiidae) in the Rybinsk Reservoir. *Inland Water Biology*, 2016, no. 4, vol. 9, pp. 428–430. <https://doi.org/10.1134/s1995082916030081>
21. Kas'yanov A. N., Klevakin A. A. Stellate tadpole goby *Benthophilus stellatus* (Sauvage, 1874) of the Cheboksary reservoir. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii* [Russian journal of biological invasions], 2011, vol. 4, no. 3, pp. 2–6 (in Russian).

Информация об авторе

Григорчик Антонина Петровна – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: imbris.09@mail.ru

Information about the author

Antonina P. Hryhorchuk – Junior researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: imbris.09@mail.ru

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.3
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-499-512>

Поступила в редакцию 10.07.2019
Received 10.07.2019

И. Д. Волотовский

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

**РЕЗИДЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ И ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ СЕРДЦА:
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Аннотация. Проведен анализ литературных данных по одной из актуальных проблем современной клеточной биофизики и биотехнологии – стволовым клеткам сердца, участвующим в процессах репарации сердечной мышцы после ее повреждения в результате инфаркта миокарда. Рассмотрены биологические свойства и потенциальная способность резидентных мезенхимальных и прогениторных клеток сердца участвовать в репарационных процессах поврежденных кардиомиоцитах (КМЦ). Приводятся последние данные по испытаниям репарационной активности указанных клеток и их комбинаций на экспериментальных животных и пациентах. Обсуждаются подходы для повышения эффективности клеточных методов репарации поврежденных КМЦ.

Ключевые слова: повреждения кардиомиоцитов, инфаркт миокарда, мезенхимальные стволовые клетки сердца, прогениторные клетки сердца, паракринные соединения, клеточные методы репарации кардиальных клеток

Для цитирования: Волотовский, И. Д. Резидентные стволовые и прогениторные клетки сердца: морфофункциональные свойства и перспективы практического использования / И. Д. Волотовский // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 499–512. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-499-512>

I. D. Volotovskii

Institute of Biophysics and Cell Engineering, Minsk, Republic of Belarus

**RESIDENT AND PROGENITOR STEM CELLS OF THE HEART: MORPHOLOGY AND FUNCTION
PROPERTIES AND PROSPECTS FOR PRACTICAL APPLICATION**

Abstract. The analysis of literature data on one of the actual problem of modern cell biophysics and biotechnology dealing with mesenchymal stem cells and cordial progenitor cells taking part in reparation of myocardium after its injury and first of all after myocardial infarction was done. Biological properties and potential ability of these cells in reparation processes of myocardium are considered. The recent data on experiments using experimental animals and patients are given. The approaches to increase the efficacy of cell technologies in treatment of injured cardiomyocytes are discussed.

Keywords: injury of cardiomyocytes, myocardial infarction, mesenchymal stem cells, cordial progenitor cells, cell technologies of injury treatment

For citation: Volotovskii I. D. Resident and progenitor stem cells of the heart: morphology and function properties and prospects for practical application. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 499–512 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-499-512>

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) представляют собой группу заболеваний сердца и кровеносных сосудов. К основным из них относятся ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, гипертоническая болезнь, инсульт, болезни периферических кровеносных сосудов, хроническая сердечная недостаточность (ХСН), стенокардия, аритмия и др. ССЗ являются

наиболее частой причиной смерти. Ежегодно по этой причине умирает 17,9 млн человек, и этот показатель продолжает расти. По прогнозам ВОЗ, к 2020 г. количество смертных случаев от ССЗ в мире достигнет 25 млн. Основными этиологическими факторами развития ССЗ кроме генетической предрасположенности являются курение, недостаток физической активности, нездоровое питание, сахарный диабет и др. Несмотря на значительный прогресс в области фармакотерапии ССЗ, у многих пациентов, страдающих этими заболеваниями, формируется ХСН, вероятность возникновения которой резко возрастает после острого инфаркта миокарда. При декомпенсированном нарушении функции миокарда, когда сердце уже не в состоянии перекачивать достаточное количество крови для оптимального обеспечения органов и тканей кислородом и питательными веществами, может встать вопрос о трансплантации донорского сердца. Наблюдаемый в последнее время рост смертности от кардиоваскулярных патологий является мощной движущей силой развития современной кардиологической науки [1].

В настоящее время клеточные биотехнологии в кардиологии формируются как новое перспективное направление в лечении ССЗ, что позволит расширить терапевтические возможности и улучшить качество жизни пациентов [2].

Регенеративный потенциал сердца и кардиомиоцитов. Многие годы считалось, что сердце состоит из терминально дифференцированных клеток, а кардиомиоциты (КМЦ) – основные клетки сердечной мышцы, осуществляющие сократительную функцию, – не способны вступать в митоз [3]. Действительно, при физиологических условиях подавляющее количество КМЦ в сердце млекопитающих не способно к клеточному делению, а чрезмерная физическая нагрузка организма вызывает только их гипертрофию. Однако применение ауторадиографических методов исследования позволило изменить эти представления [4]. В последние десятилетия появилось много данных о том, что в сердце благодаря резидентным стволовым и прогениторным клеткам сердца (РПКС) происходит обмен КМЦ. В генетических исследованиях было показано, что РПКС обеспечивают пополнение у млекопитающих пула КМЦ после их повреждения [5]. В доклинических исследованиях также было показано, что РПКС способны дифференцироваться в другие типы клеток: КМЦ, гладкомышечные клетки сосудов, эндотелиальные клетки капилляров. Введение РПКС в сердечную мышцу после инфаркта миокарда приводило к уменьшению размера рубца и улучшению функции левого желудочка. Перечисленные факты привели к сдвигу парадигмы в биологии сердца и открыли новые перспективы в развитии клеточных лечебных подходов, хотя полного консенсуса в кардиологии о биологической роли этих клеток еще нет. Тем не менее, можно предположить, что клеточная терапия сердечной недостаточности и прежде всего инфаркта миокарда, должна базироваться на этих фундаментальных представлениях [6], на использовании различных стволовых клеток, накопленных в условиях культуры (мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, жировой ткани), включающей также РПКС, эндотелиальные и гладкомышечные клетки. Также были обнаружены «малые» КМЦ, способные вступать в клеточный цикл с завершением кардио- и цитокинеза. Доказано, что около 1 % клеток взрослого сердца обновляется в течение года и 4 % КМЦ рассматриваются к 50 годам как новообразованные.

Клеточное ремоделирование миокарда – пожизненный процесс, однако большинство КМЦ образованы перинатально (с 22-й недели внутриутробного развития по 7-е сутки жизни новорожденного). В связи с этим возникает вопрос: откуда появляются КМЦ, способные к делению? В литературе приводятся две основные гипотезы. Согласно первой, в сердце существуют популяции резидентных стволовых клеток, которые могут участвовать в регенерации миокарда в норме и при его повреждении. Согласно второй гипотезе, в крови циркулируют прогениторные клетки, которые в ответ на повреждение миокарда выходят из костного мозга и поступают (хоуминг) в зону ишемии [3].

