

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2020. Т. 65, № 3

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2020. Т. 65, № 3

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

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

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

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

Главный редактор

Михаил Ефимович Никифоров – Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, 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. Волотовский** – 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 – Даугавпилский 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-Пясэцка – 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. 2020. Т. 65, № 3.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

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

Подписано в печать 17.07.2020. Выход в свет 29.07.2020. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 78 экз. Заказ 123.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,26 руб., ведомственная подписка – 29,23 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, 2020

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2020, vol. 65, no. 3

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

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The Journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus
in the State Registry of Mass Media, reg. no. 395

*The Journal is included in the List of Journals for Publication of the results
of Dissertation Research in the Republic of Belarus and in the database
of Russian Science Citation Index (RSCI)*

Editor-in-Chief

Mikhail E. Nikiforov – Scientific and Practical Center for Bioresources
of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

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

Aleksander 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
Vasilii 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. Schwartz – Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Igor A. Tikhonovich – All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, 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, 2020, vol. 65, no. 3.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *S. N. Kostsyuk*

Sent for press 17.07.2020. Output 29.07.2020. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 78 copies. Order 123.
Number price: individual subscription – 12,26 byn., departmental subscription – 29,23 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka".
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer,
distributor of printing editions no. 1/18 dated of August 2, 2013. License for press no. 02330/455 dated of December 30, 2013.
Address: F. Skorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2020

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

ЗМЕСТ

Пашкевич Л. В. Механизмы формирования системной приобретенной устойчивости у растений ярового ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.) при инфицировании возбудителем темно-бурой пятнистости	263
Хейдорова Е. Э., Никифоров М. Е., Гомель К. В., Шпак А. В., Шакун В. В., Домбровский В. Ч., Шквыря М. Г. Анализ полиморфизма митохондриального маркера D-loop лошади Пржевальского <i>Equus caballus Przewalskii</i> Poljakov, 1881 и предложения по сохранению вида в Беларуси	275
Абрамчик Л. М., Доманская И. Н., Макаров В. Н., Сердюченко Е. В., Бачище Т. С., Кондратьева В. В., Довбнюк Ю. Н., Шпилевский С. Н., Кабашникова Л. Ф. Влияние препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил» на фотосинтетический аппарат и окислительный статус растений томата в условиях малообъемной гидропоники.	283
Ермоленко Д. А., Мисюкевич А. Ю., Полешко А. Г., Волотовский И. Д. Молекулярно-генетическая природа муковисцидоза – наследственного заболевания человека	292
Ильчук И. А., Никандров В. Н. Динамика фотосинтетических пигментов в культуре водоросли <i>Chlorella vulgaris</i> штамма С 111 ИВСЕ С-19 при росте на питательной среде с добавлением хлорида марганца	299
Бусева Ж. Ф., Фарахани Ш. Г., Сысова Е. А., Озолиньш Д., Сущик Н. Н., Колмакова А. А., Верес Ю. К. Сезонные изменения таксономической структуры и фотосинтетических пигментов фитопланктона в пелагиали и литорали двух сообщающихся озер в Беларуси (на англ.)	310
Кулик Е. В., Селезнева Ю. В., Качан А. В., Русь О. Б., Евтушенков А. Н. Клонирование кДНК глюкоамилазы <i>Aspergillus awamori</i> в интегративный вектор для мицелиальных грибов методом кольцевой полимеразной реакции	319
Мальшева О. М., Михаленко Е. П., Сухарева А. П., Артюшевская М. В., Ситник Н. Г., Кулакова Г. В., Жевнеронок И. В., Кильчевский А. В., Шишко Г. А. Роль генетических нарушений в формировании инвалидирующих последствий у недоношенного новорожденного	328
Тюлькова Е. Г., Кабашникова Л. Ф. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях травянистых растений городской среды в условиях воздействия летучих органических соединений (на англ.)	342
Торчик В. И. Интродукция и использование представителей рода <i>Chamaecyparis</i> Sprach. в Беларуси	352
Ермакович А. Е., Синявская М. Г., Панкратов В. С., Левданский О. Д., Голоенко И. М., Шимкевич А. М., Луханина Н. В., Давыденко О. Г. Оценка изменчивости хлоропластных и митохондриальных геномов ячменя методом NGS-анализа оргanelльных смесей	358
Прохоров В. Н. Актуальные вопросы формирования чистых от многолетних сорняков газонных травостоев	365
Рогинский А. С., Буга С. В. Оценка вредоносности каштановой минирующей моли – инвазивного вредителя зеленых насаждений Беларуси	374
Дорошук О. В., Калацкая Ж. Н., Ламан Н. А., Горошко Н. И., Братанова М. А., Мандрик-Литвинкович М. Н., Гирилович Н. И. Влияние вносимых в торфяной субстрат бактерий рода <i>Bacillus</i> на пищевую ценность рукколы культурной (<i>Eruca sativa</i> (L.) Mill.)	379

CONTENTS

Pashkevich L. V. Mechanisms formation of systemic acquired resistance in spring barley plants (<i>Hordeum vulgare</i> L.) during infection by the pathway of dark brown spot	263
Kheidorova E. E., Nikiforov M. E., Homel K. V., Shpak A. V., Shakun V. V., Dombrovski V. Ch., Shkviryra M. G. Analysis of D-loop mitochondrial marker polymorphism of Przewalsky horses <i>Equus caballus Przewalskii</i> Poljakov, 1881 and proposals for the species conservation in Belarus	275
Abramchik L. M., Domanskaya I. N., Makarov V. N., Serdiuchenko E. V., Bachyshcha T. S., Kondratieva V. V., Dovbniuk Yu. N., Shpilevski S. N., Kabashnikova L. F. Influence of “Immunact-GK” and “Ecosil” preparations on the photosynthetic apparatus and oxidative status of tomato plants in conditions of small volume hydroponics.	283
Ermolenko D. A., Misiukevich A. Y., Poleshko A. G., Volotovskii I. D. Molecular-genetic nature of cystic fibrosis, a human hereditary disease.	292
Ilyuchyk I. A., Nikandrov V. N. Dynamics of a photosynthetic pigments level of the <i>Chlorella vulgaris</i> strain C 111 IBCE C-19 during the growth at the nutrient medium with manganese chloride addition	299
Buseva Zh. F., Farahani Sh. G., Sysova E. A., Ozolins D., Sushchik N. N., Kolmakova A. A., Veras Yu. K. Seasonal changes in the phytoplankton taxonomic structure and photosynthetic pigments in pelagial and littoral of two interconnected lakes in Belarus.	310
Kulik A. V., Selezneva Yu. V., Kachan A. V., Rus O. B., Evtushenkov A. N. Circular polymerase extension cloning of cDNA glucoamylase <i>Aspergillus awamori</i> into integrative vector for filamentous fungi	319
Malyshava V. M., Mikhailenka A. P., Suharava A. P., Artsiusheuskaya M. V., Sitnik N. G., Kulakova G. V., Ghevneronak I. V., Kilchevsky A. V., Shyshko G. A. The role of genetic disorders in the formation of disabling effects in the premature newborn	328
Tulkova E. G., Kabashnikova L. F. Photosynthetic pigments content in the urban habitat herbaceous plants leaves under the volatile organic compounds effect.	342
Torchyk U. I. Introduction and the using of representatives of the genus <i>Chamaecyparis</i> Spach. in Belarus	352
Yermakovich A. E., Siniauskaya M. G., Pankratov V. S., Liaudanski A. D., Halayenka I. M., Shymkevich A. M., Lukhanina N. V., Davydenko O. G. Barley chloroplast and mitochondrial genomes diversity evaluation by NGS of the organelle DNA mixtures.	358
Prokhorov V. N. Actual issues of forming lawn grass stands clean of perennial weeds	365
Roginsky A. S., Buga S. V. Estimation of harmfulness of the horse chestnut leaf-miner in green areas in Belarus	374
Doroshchuk O. V., Kalatskaja J. N., Laman N. A., Goroshko N. I., Bratanova M. A., Mandryk-Litvinkovich M. N., Girilovich N. I. Influence of bacteria genus <i>Bacillus</i> introduced in peat substrate on <i>Eruca sativa</i> (L.) Mill. quality	379