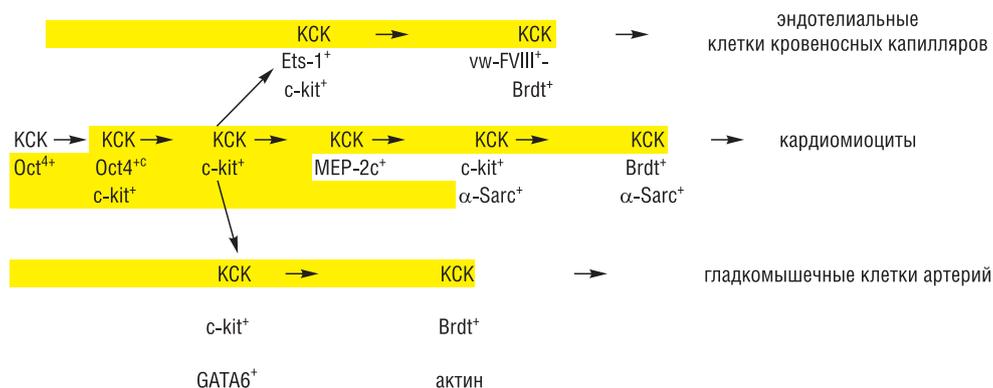
Предполагается, что существует четыре пути регенеративного ответа сердца на травму: 1) некардиомиоцитные клетки секретируют паракринные факторы, что способствует пролиферации существующих КМЦ; 2) стволовые и прогениторные клетки активируются, пролиферируют и подвергаются дифференцировке, повторно входят в клеточный цикл и превращаются в новые КМЦ; 3) зрелые КМЦ подвергаются дифференцировке, повторно входят в клеточный цикл и пролиферируют в новые КМЦ; 4) повреждение приводит к активации эпикарда, что сопровождается образованием новых кровеносных сосудов и/или пролиферацией новых КМЦ.

Открытие резидентного пула стволовых и прогениторных клеток сердца, способных к дифференцировке в основные типы клеток миокарда и участвующих в процессах его обновления и частичной регенерации, позволяет рассматривать клетки этого типа в качестве одного из вариантов для клеточной кардиомиопластики. В ряде экспериментальных работ представлены доказательства наличия у этих клеток свойств постнатальных стволовых клеток, а именно свойств самовоспроизведения, клоногенности и мультипотентности, а также их участия в репаративном процессе за счет мобилизации клеток из «ниш», их миграции в область повреждения и, как упоминалось выше, дифференцировки в КМЦ, эндотелиальные и гладкомышечные клетки.

Типы стволовых и прогениторных клеток сердца. С точки зрения использования стволовых клеток для лечения ХСН и их природы как клеточного продукта клетки можно разделить на два типа, а именно: а) экзогенные (внесердечные); б) эндогенные стволовые и прогениторные клетки. К первому типу относятся эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, скелетные миобласты и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, а ко второму – РПКС (побочная популяция клеток сердца, c-kit⁺, Sca-1⁺, Isl-1⁺-клетки, кардиосферы и др., а также многочисленные клетки, выполняющие поддерживающие и специализированные функции: эндотелиальные и иммунные клетки (макрофаги и натуральные киллеры), стромальные клетки (фибробласты, клетки эпикардия, телоциты – клетки субэпикардия), структурные компоненты экстрацеллюлярного матрикса.

Особое место в приведенном выше перечне занимают резидентные стволовые клетки сердца (РСКС), являющиеся клеточным резервным материалом сердечной ткани. Они локализируются в определенном микроокружении – клеточных «нишах», расположенных в сердечной ткани, которая, как правило, не подвержена ритмическим сокращениям (область предсердий и верхушки сердца). В ткани сердца их отношение к другим клеткам составляет 1/30 000 [7]. РСКС экспрессируют маркер Oct-4. После их активации (повреждение сердечной мышцы) экспрессия Oct-4 блокируется и запускается цепь последовательных клеточных превращений, приводящих к образованию из РСКС ряда прогениторных клеток, проявляющих специфическую маркерную активность, например c-kit⁺, Sca-1⁺, MRD-1⁺, Islet-1⁺ и др. Важно отметить, что наличие приведенного выше ряда клеток типично для ткани сердца, в котором произошли морфофункциональные патологические изменения миокарда.

На рисунке изображена одна из ранних принципиальных схем указанных превращений, завершающихся образованием конечных продуктов: КМЦ, эндотелиальных клеток и клеток гладкой мышечной мускулатуры [8]. Как следует из схемы и многочисленных литературных данных, ключевое место в последовательности событий превращений в три типа кардиальных клеток занимают c-kit-клетки, которые в ходе превращения приобретают хорошо охарактеризованные



GATA6⁺, Ets-1, Brdt⁺, vw-FVIII⁺, Brdt⁺ – транскрипционные факторы, типичные для финальных представителей дифференцированных КСК

Схема формирования из кардиальных стволовых клеток (КСК) коммитированного клеточного прогениторного потомства, завершающегося финальной дифференцировкой клеток [8]

Scheme of formation of commitment cell progenitor progeny from cordial stem cells ending by final cell differentiation [8]

белковые маркерные признаки (Sca-1, ABCG-2, Flk-1, CD105, CD166, PDGFR- α) и экспрессирующие транскрипционные факторы (Isl-1, Tert, Bmi-1, GATA4, maf2c, Nkx2.5, Wt-1) [9]. В целом, в эмбриональном, неонатальном и взрослом сердце существуют две популяции: кардиальные стволовые клетки и кардиальные прогениторные клетки [9]. Именно они являются основой кругооборота КМЦ в сердечной ткани.

Перейдем теперь к более подробному рассмотрению стволовых и прогениторных клеток сердца. Их общими признаками являются: а) присутствие в сердечной ткани на эмбриональном и взрослом уровнях развития организма; б) способность к самообновлению; в) мультипотентность и способность дифференцироваться по трем направлениям – кардиомиоцитарному, эндотелиальному и гладкомышечному; г) активация после повреждения сердечной ткани.

c-kit⁺ (CD117)-стволовые клетки получили свое название по наличию на их поверхности c-kit-фактора – рецептора фактора стволовых клеток. Несмотря на то что c-kit регулирует пролиферацию, дифференцировку и миграцию гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, маркеры гемопоэтических клеток (CD34, CD45, CD20, CD8) в этих клетках сердца не обнаружены. В миокарде взрослых животных их содержание сравнительно невелико – 1 клетка на 104 КМЦ. Они способны к самообновлению, пролиферации и характеризуются мультипотентностью, активно мигрируют в зону повреждения при трансплантации в здоровую сердечную мышцу. С помощью меченого бромистого дезоксиуридина и введенных в прединфарктную зону миокарда c-kit⁺-клеток было показано, что в зоне инфаркта образуются новые КМЦ, капилляры и артериолы. По последним данным, позитивный эффект от трансплантации c-kit⁺-клеток связан не с образованием новых КМЦ, а со стимуляцией васкуляризации поврежденных участков миокарда, что позволяет сохранить жизнеспособность части поврежденных, но не погибших КМЦ за счет образования новых кровеносных сосудов и дифференцировки c-kit⁺-клеток в клетки эндотелия [10].

Sca-1⁺-клетки получили название по содержанию в них Sca-1 антигена, известного также как белок, активирующий лейкоциты (Ly-6A). В сердце человека клетки содержатся в миокарде предсердий, межпредсердной перегородке. Они имеют веретеноподобную или округлую форму и характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, а по ряду данных – маркерами CD45, CD34, CD105, а также маркерами Nkx2.5 и GATA4, дифференцируются в КМЦ, гладкомышечные клетки и клетки сосудистого эндотелия. Эффективным индуктором их дифференцировки является 5-азоцитидин. При введении в кровеносное русло Sca-1⁺-клетки мигрируют в поврежденный миокард и дифференцируются в КМЦ [11].

Isl-1-клетки, представляя собой популяцию недифференцированных клеток-предшественников, появляются при эмбриогенезе (обнаруживаются только в сердце новорожденных) и участвуют в развитии сердца. Они получили свое название благодаря содержанию в них белка энхансера гена инсулина. Большинство клеток расположено в предсердиях, правом желудочке, сосудах сердца и некоторых отделах левого желудочка. В сердце взрослого млекопитающего данные клетки не обнаружены. У 1–5-дневной крысы в сердце содержится не более 500–600 Isl-1⁺-прогениторных клеток [12].