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.4:635.63:577.352.38

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-263-274>

Поступила в редакцию 21.02.2020

Received 21.02.2020

Л. В. Пашкевич

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

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СИСТЕМНОЙ ПРИОБРЕТЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У РАСТЕНИЙ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТЕМНО-БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ

Аннотация. Исследованы физиолого-биохимические ответные реакции растений ярового ячменя на заражение гемибитрофным фитопатогенным грибом *Bipolaris sorokiniana*. Показано, что данные ответы регулируются сигнальными путями с участием медиатора салициловой кислоты (СК), что связано с локализованным накоплением активных форм кислорода (АФК) в подвергшихся инфицированию и/или соседних клетках. Выявлено активирование выделенной из листьев ячменя на 1-е и 3-и сутки после грибного заражения микросомальной фракции НАДФН-оксидазы, которая, как известно, ответственна за быстрое образование АФК в растительных клетках под влиянием грибного заражения. При этом активность фермента пероксидазы, осуществляющего детоксикацию АФК, в частности H_2O_2 , на 1-е и 3-и сутки после воздействия увеличилась по отношению к контролю (незараженные растения) в 1,6 и 2,2 раза соответственно. Включение механизмов антиоксидантной защиты привело к стабилизации процессов перекисного окисления липидов через несколько суток после инфицирования. Показано достоверное возрастание в инфицированных тканях растений общего содержания водорастворимых фенольных веществ, оказывающих защитное действие на растения в условиях стресса, а также увеличение свободного пула эндогенной СК на 9 и 30 % в течение первых 24 ч и последующих 3 сут после инфицирования соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эндогенная СК вовлечена в ответные реакции на заражение проростков ячменя *Bipolaris sorokiniana* и является необходимым элементом для активации SAR (systemic acquired resistance), что проявляется в накоплении свободной СК и уменьшении содержания ее конъюгированной формы в ответ на заражение.

Ключевые слова: салициловая кислота, системная приобретенная устойчивость, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, пероксидаза, НАДФН-оксидаза, фенольные вещества, яровой ячмень *Hordeum vulgare*, *Bipolaris sorokiniana*

Для цитирования: Пашкевич, Л. В. Механизмы формирования системной приобретенной устойчивости у растений ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) при инфицировании возбудителем темно-бурой пятнистости / Л. В. Пашкевич // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 263–274. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-263-274>

Lyubov V. Pashkevich

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

MECHANISMS FORMATION OF SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE IN SPRING BARLEY PLANTS (*HORDEUM VULGARE* L.) DURING INFECTION BY THE PATHWAY OF DARK BROWN SPOT

Abstract. The physiological and biochemical responses in spring barley plants to infection with a hemibiotrophic phytopathogenic fungus *B. sorokiniana* was studied. It was found that these responses of the plant organism are regulated by signaling pathways with the participation of the salicylic acid mediator (SA) and are associated with oxidative stress-localized accumulation of reactive oxygen molecules (ROS) in infected cells and/or neighboring cells. The activation of the microsomal fraction of NADPH oxidase isolated from barley leaves on days 1 and 3 after fungal infection was revealed, which is known to be responsible for the rapid formation of ROS in plant cells under the influence of fungal infection. At the same time, an increase in the activity of the peroxidase enzyme detoxifying ROS, in particular H_2O_2 , was observed in relation to the control (uninfected plants) by 1.6 and 2.2 times on the 1st and 3rd day after exposure, respectively. The inclusion of antioxidant defense mechanisms led to the stabilization of lipid peroxidation processes several days after infection. A reliable increase in the total content of water-soluble phenolic substances in the infected plant tissues was shown to have a protective effect on plants under stress, as well as an increase in the free pool of endogenous SA by 9 and 30 % during the first 24 hours and the next 3 days after infection, respectively.

The data obtained indicate that endogenous SA is involved in the responses to infection of *B. sorokiniana* barley seedlings and is a necessary factor for the activation of SAR (systemic acquired resistance), which manifests itself in the accumulation of free SA and a decrease in its conjugated form in response to infection.