Кардиальные прогениторные клетки побочной популяции (SP) способны выкачивать из клеток краситель Hoechst с помощью транспортного белка ABCG2/MDR-1, тогда как другие клетки необратимо накапливают краситель. Количество SP-клеток в ткани невелико. Оказалось, что SP-клетки реализуют сходную для ЭСК молекулярную программу. Их количество в сердечной ткани не превышает 1 % от количества всех клеток. В свежeweделенных SP-клетках регистрируются транскрипционные факторы кардиомиоцитарной и эндотелиальной дифференцировки. По данным микроэррей-измерений, SP-клетки практически соответствуют другому типу некоммитированных прогениторных клеток сердца – c-kit⁺. П. Анверса с соавт. [13] показано, что клетки этой популяции экспрессируют гены c-kit, Sca-1 и MDR-1.

При сокультивировании *in vitro* SP-клеток с КМЦ наблюдается индукция кардиомиогенеза и образуются так называемые кардиосферы. Сначала регистрируются транскрипционные факторы Mef2 и белки GATA3/4, cTn1, α -актин I и коннексин 43 [3]. Внутри кардиосферы формируются трехмерные структурные образования, сходные с клеточными «нишами» в миокарде. Таким образом, кардиосферы состоят из разных клеток: в их центре находятся недифференцированные клетки, экспрессирующие c-kit, а по периферии – клетки, экспрессирующие кардиомиоцитарные и эндотелиальные маркеры.

Flk-1⁺-прогениторные клетки, получившие название по маркеру (fetal liver kinase 1-Fkl-1), экспрессируют транскрипционный фактор Mef2t, Nkx2.5. Эти маркеры изолированы из эмбриональных стволовых клеток и ранних эмбрионов. Fkl-1⁺-клетки превращаются в КМЦ. Принято считать, что Flk1⁺-клетки являются общими предшественниками КМЦ, эндотелиальных клеток и гладкой мускулатуры сосудов [14].

SSEA1⁺-прогениторные клетки сердца [3] названы по имени маркера stage specific embryonic antigen 1, изолированы из неонатальных и взрослых сердец крыс. Для них также характерны маркеры Oct4, c-kit, Sca-1. В неонатальном периоде эти клетки экспрессируют маркеры Nkx2.5, GATA4 и тяжелые цепи миозина. В колониях SSEA⁺-клетки обладают способностью к сокращениям. Неонатальные SSEA⁺-клетки экспрессируют также маркеры мезенхимальных стволовых клеток (CD105⁺, CD166⁺, CD73⁺, CD59⁺, CD44⁺) и не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток (CD45⁻, CD133⁻, CD34⁻).

GCP-гликолитические прогениторные клетки сердца связывают с существованием клеточных «ниш» не только в субэпикардии, но и в миокарде [15]. В эпи- и субэпикардальных «нишах» обнаружены клетки, возникающие при гипоксии (транскрипционный индуцированный гипоксией фактор- Hif-1 α). Ген данного фактора конститутивен, но его продукт стабилен только при низких (2–5 %) концентрациях O₂. К данным клеткам оказался применим термин «клетки с низким митохондриальным потенциалом» (low MP). Они экспрессируют маркеры Nkx2.5, GATA4, Wt-1, Tbx18.

Ткань сердца представляет собой сложную надмолекулярную структуру, состоящую из кантрактильных и поддерживающих клеток, окруженных экстраклеточным матриксом и пронизанную клеточными волокнами и кровеносными сосудами. В качестве структурно-функциональной единицы рассматриваются так называемые «ниши», о которых упоминалось выше.

Какие структурные и функциональные компоненты входят в состав «ниши»? Это различные клетки (КМЦ, эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, стромальные и иммунные клетки, сигнальные молекулы (*Notch*), продукты паракринной активности клеток (факторы роста, цитокины, интегрины). Все они локализуются в упорядоченной сети экстраклеточного матрикса и находятся в «нише» в состоянии сложных взаимодействий, контролируемых генетическими, эпигенетическими и паракринными факторами. Можно сказать, что физико-химические условия стимулируют функционирование ключевых структурных компонентов «ниши» и прежде всего КМЦ. Более того, «ниша» защищает клетки от действия повреждающих стимулов, сохраняя их функцию в рамках тканевого гомеостаза [24]. Следует отметить еще один момент: в одной и той же «нише» собраны различные прогениторные стволовые клетки, способные к дифференцировке по трем кардиальным направлениям: кардиомиоцитарному, эндотелиальному и гладкомышечному [25]. Разбалансировка взаимодействий между клетками внутри «ниши» вследствие эрозии телоцитов, геномной нестабильности стволовых клеток, митохондриальной дисфункции, сверхпродукции активных форм кислорода и хронического воспаления является, как полагают, причиной потери резидентными прогениторными клетками способности быстро реагировать на повреждение. Именно такая ситуация и имеет место, например, при инфаркте миокарда.

Другими словами, клетки «ниши» интегрируют сигналы, поступающие от организма и из внешней среды, и в зависимости от этого контролируют поведение стволовых клеток. Благодаря сигналам, поступающим в «нишу», поведение стволовых клеток с использованием экспрессии определенных генов находится под жестким контролем организма. Например, экспрессия гена *Oct4* лежит в основе поддержания жизнеспособности стволовых клеток [26], а действие паракринных факторов, продуцируемых стволовыми клетками, также обладает целевой направленностью. На базе реализации действия химических стимулов стволовые клетки могут покидать (мобилизация) или снова возвращаться (хоуминг) в свои «ниши».

Взаимодействие стволовых клеток с кардиомиоцитами в «нише». Основная задача, выполняемая стволовыми клетками сердца, – дифференцироваться в функционально-активные КМЦ с последующей их интеграцией в ткань миокарда. Контроль дифференцировки стволовых клеток в миокарде осуществляется микроокружением в рамках прямой межклеточной сигнализации, которая определяет направление дифференцировки. В настоящее время экспериментально

подтверждены три основных типа взаимодействия стволовых и прогениторных клеток с КМЦ, в той или иной степени связанных с трансдифференцировкой. Это слияние клеток, образование межклеточных контактов классического типа (щелевые «*gap*»-контакты) и недавно описанный тип контактов – туннельные нанотрубочки [26].

В последнее время появился ряд работ, демонстрирующих возможность слияния стволовых клеток с нейтральными предшественниками, гепатоцитами и кардиомиоцитами. Трансплантированные прогениторные клетки сердца тоже не только дифференцируются в КМЦ, но и сливаются с ними в миокарде, возвращая им способность к пролиферации. Более того, показана возможность спонтанного слияния неонатальных КМЦ с различными типами стволовых клеток, мезенхимальными клетками костного мозга, эндотелиальными и прогениторными клетками.

Щелевые контакты являются основным типом взаимодействия кардиомиоцитов в миокарде. Именно за счет щелевых контактов кардиомиоциты образуют единую электрически сопряженную сеть в отделах сердца, любое нарушение в которой приводит к возникновению аритмий вплоть до фибрилляции. Нарушение проводимости в миокарде является главным негативным последствием ишемических поражений и формирования рубцовой ткани после инфаркта, а следовательно, восстановление сопряженности КМЦ является основной задачей регенеративной клеточной терапии [26].

Помимо щелевых контактов между соседними клетками возможен еще один тип коммуникации – туннельные нанотрубочки, представляющие собой тонкие филаменты диаметром 50–200 нм и являющиеся, по сути, мембранными каналами. Эти образования способны осуществлять передачу различных внутриклеточных компонентов между клетками, расположенными даже достаточно далеко друг от друга, что отличает их от щелевых контактов, соединяющих клетки только при тесном соприкосновении мембранных поверхностей [26].

В контексте клеточной терапии поврежденных миокарда нанотрубочки представляют интерес с нескольких позиций (табл. 1).

Во-первых, наряду с плотными межклеточными контактами нанотрубочки могут способствовать интеграции донорских стволовых клеток и прогениторных клеток в сердечную мышцу, восстановлению электропроводности и синхронизации сократительной активности КМЦ реципиента и трансплантированных клеток, являясь, таким образом, важным звеном регуляции процессов развития и дифференцировки клеток при эмбриогенезе, постнатальном развитии и, в частности, дифференцировки стволовых клеток и прогениторных клеток в КМЦ при клеточных трансплантациях [26].

Во-вторых, при рассмотрении данных табл. 1 возникает несколько вопросов: 1) чем вызвана наблюдаемая вариабельность прогениторных клеток, идентифицированных по экспрессии не-

Т а б л и ц а 1. Типы стволовых и прогениторных клеток кардиомиоцитарной линии и их характеристики

Table 1. The types of stem and progenitor cells of cardiomyocyte lineage and their characteristics

Популяция клеток сердца	Потентность, дифференцировочный потенциал	Позитивные маркеры	Ссылки
c-kit ⁺	Мультипотентны, дифференцируются в КМЦ, гладкие мышечные клетки, эндотелиальные клетки	c-kit ⁺ , GATA4 ⁺ , CD31 ⁺ , Nkx2.5 ⁺ , Sca1 ⁺ , CD105 ⁺ , Mef2c ⁺ , ABCG2 ⁺	[16]
Sca-1 ⁺	Мультипотентны, дифференцируются в КМЦ через образование кардиосфер	GATA4 ⁺ , Nkx2.5, Nkx2.5 ⁺ , Sca-1 ⁺ , CD105 ⁺ , Mef2c ⁺	[17]
Isl-1 ⁺	Дифференцируются в кардиомиоцитарном направлении; содержатся только в неонатальном сердце	Isl-1 ⁺ , GATA4 ⁺ , CD31 ⁺ , Nkx2.5 ⁺	[18]
Побочная популяция (SP)	Мультипотентны, дифференцируются в кардиомиоцитарном направлении	c-kit ⁺ , GATA4 ⁺ , Nkx2.5 ⁺ , cTn1 ⁺ , CD105 ⁺ , ABCG2 ⁺	[19]
Клетки кардиосфер (CSp)	Мультипотентны, дифференцируются в кардиомиоцитарном, эндотелиальном и гладкомышечном направлениях	c-kit ⁺ , KDR ⁺ , GATA4 ⁺ , CD34 ⁺ , Nkx2.5 ⁺ , Sca-1 ⁺ , ABCG2 ⁺	[20]
Flk-1 ⁺	Мультипотентны, дифференцируются в кардиомиоцитарном и эндотелиальном направлениях	Flk1 ⁺ , CD45 ⁺	[21]
SSEA-1 ⁺	В присутствии КМЦ дифференцируются в КМЦ	GATA4 ⁺ , Nkx2.5 ⁺ , c-kit ⁺ , Sca-1 ⁺	[22]
GCP	Дифференцируются в кардиомиоцитарном, эндотелиальном и гладко-мышечном направлениях	Hif-1α ⁺ , Tbx18 ⁺ , Nkx2.5 ⁺ , GATA4 ⁺ , Wt-1 ⁺	[23]

скольких поверхностных маркеров; 2), почему в «нише» присутствует более чем один тип прогениторных клеток и почему спектр поверхностных маркеров у многих прогениторных клеток перекрывается; 3) связано ли наблюдаемое разнообразие прогениторных клеток с выполнением основной задачи сердца при его повреждении – образованием рубца и восстановлением кардиального гомеостаза. Эти вопросы требуют ответов.

Стволовые и прогениторные клетки сердца и их возможное использование при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. С начала 2000-х годов ведутся исследования по применению различных типов стволовых клеток в терапии ССЗ человека. На сегодняшний день в мире осуществляется более 150 клинических испытаний по изучению эффективности применения аутологичных и аллогенных стволовых клеток при лечении ССЗ. Большое количество описанных экспериментов на животных и человеке с очевидностью продемонстрировало, что функция поврежденного сердца может быть восстановлена путем введения в организм стволовых клеток, предварительно в большом количестве размноженных *in vitro*. Как установлено, некоторые из стволовых клеток в зоне повреждения сердца пролиферируют и дифференцируются в КМЦ [2]. Известно также, что извне трансплантированные в сердечную мышцу стволовые клетки выделяют различные биологически активные вещества (ростовые факторы, цитокины и др.), благодаря чему в месте повреждения запускаются мощные репаративные процессы [2]. Однако в большинстве случаев такая дифференцировка была ограничена и не оказывала заметного эффекта на протекание регенеративных процессов в сердце, что обуславливало необходимость многостороннего анализа механизмов сердечной регенерации, вызываемой стволовыми клетками.

На сегодняшний день в разработке и применении клеточных технологий в кардиологии используются три основных подхода. Первый – это трансплантация стволовых клеток в миокард с целью возмещения недостатка в нем сократительных элементов; второй – стимуляция репаративных процессов в сердечной мышце; третий – обеспечение роста новых кровеносных сосудов (неоангиогенез) за счет собственных стволовых и прогениторных клеток, направленного на ликвидацию дефицита кровоснабжения ишемизированных зон путем улучшения васкуляризации миокарда [3].

Эксперименты, результаты которых подтвердили терапевтический эффект стволовых клеток при лечении инфаркта миокарда, впервые были выполнены на мышах. Введение стволовых клеток, взятых из костного мозга животных со встроенным в них геном зеленого флуоресцентного белка, в сердечную мышцу экспериментальных животных с инфарктом миокарда путем перевязки коронарной артерии сопровождалось стимуляцией ангиогенеза и пролиферацией КМЦ. Аналогичные положительные результаты были получены и при введении в ишемизированный миокард экспериментальных животных стволовых клеток человека [1].

Причиной ССЗ человека являются нарушения функционирования сердца и структурно-функционального состояния кровеносных сосудов. По мнению многих кардиологов, к ним относятся ишемическая болезнь сердца, инсульт, заболевания периферических артерий и сердечная недостаточность [27].

В течение двух последних десятилетий в лечебную практику внедрены новые методы терапевтического и хирургического лечения ССЗ [27]. Тем не менее, новые клеточные подходы все еще мало востребованы. В этом отношении следует особо остановиться на результатах опытов со стволовыми клетками, начиная от эмбриональных, мезенхимальных, индуцированных плюрипотентных стволовых и заканчивая РПКС сердца.

ЭСК дифференцируются в КМЦ, однако их использование на данный момент представляет только исторический интерес. Имеется лишь одна работа, в которой показано, что ЭСК у крыс улучшали функциональное состояние сердца, подвергнутого искусственной ишемии. Вместе с тем общепринято, что использование ЭСК сопряжено с этическими противопоказаниями и возможностью образования тератом и иммунного отторжения после трансплантации клеток [28].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки, обладающие рядом преимуществ по сравнению с ЭСК, пока не нашли в лечебной практике широкого применения. Единичные эксперименты, проведенные на животных, показали значительное улучшение функций сердца при модельном инфаркте миокарда.

Результаты доклинических испытаний терапевтического действия кардиальных и прогениторных клеток послужили толчком к проведению клинических испытаний. Применялись

различные методики доставки клеточного материала в поврежденные участки сердечной ткани: а) внутрикоронарные инфузии с использованием катетеризации коронарных артерий; б) внутривенные инъекции; в) прямые внутримиекардиальные инъекции в проксимальные области поврежденного миокарда; г) трансэндокардиальные инъекции, осуществляемые через катетер, вводимый в кардиальные артерии [11].

В литературе приводятся данные о трех группах клинических испытаний: ALCADIA (*autologous human cardiac-derived stem cells to ischemic cardiomyopathy*), SCIPIO (*cardiac stem cells in patient with ischemic cardiomyopathy*) и CADUCEUS (*intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration*).

В табл. 2, взятой из работы [11], дано описание трех групп клинических экспериментов. В экспериментах ALCADIA обследовано 6 больных ишемией и кардиомиопатией, у которых фракция выброса левого желудочка составляла 15–45 % от нормы. Пациентам вводили 500 000 стволовых клеток и bFGF в эпикард через артериальный шунт при его хирургическом образовании [11]. В случае SCIPIO стволовые клетки вводили непосредственно в инфарктный очаг. Наблюдалось уменьшение площади инфарктного поражения и улучшался выброс крови из левого желудочка [29]. В первой фазе клинических испытаний CADUCEUS пациентам через 1,5–3 мес. после инфаркта вводили 25 млн стволовых клеток в составе кардиосфер в связанную с инфарктом артерию. В результате площадь миокарда уменьшалась с 7,7 % через 6 мес. до 12,3 % через год наблюдений [30].