Keywords: salicylic acid, systemic acquired resistance, lipid peroxidation, reactive oxygen species, peroxidase, NADPH-oxidase, phenolic substances, spring barley *Hordeum vulgare*, *Bipolaris sorokiniana*

For citation: Pashkevich L. V. Mechanisms formation of systemic acquired resistance in spring barley plants (*Hordeum vulgare* L.) during infection by the pathway of dark brown spot. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 263–274 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-263-274>

Введение. В процессе своей жизнедеятельности растения постоянно получают биотические и абиотические сигналы из окружающей среды, поэтому вынуждены различать безвредные сигналы и потенциально опасные. Как следствие, у растений развились различные адаптивные иммунные механизмы, которые обеспечивают им естественную защиту против патогенных факторов [1].

С помощью специальных рецепторов (pattern-recognition receptor, PRR), расположенных на поверхности растительной клетки, происходит распознавание патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs), что приводит к активации паттерн-активированного иммунитета (pattern-triggered immunity, PTI) [2]. PAMP представляют собой широко консервативные микробные молекулы, такие как липополисахариды, пептидогликаны, бактериальный флагеллин или грибковый хитин. Во многих случаях PTI предотвращает дальнейшую колонизацию растений патогеном. Тем не менее некоторые патогены в процессе эволюции выработали эффекторный белки, нацеленные на компоненты сигнальных путей (фитогормоны) в растении-хозяине [3]. Патогенные «имитаторы фитогормонов», структурно и/или функционально напоминающие фитогормоны или сигнальные компоненты фитогормонов, вызывают подавление PTI. С такими патогенами растения борются с помощью эффекторного иммунитета (effector-triggered immunity, ETI), который опосредуется белками внутриклеточной резистентности (R-белками), распознающими молекулы T3SEs, так называемые эффекторы, вводимые патогенами в клетки растений [4]. Гены распознавания патогенных микроорганизмов (PPRs), по-видимому, не способны различать патогены по их типу питания, чтобы модулировать специфический ответ. Они участвуют в восприятии инвазии патогена и запуске неспецифических реакций иммунной системы [5, 6]. И PTI, и ETI связаны с активацией защитных процессов в инокулированной ткани, в том числе генерацией АФК, увеличением внутриклеточного потока Ca^{2+} , активацией митоген-активированных протеинкиназ (MAPKs), повышенной экспрессией различных защитных генов, синтезом антимикробных соединений и накоплением салициловой кислоты (СК) [2, 7].

Таким образом, активация путей защитной сигнализации (PTI или ETI) приводит к генерации мобильного сигнала, который перемещается из локальной инфицированной ткани в дистальную ткань, вызывая формирование системной приобретенной устойчивости (SAR), являющейся формой долговременного иммунитета к широкому спектру возбудителей [8]. СК при этом выступает важным медиатором иммунного ответа как PTI, так и ETI [9] и необходимым элементом активации SAR [10].

SAR опосредует генерацию в первичном очаге инфекции ряда мобильных сигналов, которые распространяются в более отдаленные ткани главным образом через флоэму, благодаря чему растения становятся устойчивее к последующему заражению [11]. Реализация такого вида устойчивости в растении происходит, как отмечалось ранее, через сигнальные системы с участием СК [12]. Этот тип устойчивости является неспецифическим; он эффективен по отношению к различным стрессорам и повторному заражению растений, прежде всего к биотическим и абиотическим факторам, которые индуцируют некрозы клеток и тканей растений [13]. Молекулярно SAR характеризуется повышением экспрессии большого числа патоген-зависимых генов (PR-генов) как в местных, так и в системных тканях [14]. В последние годы выявлена ключевая роль ко-активатора транскрипционных факторов NPR1 (non-expresser of pathogenesis-related proteins 1) в передаче сигналов от СК в ядро [10]. Скрининг мутантов показал, что NPR1 является основным регулятором СК-опосредованных ответов при реализации SAR [15]. В норме его экспрессия в растении небольшая, но под влиянием стресс-фактора и при обработке СК возрастает в несколько раз [16].