К сожалению, приведенные данные не указывают на перспективность использования стволовых и прогениторных клеток при лечении постинфарктного сердца, что в целом не позволяет заменить эти клеточные подходы в случаях, когда пересадка донорского сердца пациентам с ХСН становится неизбежной.

Еще одним, казалось бы обнадеживающим, терапевтическим подходом для лечения сердечной недостаточности рассматривалось использование экзосом, которые синтезируются МСК и выделяются из них в окружающую среду. Экзосомы представляют собой липидные везикулы, содержащие разные белки, которые способны оказывать влияние на процессы ангиогенеза и воспаления [31]. В модельных экспериментах было показано, что экзосомы с введенным в них белком Mesр2 и микроРНК оказывают кардиопротекторный эффект через снижение апоптоза.

В заключение остановимся на использовании в кардиологии в качестве лечебного фактора мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ), получивших в последние годы большую популярность среди исследователей благодаря большому содержанию МСК в жировой ткани по сравнению с костным мозгом и тканью пуповины. Преимуществом при использовании МСК при лечении ССЗ является простота их выделения из биоматериала и дальнейшее культи-

Т а б л и ц а 2. Условия проведения и результаты клинических испытаний применения стволовых клеток при сердечной недостаточности

Table 2. Conditions and results of clinical trials of the use of stem cells in heart failure

Показатель	ALCADIA	SCIPIO	CADUCEUS
Тип стволовых клеток	Аутологичные резидентные клетки сердца (SC), bFGF	c-kit ⁺ , Scal ⁺	Кардиосферные клоны
Количество клеток	500 000	1 000 000	25 000 000
Клеточные маркеры, метод выделения	CD105/CD90	Магнитная сортировка	CD105/CD45
Источник клеток	Биоптаты эндомиокарда	Правый артериальный придаток	Биоптаты эндомиокарда
Объект инъекции	Эпикард	Инфарктный очаг	Область над ангиопластическим катетером
Метод доставки	Инъекция в миокард	Внутрисердечная инфузия	Внутрисердечная инъекция
Число пациентов	6	16	7
Фракция выброса левого желудочка	9–12 %	8–12 %	Не определено
Уменьшение размера рубца	3,3 %	Не определено	8–12 %

вирование. Показано, что МСК надежно дифференцируются в кардиомиоцитарном направлении и в аутологичном варианте их трансплантация в организм не вызывает иммунного ответа. По зарубежным данным, в настоящее время проводится более 130 клинических испытаний с МСК ЖТ. Эти клетки легко дифференцируются не только в КМЦ, но и в эндотелиальные и гладкомышечные клетки. Большинство экспериментов до сих пор проводилось на животных.

Полученные данные были разбиты на три группы в соответствии с механизмами наблюдаемых позитивных эффектов. Эти эффекты были обусловлены: а) дифференцировкой стволовых клеток в клетки новой сердечной ткани; б) паракринным действием и, как результат, васкуляризацией постинфарктной ткани; в) паракринным действием, повышающим жизнеспособность ткани и предотвращающим апоптоз. В последнее время исследователи, работающие с МСК ЖТ, склоняются к выводу, что именно синтезируемые белковые факторы благодаря их паракринному действию являются наиболее терапевтически привлекательными. Среди ключевых белковых факторов следует отметить факторы роста, EGF (эпидермальный), HGF (гепатоцитарный), IGF (инсулиновый) факторы, а также некоторые микроРНК.

Проект APOLLO явился первым клиническим исследованием, в котором МСК ЖТ были использованы для лечения инфаркта миокарда у пациентов, у которых в ЭКГ компонент ST был выше изолинии и была нарушена проводимость возбуждения. В ходе исследований установлено, что через 6 мес. после внутрисердечной инфузии клеток функция миокарда у 9 пациентов улучшилась (увеличилась перфузия миокарда и на 50 % уменьшился размер очага поражения). Никаких побочных эффектов не выявлено [32]. Вместе с тем сложилось мнение, и оно общепринятое, что при прямом введении МСК в миокард основной причиной их небольшого эффекта является или гибель МСК в очаге поражения, или достаточно быстрый их выход из очага. Действительно, если при инфаркте миокарда гибнут миллиарды КМЦ, трудно ожидать ощутимого восстановления их количества после введения в миокард пусть даже несколько десятков миллионов МКС.

Причинами быстрой гибели МСК, как предполагается, могут быть: а) дефекты в плазматической мембране МСК (появление течи) из-за сильного компрессионного механического стресса в ходе инъекции; б) апоптоз или некроз МСК под влиянием воспаления, гипоксии, или, наоборот, оксидативного стресса, вызываемого супероксид анионами и пероксидом водорода; в) низкая самообновляемость в ишемическом миокарде, дефицит кислорода и разрушения экстрацеллюлярного матрикса. Наконец, клетки вводятся в ритмично сокращающуюся сердечную мышцу, т. е. попадают в условия постоянного механического стресса, далекие от условий естественной кардиальной «ниши». Неудивительно, что они могут быстро погибнуть после трансплантации.

Экстраклеточные протекторы сердечной мышцы. В последние годы стали очень популярными новые подходы для лечения ХСН с использованием секрета МСК. Речь идет о различных продуктах секреторной активности этих клеток. Теоретически компоненты секрета МСК обладают способностью «спасать» поврежденные клетки, а следовательно, и поврежденные ткани в целом и ускорять репаративные процессы [33]. К секретому относятся широкий набор различных факторов роста, цитокинов и даже целых митохондрий, которые, выходя из МСК в окружение, взаимодействуют с его клеточными и структурными компонентами. Все биологически активные факторы МКС действуют по 5 механизмам: через стимуляцию ангиогенеза, регенерацию КМЦ, подавление фиброза, ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса, подавление локального воспалительного процесса [34]. Обычно они обнаруживаются в супернатанте после центрифугирования культуральной среды, содержащей МСК [35]. Среди них обнаруживаются различные цитокины, такие как TNF- α , IL-6, IL-8, обладающие противовоспалительным действием и вызывающие повышение резистентности КМЦ к ишемии. Там обнаруживаются также многочисленные белковые факторы роста, проявляющие полифункциональную активность. Описывается несколько вариантов доставки компонентов секрета к своим «мишеням», входящим в состав «ниши».

В первом случае они прямо секретуются стволовыми клетками в их окружение, при этом эффективность их действия, по-видимому, не является высокой ввиду низкой адресности действия. Описаны, однако, и более специализированные способы доставки компонентов секрета МСК к «клеткам-мишеням». Для этого в организме используются уже упоминавшиеся выше туннельные нанотрубочки, по которым целенаправленно транспортируются от МСК к клеткам-мишеням различные ионы, РНК, пептиды и белки и даже такие органеллы, как митохондрии.

Другой способ доставки осуществляется с помощью экзосом и микровезикул, формирующихся внутри стволовых клеток и накапливающих в себе компоненты секрета [36]. Экзосомы, продукты внутриклеточных эндосом, имеют размер 30–100 нм, и в роли их оболочки выступает плазматическая мембрана. У микровезикул размер больший – 50–1000 нм. Главное биологически активное содержимое экзосом – ферменты глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, энлаза, пируваткиназа, фосфоглицераткиназа и фосфоглюкомутаза, глутатион-S-трансфераза и пре-оксиредоксин, подавляющий оксидативный стресс, а также разнообразные некодирующие РНК (ncRNA), включая микро РНК (miRNA). Экзосомы, как считают, являются основным инструментом переноса между клетками мРНК и микроРНК. Последние представляют собой небольшие (19–24 нуклеотидов) одноцепочечные некодирующие РНК (миРНК-1, -16, -276, -301, -126, -133, -143 и др.), которые регулируют процессы экспрессии генов на посттранскрипционном уровне и выступают в многочисленных организмах в роли эффекторов внутриклеточной сигнализации и регуляторов дифференцировки клеток, процессов метаболизма и развития [37]. Именно благодаря микроРНК экзосомы обладают потенциальной терапевтической ценностью. В случае стволовых клеток микроРНК выполняют регуляторную роль в ходе клеточного цикла, в установлении потенции и осуществлении дифференцировки. Оказалось также, что микроРНК модулируют репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки под влиянием транскрипционных факторов c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2. Их функции в случае стволовых клеток разнообразны: они ингибируют процессы апоптоза/некроза поврежденных клеток, подавляют воспалительные процессы и активируют пролиферацию клеток в течение репарации тканей.

Использование компонентов секрета при инфаркте миокарда описано в модельных экспериментах острого инфаркта миокарда, в ходе которых данные препараты вводили интракоронарно, а также интрамикардиально в виде клеточных компонентов [37].

В модельных опытах использовали и экзосомы, полученные из кардиальных стволовых клеток. Так, например, микроРНК-138 подавляла экспрессию гена белка p53 и тем самым оптимизировала образование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [38]. С другой стороны, микроРНК-1 стимулировала их дифференцировку в КМЦ [39], а ее введение внутрь сердечной мышцы после инфаркта миокарда уменьшало размер постинфарктного рубца при сохранении объема фракции выброса крови желудочками [24].

Большое значение придается митохондриям, которые с помощью туннельных нанотрубочек доставляются к КМЦ [40], интегрируются с ними и оказывают им энергетическую поддержку, восстанавливая процессы дыхания в поврежденных КМЦ [33].

Следующим объектом научно-исследовательского интереса в последние годы явились разнообразные биоконструкции – композиты на основе коллагена, фибрина, биodeградируемых гелей и компонентов искусственного внеклеточного матрикса [34]. Тем не менее, по всем перечисленным выше направлениям проведены в основном доклинические испытания. И даже если будут получены позитивные результаты в клинике, широкое использование продуктов функционирования МСК в их разных вариантах неизбежно будет тормозиться вследствие трудностей их получения в терапевтических количествах.

Заключение. Функция сердца как постоянно действующего насоса заключается в поддержании оптимального кровоснабжения органов и тканей, что обеспечивается ритмическими сокращениями миокарда, в состав которого входят КМЦ, экстрацеллярный матрикс и капиллярная микроциркуляторная сеть. Основным ССЗ является инфаркт миокарда. Он приводит к ишемическому некрозу миокарда, в результате чего ослабляется сердечная функция и запускаются процессы ремоделирования в зонах поражения миокарда и в его непораженных участках, непосредственно примыкающих к области некроза. Созревший рубец ограничивает сократительную функцию миокарда, вызывает гипертрофию неповрежденного миокарда. При тяжелых формах инфаркта миокарда наступает дилатация желудочков, ХСН и, в конечном счете, смерть.

До недавних пор терапевтическое ремоделирование сердца после инфаркта миокарда с целью снизить темпы развития ХСН осуществлялись с помощью разнообразных лекарственных средств, поскольку считалось, что миокард, в противоположность многим другим клеткам, дифференцирован терминально и не способен к регенерации после повреждения.

Однако это оказалось не так. В сердечной ткани содержится целое семейство стромальных клеток: РПКС, оказывающих протективное, иммуномодулирующее, противовоспалительное и подавляющее фиброз действие, на чем и базируется репаративная способность сердечной мышцы после повреждения. Данные клетки секретируют различные факторы роста, среди которых наиболее значимыми являются VEGF, HGF, SDF-1, IGF-1, bFGF. Они индуцируют в сердечной мышце ангиогенезис, образование новых КМЦ, эндотелиальных и гладкомышечных клеток.

Анализ существующих литературных данных позволяет заключить, что наиболее оптимальными клетками для лечения постинфарктной ХСН являются аутологичные РСКС. Они дают ощутимый и надежный эффект. Но, к сожалению, их содержание в сердечной ткани невелико и получить значительные объемы клеточного материала при их культивировании достаточно сложно. По этой же причине вряд ли найдут применение различные прогениторные клетки. Более того, в нормально функционирующем сердце их нет, и они появляются, по-видимому, сразу после повреждения миокарда вследствие распространения сигнала на острую потребность в стволовых клетках. Именно поэтому и возникает целое семейство прогениторных клеток как результат последовательных превращений резидентных МСК.

Низкое содержание прогениторных стволовых клеток в сердечной ткани, нечетко выраженный терапевтический эффект при их использовании в модельных экспериментах ставит под сомнение их широкое использование в ближайшем будущем в клинической практике. Сомнительным представляется также применение экзосом МСК и различных композитов, содержащих биологически активные факторы роста, микроРНК вследствие препаративных сложностей и трудностей при получении терапевтических количеств этих препаратов. Естественным поэтому и наиболее оптимальным выбором представляется использование аутологичных МСК, которые можно получить из костного мозга и жировой ткани пациента.

Остается, однако, непонятным, в каком направлении должна развиваться клеточная биотехнология ССЗ и в первую очередь постинфарктной ХСН. Очевидно, что клеточная кардиология не стоит на месте и все усилия будут направлены на создание технологий, способных внести решающий вклад в решение проблемы на стадиях болезни, предшествующих трансплантации донорского сердца, которая часто неизбежна. Наиболее перспективным использованием клеточного материала сердца в кардиологии представляется подбор и испытание эффективности разнообразных биокомпозитов на основе скаффолдов, что позволит хотя бы не полностью создать в окружении введенных в миокард клеток физико-химические условия «ниши», предотвратить их массовую гибель и возможный уход из очага повреждения. Другим перспективным подходом может быть формирование с помощью 3D-принтинга упорядоченных тканевых структур (биокомпозитов), содержащих КМЦ и оптимальный набор паракринных факторов, которые можно будет использовать в качестве «заплаток» при оперативных вмешательствах на сердце, например дилатационной кардиомиопатии. В недалекой перспективе следует ожидать появления методов выращивания сердца пациента в организме животных – инкубаторах, которое можно будет использовать при трансплантации вместо донорского органа. Такие работы на животных уже активно ведутся за рубежом. И в дальней перспективе (возможно, через 10 лет) будут разработаны методы 3D-принтинга сердца, обладающего всеми структурно-функциональными свойствами сердца как обычного человеческого органа.

Список использованных источников

1. Concise review: is cardiac cell therapy dead? Embarrassing trial outcomes and direction for the future / J.-N. Tang [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* – 2018. – Vol. 7, N 4. – P. 354–359. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0196>
2. Стволовые клетки сердца / К. А. Рубина [и др.] // *Биология стволовых клеток и клеточные технологии* / под ред. М. А. Пальцева. – Т. 2. – М., 2009. – С. 75–99.
3. Резидентные стволовые клетки сердца / К. В. Дергилев [и др.] // *Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения* / под ред. В. А. Ткачука. – М., 2009. – С. 383–428.
4. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans / O. Bergmann [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 324, N 5923. – P. 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>
5. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury / P. C. Hsieh [et al.] // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, N 8. – P. 970–974. <https://doi.org/10.1038/nm1618>
6. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction / A. P. Beltrami [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 344, N 23. – P. 1750–1757. <https://doi.org/10.1056/nejm200106073442303>