В ответ на увеличение внутриклеточного содержания СК регуляторный белок распадается на мономеры за счет уменьшения межмолекулярных мостиков, перемещается в ядро и взаимодействует с факторами транскрипции TGA, индуцируя экспрессию PR-генов [17]. Активация экспрессии гена *PR-1* вызывается факторами TGA 2, TGA 5 и TGA 6 [18]. Возможно, регуляция ядерной локализации NPR1 и активация TGA-факторов контролируется изменением окислительно-восстановительного потенциала клетки после ее обработки СК. Недавние исследования показали, что СК напрямую связывается с адапторными белками NPR1, NPR3 и NPR4, регулирует их взаимодействие с NPR1, а также контролирует стабильность белка NPR1 [19].

Запуск SAR может быть индуцирован вирулентными, авирулентными и непатогенными микроорганизмами, а также иммуномодуляторами, которые представляют собой доступные для растений продукты промежуточных реакций иммунного ответа. Такими веществами могут выступать экзогенная СК, метилсалицилат, 2,6-дихлор-изоникотиновая кислота (INA), бензо(1,2,3)тиадизол-7-карботионовой кислоты S-этиловый эфир (BTH), системин и др. [20, 21]. В зависимости от вида растения и элиситора для создания SAR необходимо определенное время для накопления в растении СК и патогензависимых белков [22].

Широко распространенный во всем мире гембиотрофный гриб *Bipolaris sorokiniana* (= *Drechslera sorokiniana*, *Helminthosporium sativum*) вызывает темно-бурую пятнистость листьев (гельминтоспориоз) зерновых культур, а также белоколосость, корневую гниль и черный зародыш семян [23]. Гельминтоспориоз – одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний ячменя, поражающих растения в период от всходов до созревания [24]. Вредоносный потенциал гриба снижает урожайность зерновых культур (потери урожая зерна составляют от 38 до 87 %) [25]. Ситуация осложняется отсутствием устойчивых к данному заболеванию форм пшеницы и ячменя [26]. Исключение составляют самоклональные линии этих культур, которые способны в условиях относительно жесткого инфекционного фона сохранять урожайность.

В мировом масштабе потери урожая пшеницы и ячменя, вызванного *B. sorokiniana*, указывают на необходимость поиска альтернативных стратегий для борьбы с этим патогеном, которые обеспечивали бы запуск естественных защитных систем.

Цель работы – исследование механизмов SAR и веществ, индуцирующих в растениях высокоэффективный иммунный ответ.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили проростки ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Магутны, выращенные при 16-часовом фотопериоде на полихроматическом белом свете ($120 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) при температуре 22/16 °C (день/ночь) на специальных сетках на слое фильтровальной бумаги, увлажненной водой. Листья 4-дневных растений равномерно опрыскивали из пульверизатора водным раствором, содержащим СК (10^{-4} М), из расчета 5 мл раствора на сетку. Инокуляцию зеленых проростков ячменя патогеном *Bipolaris sorokiniana* осуществляли путем опрыскивания 5-дневных листьев споровой взвесью, содержащей 10^6 спор/мл. Гриб *Bipolaris sorokiniana* предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение 2 недель. Анализ исследуемых проростков проводили через сутки и на 3-и сутки после воздействия неблагоприятных факторов. В качестве контрольного варианта использовали незараженные растения, выращенные в идентичных условиях.

Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) тестировали по количеству малонового диальдегида (МДА) [27]. Растительный материал гомогенизировали в 5 мМ фосфатном буфере (рН 7,2). К гомогенату добавляли равный объем 0,5 %-ной тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 20 %-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Полученные образцы нагревали на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали при 7000 об/мин. Супернатант измеряли фотометрически при $\lambda = 532 \text{ нм}$. Количество МДА рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА с ТБК, который с поправкой на неспецифическое поглощение при $\lambda = 600 \text{ нм}$ ($1,5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) составил $1,55 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [28].