7. Clonality of mouse and human cardiomyogenesis *in vivo* / T. Hosoda [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, N 40. – P. 17169–17174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903089106>
8. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis / G. M. Ellison [et al.] // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. – 2007. – Vol. 4, N 1. – P. S52–S59. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0773>
9. Adult cardiac stem cell aging: a reversible stochastic phenomenon? / E. Cianflone [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2019. – Vol. 2019. – Art. 5813147. <https://doi.org/10.1155/2019/5813147>
10. C-kit позитивные резидентные стволовые клетки миокарда у больных ишемической болезнью сердца / К. В. Дергилев [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина / под ред. В. А. Ткачука. – М., 2012. – С. 107–138.
11. Stem cells in regenerative cardiology / S. Arbatli [et al.] // Cell Biology and Translational Medicine / ed. K. Turksen. – Cham, 2018. – Vol. 1. – P. 37–53. – (Advances in Experimental Medicine and Biology ; Vol. 1079).
12. Functional cardiomyocytes derived from Isl1 cardiac progenitors via Bmp4 stimulation / E. Cagavi [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 12. – P. e110752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110752>
13. Cardiac stem cells and the failing heart / P. Anversa [et al.] // Cardiovascular regeneration and stem cell therapy / ed. : A. Leri, P. Anversa, W. H. Frishman. – Malden, 2007. – P. 201–211.
14. Le, T. Y. L. Cardiac progenitor cells for heart repair / T. Y. L. Le, J. J. H. Chong // Cell Death Discov. – 2016. – Vol. 2. – Art. 16052. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.52>
15. Adult cordial stem cells are multipotent and support myocardial regeneration / A. P. Beltrami [et al.] // Cell. – 2003. – Vol. 114, N 6. – P. 763–776. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00687-1)
16. OPLA scaffold, collagen I, and horse serum induce a higher degree of myogenic differentiation of adult rat cordial stem cells / V. Di Felice [et al.] // J. Cell Physiol. – 2009. – Vol. 221, N 3. – P. 729–739. <https://doi.org/10.1002/jcp.21912>
17. Scd1-derived cells are a source of myocardial renewal in the marine adult heart / S. Uchida // Stem Cell Reports. – 2013. – Vol. 1, N 5. – P. 397–410. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.09.004>
18. Postnatal isl-1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages / K.-L. Laugwitz [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 433, N 7026. – P. 647–653. <https://doi.org/10.1038/nature03215>
19. Cordial regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart / S. Lyngbaek [et al.] // Basic Res. Cardiol. – 2007. – Vol. 102, N 2. – P. 101–114. <https://doi.org/10.1007/s00395-007-0638-3>
20. Isolation and expansion of adult cordial stem cells from human and marine heart / E. Messina [et al.] // Circ. Res. – 2004. – Vol. 95, N 9. – P. 911–921. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147315.71699.51>
21. Molecular basis for Flk-1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse / H. Ishitobi [et al.] // Development. – 2011. – Vol. 138, N 24. – P. 5357–5368. <https://doi.org/10.1242/dev.065565>
22. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells / H. C. Ott [et al.] // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. – 2007. – Vol. 4, N S1. – P. S27–S39. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0771>
23. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest / A. I. Mahmoud [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 497, N 7448. – P. 249–253. <https://doi.org/10.1038/nature12054>
24. Endogenous cardiac stem cells / L. Barile [et al.] // Prog. Cardiovasc. Dis. – 2007. – Vol. 50, N 1. – P. 31–48. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2007.03.005>
25. Cardiac stem cells and their niches / A. Leri [et al.] // Cardiovascular regeneration and stem cell therapy / ed. : A. Leri, P. Anversa, W. H. Frishman. – Malden, 2007. – P. 87–94.
26. Плотников, Е. Ю. Стволовые клетки в регенеративной терапии сердечных заболеваний: роль межклеточных взаимодействий / Е. Ю. Плотников, Д. Б. Зоров, Г. Т. Сухих // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, № 1. – С. 43–49.
27. Enhancement of functionality and therapeutic efficacy of cell-based therapy using mesenchymal stem cells for cardiovascular disease / C. W. Yun [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, N 4. – P. E982. <https://doi.org/10.3390/ijms20040982>
28. Chase, M. W. Multiple disseminated granulomata in sensitized guinea pigs / M. W. Chase // Ryumachi. – 1975. – Vol. 15, N 4. – P. 389–390.
29. Cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomized phase 1 trial / R. Bolli [et al.] // Lancet. – 2011. – Vol. 378, N 9806. – P. 1847–1857. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61590-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61590-0)
30. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomized phase 1 trial / R. R. Makkar [et al.] // Lancet. – 2012. – Vol. 379, N 9819. – P. 895–904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60195-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60195-0)
31. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappa B signaling / J. D. Anderson [et al.] // Stem Cells. – 2016. – Vol. 34, N 3. – P. 601–613. <https://doi.org/10.1002/stem.2298>
32. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review / E. Martin-Rendon [et al.] // Eur. Heart J. 2008. – Vol. 29, N 15. – P. 1807–1818. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn220>
33. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration / J. L. Spees [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 103, N 5. – P. 1283–1288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510511103>
34. Huang, K. A new era of cardiac cell therapy: opportunities and challenges / K. Huang, S. Hu, K. Cheng // Adv. Health. Mater. – 2019. – Vol. 8, N 2. – P. e1801011. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801011>
35. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury: JACC review topic of the week / S. M. Davidson [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2019. – Vol. 73, N 1. – P. 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.086>
36. Raposo, G. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends / G. Raposo, W. Stoorvogel // J. Cell Biol. – 2013. – Vol. 200, N 4. – P. 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>

37. Regenerative cardiovascular therapies: stem cells and beyond / B. Wernly [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 6. – Pii E1420. <https://doi.org/10.3390/ijms20061420>
38. MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the p53 signaling / D. Ye [et al.] // *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30, N 8. – P. 1645–1654. <https://doi.org/10.1002/stem.1149>
39. Overexpression of microRNA-1 promotes cardiomyocyte commitment from human cardiovascular progenitors via suppressing WNT and FGF signaling pathways / T.-Y. Lu [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2013. – Vol. 63. – P. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.07.019>
40. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer / A. Acquistapace [et al.] // *Stem Cells.* – 2011. – Vol. 29, N 5. – P. 812–824. <https://doi.org/10.1002/stem.632>

References

1. Tang J.-N., Cores J., Huang K., Cui X.-L., Luo L., Zhang J.-Y., Li T.-S., Quan L., Cheng K. Concise review: is cardiac cell therapy dead? Embarrassing trial outcomes and direction for the future. *Stem Cells Translational Medicine*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 354–359. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0196>
2. Rubina K. A., Akchurin R. A., Tkachuk V. A., Parfenova E. V. Cordial stem cells. *Biology of stem cells and cell technologies. Vol. 2.* Moscow, 2009, pp. 75–99 (in Russian).
3. Dergilev K. V., Rubina R. A., Sysoeva V. Yu., Gmysina A. I., Akchurin R. A., Parfenova E. V. Resident cardiac stem cells. *Autologous stem cells. Experimental research and trends in clinical application.* Moscow, 2009, pp. 383–428 (in Russian).
4. Bergmann O., Bhardwaj R. D., Bernard S., Zdunek S., Barnabé-Heider F., Walsh, S. [et al.]. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 2009, vol. 324, no. 5923, pp. 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>
5. Hsieh P. C., Segers V. F., Davis M. E., MacGillivray C., Gannon J., Molkentin J. D., Robbins J., Lee R. T. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature Medicine*, 2007, vol. 13, no. 8, pp. 970–974. <https://doi.org/10.1038/nm1618>
6. Beltrami A. P., Urbanek K., Kajstura J., Yan S.-M., Finato N., Bussani R. [et al.]. Evidence that human cardiac myocytes divide after infarction. *New England Journal of Medicine*, 2001, vol. 344, no. 23, pp. 1750–1757. <https://doi.org/10.1056/nejm200106073442303>
7. Hosoda T., D'Amario D., Cabral-Da-Silva M. C., Zheng H., Padin-Iruegas M. E., Ogorek B. [et al.]. Clonality of mouse and human cardiomyogenesis *in vivo*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 2009, vol. 106, no. 40, pp. 17169–17174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903089106>
8. Ellison G. M., Torella D., Karakikes I., Nadal-Ginard B. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2007, vol. 4, no. 1, pp. 552–559. <https://doi.org/10.1038/npcardio0773>
9. Cianflone E., Torella M., Chimenti C., De Angelis A., Beltrami A. P., Urbanek K., Rota M., Torella D. Adult cardiac stem cell aging: a reversible stochastic phenomenon. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, vol. 2019, art. 5813147, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1155/2019/5813147>
10. Dergilev K. V., Rubina R. A., Sysoeva V. Yu., Tsokolaeva Z. I., Akchurin R. A., Parfenova E. V., Tkachuk V. A. C-kit positive resident stem cells of myocardium in patients with ischemic heart disease. *Stem Cells and Regenerative Medicine.* Moscow, 2012, pp. 107–138 (in Russian).
11. Arbatli S., Aslan G. S., Kocabaş F. Stem cells in regenerative cardiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 1079. Cell Biology and Translational Medicine (Vol. 1).* Cham, 2018, pp. 37–53.
12. Cagavi E., Bartulos O., Suh C. Y., Sun B., Yue Z., Jiang Z., Yue L., Y. Qyang. Functional cardiomyocytes derived from Isl-1 cardiac progenitors via Bmp4 stimulation. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 12, p. e110752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110752>
13. Anversa P., Urbanek K., Bearzi C., de Angelis A., Rota M. Cardiac stem cells and the failing heart. *Cardiovascular regeneration and stem cell therapy.* Malden, 2007, pp. 201–211.
14. Le T. Y. L., Chong J. J. H. Cardiac progenitor cells for heart repair. *Cell Death Discovery*, 2016, vol. 2, art. 16052. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.52>
15. Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S. [et al.]. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003, vol. 114, no. 6, pp. 763–776. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00687-1)
16. Di Felice V., Ardizzone N. M., De Luca A., Marciano V., Marino Gammazza A., Macaluso F., Manente L., Cappello F., de Luca A., Zummo G. OPLA scaffold, collagen I, and horse serum induce a higher degree of myogenic differentiation of adult rat cardiac stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2009, vol. 221, no. 3, pp. 729–739. <https://doi.org/10.1002/jcp.21912>
17. Uchida S., De Gaspari P., Kostin S., Jenniches K., Kilic A., Izumiya Y. [et al.]. Sc1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports*, 2013, vol. 1, no. 5, pp. 397–410. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.09.004>
18. Laugwitz K.-L., Moretti A., Lam J., Gruber P., Chen Y., Woodard S. [et al.]. Postnatal isl-1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 2005, vol. 433, no. 7026, pp. 647–653. <https://doi.org/10.1038/nature03215>
19. Lyngbaek S., Schneider M., Hansen J. L., Sheikh S. P. Cardiac regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart. *Basic Research in Cardiology*, 2007, vol. 102, no. 2, pp. 101–114. <https://doi.org/10.1007/s00395-007-0638-3>
20. Messina E., de Angelis L., Frati G., Morrone S., Chimenti S., Fiordaliso F. [et al.]. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation Research*, 2004, vol. 95, no. 9, pp. 911–921. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147315.71699.51>

21. Ishitobi H., Wakamatsu A., Liu F., Azami T., Hamada M., Matsumoto K. [et al.]. Molecular basis for Flk-1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. *Development*, 2011, vol. 138, no. 24, pp. 5357–5368. <https://doi.org/10.1242/dev.065565>
22. Ott H. C., Matthiesen T. S., Brechtken J., Grindle S., Goh S.-K., Nelson W., Taylor D. A. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2007, vol. 4, no. S1, pp. S27–S39. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0771>
23. Mahmoud A. I., Kocabas F., Muralidhar S. A., Kimura W., Koura A. S., Thet S., Porrello E. R., Sadek H. A. Meis-1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*, 2013, vol. 497, no. 7448, pp. 249–253. <https://doi.org/10.1038/nature12054>
24. Barile L., Messina E., Giacomello A., Marbán E. Endogenous cardiac stem cells. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2007, vol. 50, no. 1, pp. 31–48. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2007.03.005>
25. Leri A., Boni A., Siggins R., Noscimbene A., Hosoda T. Cardiac stem cells and their niches. *Cardiovascular regeneration and Stem Cell Therapy*. Malden, 2007, pp. 87–94.
26. Plotnikov E. Yu., Zorov B., Sukhikh G. T. Stem cells in regenerative medicine in cardiac diseases: a role of intercellular interactions. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Cell transplantation and tissue engineering], 2009, vol. 4, no. 1, pp. 43–49 (in Russian).
27. Yun C. W., Lee S. H. Enhancement of functionality and therapeutic efficacy of cell-based therapy using mesenchymal stem cells for cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 4, p. E982. <https://doi.org/10.3390/ijms20040982>
28. Chase M. W. Multiple disseminated granulomata in sensitized guinea pigs. *Ryumachi*, 1975, vol. 15, no. 4, pp. 389–390.
29. Bolli R., Chugh A. R., D’Amario D., Loughran J. H., Stoddard M. F., Ikram S. [et al.]. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, 2011, vol. 378, no. 9806, pp. 1847–1857. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61590-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61590-0)
30. Makkar R. R., Smith R. R., Cheng K., Malliaras K., Thomson L. E., Berman D. [et al.]. Intracoronary cardio-sphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*, 2012, vol. 379, no. 9819, pp. 895–904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60195-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60195-0)
31. Anderson J. D., Johansson H. J., Graham C. S., Vesterlund M., Pham M. T., Bramlett C. S. [et al.]. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem eReveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappa B signaling. *Stem Cells*, 2016, vol. 34, no. 3, pp. 601–613. <https://doi.org/10.1002/stem.2298>
32. Martin-Rendon E., Brunskill S. J., Hyde C. J., Stanworth S. J., Mathur A., Watt S. M. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *European Heart Journal*, 2008, vol. 29, no. 15, pp. 1807–1818. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn220>
33. Spees J. L., Olson S. D., Whitney M. J., Prockop D. J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no. 5, pp. 1283–1288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510511103>
34. Huang K., Hu S., Cheng K. A new era of cardiac cell therapy: opportunities and challenges. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, vol. 8, no. 2, p. e1801011. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801011>
35. Davidson S. M., Ferdinandy P., Andreadou I., Bøtker H. E., Heusch G., Ibáñez B. [et al.]. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia reperfusion injury: JACC review topic of the week. *Journal of the College of Cardiology*. 2019, vol. 73, no. 1, pp. 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.086>
36. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 2013, vol. 200, no. 4, pp. 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
37. Wernly B., Mirna M., Rezar R., Prodinge C., Jung C., Podesser B. K., Kiss A., Hoppe U. C., Lichtenauer M. Regenerative cardiovascular therapies: stem cells and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 6, pii E1420. <https://doi.org/10.3390/ijms20061420>
38. Ye D., Wang G., Liu Y., Huang W., Wu M., Zhu S., Jia W., Deng A. M., Liu H., Kang J. miRNA-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the p53 signaling. *Stem Cells*, 2012, vol. 30, no. 8, pp. 1645–1654. <https://doi.org/10.1002/stem.1149>
39. Lu T.-Y., Lin B., Li Y., Arora A., Han L., Cui C., Coronello C., Sheng Y., Benos P. V., Yang L. Overexpression of microRNA-1 promotes cardiomyocyte commitment from human cardiovascular progenitors via suppressing WNT and FGF signaling pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 63, pp. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.07.019>
40. Acquistapace A., Bru T., Lesault P. F., Figeac F., Coudert A. E., le Coz O. [et al.]. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells*, 2011, vol. 29, no. 5, pp. 812–824. <https://doi.org/10.1002/stem.632>

Информация об авторе

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220073, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com

Information about the author

Igor D. Volotovski – Academician, 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., 220073, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com