Общий уровень АФК оценивали с помощью флуоресцентного теста, в основе которого лежит образование дихлорфлуоресцеина (ДХФ) из нефлуоресцирующего дихлорфлуоресцеин-диацетата (ДХФДА) в экстрактах листьев. Навески листьев по 0,25 г гомогенизировали в 2 мл 0,2 н HClO_4 . Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g. Для нейтрализации кислотности

к 500 мкл суспензии добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение pH – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 g. Для определения АФК к 950 мкл 0,15 М Трис-НСL буфера (pH 7,5) последовательно добавляли 25 мкл нейтрализованного супернатанта и 25 мкл 0,15 мМ раствора ДХФДА. Контролем служила проба, состоящая из 975 мкл 0,15 М Трис-НСL буфера и 25 мкл 0,15 мМ ДХФДА. Все пробы инкубировали в течение 20 мин в термостате при 37 °С в темноте. Уровень АФК определяли, регистрируя флуоресценцию ДХФ ($\lambda_{\text{возб}} = 496$, $\lambda_{\text{пер}} = 524$) с помощью спектрофлуориметра «Солар СМ 2203» («Солар», Беларусь) [29].

Содержание пероксида водорода в экстрактах листьев определяли с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии H_2O_2 , катализируемая пероксидазой хрена [30]. Навески листьев по 0,3 г растирали в фарфоровой ступке в жидком азоте до порошка. Затем приливали 1 мл 0,2 н HClO_4 и растирали до гомогената. Последний переносили в центрифужные пробирки, смывая ступку еще 1 мл 0,2 н HClO_4 . Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 g на центрифуге К-24. Для нейтрализации кислотного значения pH к 500 мкл супернатанта добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение pH – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 g на центрифуге для эпиндорфов Beckman culter Microfuge 16. Для определения количества пероксида водорода к 930 мкл 0,1 М Трис-НСL буфера (pH 7,0) последовательно добавляли 10 мкл раствора пероксидазы хрена (200 ед/мл) и 10 мкл 0,1 мМ раствора скополетина. Реакцию запускали путем добавления 50 мкл супернатанта. Контролем служила проба, состоящая из 950 мкл 0,1 М Трис-НСL буфера и 50 мкл супернатанта. Вторым контролем служила проба, состоящая из 980 мкл 0,1 М Трис-НСL буфера, 10 мкл раствора пероксидазы хрена (2500 ед/мл) и 10 мкл 0,1 мМ раствора скополетина. Содержание H_2O_2 определяли, регистрируя флуоресценцию скополетина ($\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм, $\lambda_{\text{пер}} = 464$ нм) на спектрофлуориметре «Солар СМ 2206» (Беларусь). Содержание пероксида водорода рассчитывали в относительных единицах по снижению интенсивности флуоресценции скополетина.

Функциональную активность пероксидазы измеряли спектрофотометрически [31], используя в качестве субстрата бензидин, в результате окисления которого пероксидазой в присутствии пероксида водорода образуется соединение синего цвета. Метод основан на измерении времени, за которое исследуемый раствор достигает определенной оптической плотности. Навеску листьев (50 мг) растирали в 10 мл 0,2 М ацетатного буфера (pH 5,4) и центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин. Далее к 5 мл гомогената добавляли 5 мл ацетатного буфера и 5 мл бензидина. Реакцию окисления субстрата инициировали путем добавления 50 мкл 1 %-ного пероксида водорода. Измерение кинетики реакции окисления проводили с ежесекундным шагом в течение 300 с на спектрофотометре при $\lambda = 605$ нм.

Активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН в микросомальной и цитозольной фракциях, полученных в результате дифференциального ультрацентрифугирования [32]. Для этого зеленые листья (4–5 г) гомогенизировали в предварительно охлажденной во льду ступке с 50 мМ HEPES-КОН буфером (pH 7,8), содержащим 250 мМ сахарозы и 1 мМ ЭДТА. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань для удаления нерастертых фрагментов и центрифугировали при 600 g 15 мин для осаждения тяжелых органелл и компонентов клетки. Надосадочную жидкость центрифугировали при 42 000 g в течение 20 мин для осаждения митохондрий. Полученный супернатант центрифугировали в течение 1 ч при 140 000 g для разделения на цитозольную (супернатант) и микросомальную (осадок) фракции. Осадок ресуспендировали в буфере, используемом для гомогенизации листьев. В полученных фракциях (цитозольной и микросомальной) определяли активность НАДФН-оксидазы по методу, предложенному в работе [33]. Для этого к реакционной среде, состоящей из 0,8 мл буфера (50 мМ HEPES-КОН, pH 7,8), 0,1 мМ ЭДТА и 1 мкМ KCN, добавляли 0,2 мл растительной пробы и предынкубировали 1 мин при 30 °С. Реакцию инициировали путем добавления 100 мкМ НАДФН, скорость окисления которого регистрировали на спектрофотометре, определяя степень его уменьшения в адсорбции при 340 нм (A340) в течение 5 мин. Для расчетов использовали коэффициент экстинции $6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Для нормирования данных по содержанию белка в анализируемом материале измеряли его содержание по методу Лоури [34], используя коммерческий реактив Фолина.

Содержание общего пула водорастворимых фенольных соединений оценивали с помощью реактива Фолина–Чокальтеу [35]. Для этого 0,5 г свежих листьев ячменя измельчали и растирали в фарфоровой ступке в 5 мл горячей воды ($\approx 90^\circ\text{C}$). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 7000 об/мин, используя центрифугу ОПН-8. Полученный супернатант переносили в стеклянные пробирки, осадок ресуспендировали в 5 мл горячей воды и центрифугировали в течение 10 мин при 7000 об/мин. Супернатанты объединяли. Данную процедуру повторяли еще раз. Объединенный супернатант доводили водой до 15 мл. Далее в отдельную пробирку последовательно приливали 250 мкл супернатанта, 1500 мкл дистиллированной воды, 125 мкл реактива Фолина и инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре. Затем приливали 250 мкл насыщенного раствора Na_2CO_3 и 375 мкл дистиллированной воды, выдерживали полученный раствор в течение 1 ч при комнатной температуре и определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре «Солар РВ 2201» («Солар», Беларусь) при 750 нм. Содержание фенольных соединений рассчитывали в относительных единицах.

Содержание СК определяли методом ВЭЖХ [36]. Для этого навеску (0,8 г) сухих листьев ячменя растирали в ступке в порошок и добавляли небольшое количество кварцевого песка. Фенольные компоненты экстрагировали 50 %-ным этанолом, содержащим 0,05 М H_3PO_4 . Полученный гомогенат переносили в пробирки и помещали на 45 мин в ультразвуковую баню при комнатной температуре. Экстракты дважды осветляли посредством центрифугирования при 13 000 об/мин в течение 15 мин. Объемы осветленных экстрактов объединяли с супернатантом, полученным после ресуспендирования осадка в 2 мл среды и последующего центрифугирования при 13 000 об/мин в течение 15 мин. Полученный объединенный экстракт использовали для определения содержания СК. Объединенный экстракт упаривали до 1 мл, затем центрифугировали и делили на две части. Для определения содержания свободной СК к одной части приливали эквивалентное количество 10 %-ной ТХУ. Для определения связанной СК к другой части добавляли эквивалентное количество 8 н HCl и инкубировали 1 ч при 80°C для прохождения химического гидролиза конъюгатов СК. По окончании инкубации пробы охлаждали и центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин, затем супернатанты переносили в чистые пробирки и переводили в органическую фазу, дважды разделяя в 3 мл смеси этилацетата с циклогексаном (1:1). Верхний органический слой, содержащий фенольные соединения, переносили в свежие пробирки и упаривали. Концентрат ресуспендировали в 0,5 мл подвижной фазы, центрифугировали и отбирали по 300 мкл для разделения на ВЭЖХ. Для изократного разделения СК использовали содержащую 25 % ацетонитрила и 75 % ацетатного буфера (рН 5,5) подвижную фазу со скоростью потока 0,5 мл/мин, для регистрации выхода СК – флуоресцентный детектор ($\lambda_{\text{возб}}$ – 300 нм, $\lambda_{\text{рег}}$ – 415 нм). Содержание СК рассчитывали по площади регистрируемых пиков.

Результаты и их обсуждение. Одним из первых цитологически выявляемых симптомов взаимодействия растительного организма с патогеном выступает накопление АФК, особенно H_2O_2 , в месте заражения патогеном, что может служить маркером ранней диагностики степени грибного поражения растений [37]. Связь между клетками в передаче сигналов с помощью АФК на большие расстояния играет ключевую роль в реакции растений на вредителей, механическое поражение и экстремальные условия окружающей среды. В работе [38] сообщается о быстром системном сигнале у *Arabidopsis thaliana*, который распространялся со скоростью 8,4 см/мин и зависел от гена *RbohD* – гомолога оксидазы респираторного взрыва. Распространение сигнала, сопровождавшееся накоплением АФК во внеклеточных пространствах, и его постепенное затухание в местах, удаленных от места инициации, подтверждает важную роль АФК в передаче быстрых, дальних и межклеточных сигналов в растениях.

Согласно полученным нами экспериментальным данным, через 24 ч после инфицирования грибом *B. sorokiniana* зеленых проростков ячменя уровень АФК в зараженных листьях превышал контроль более чем в 3 раза (рис. 1). Тенденция к увеличению количества АФК в клетках растений в ответ на действие грибного заражения сохранялась и на протяжении последующих двух суток, что свидетельствует о протекании в растении защитно-адаптационных реакций в ответ на проникновение гифов гриба в эпидермальные клетки.

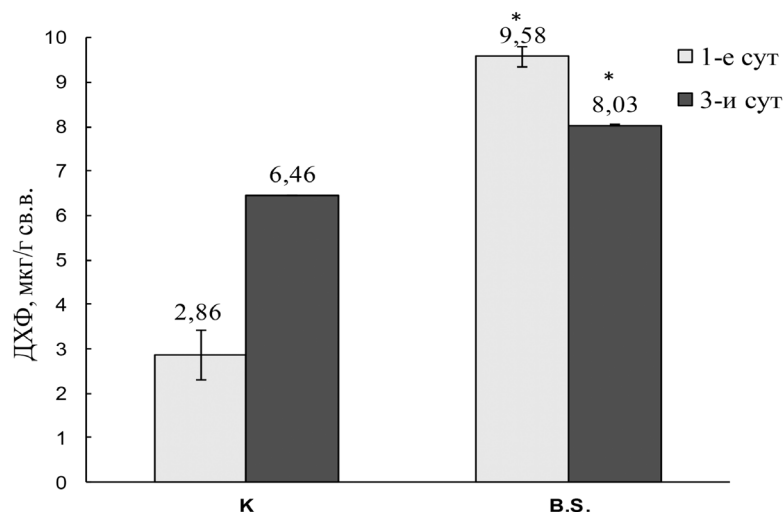


Рис. 1. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на содержание АФК в листьях 6- и 8-дневных зеленых проростков ячменя. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$

Fig. 1. Influence of the pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* on the ROS content in the 6- and 8-day-old leaves of green barley seedlings. * – differences in comparison with the control are significant at $p < 0.05$

Известно, что наиболее стабильным из продуктов восстановления кислорода является пероксид водорода. Время жизни этой АФК составляет 1 мс, поэтому она способна диффундировать на значительные расстояния от места образования и тем самым выполнять сигнальную функцию, запуская в растениях другие адаптационные механизмы [37]. Определение содержания пероксида водорода в экстрактах листьев через 24 ч после инокуляции патогеном показало достоверное увеличение (на 50 %) содержания данной АФК по сравнению с таковым в контрольном варианте (рис. 2).

В результате 3-дневной колонизации растительной ткани грибом *B. sorokiniana* в листьях ячменя отмечалось статистически достоверное повышение содержания пероксида водорода на 15,6 % по сравнению с аналогичным показателем у контрольных растений (уровень исследуемой АФК у них также увеличился в ходе онтогенеза).

Для выяснения природы окислительного стресса, развивающегося при грибном заражении, была изучена активность НАДФН-оксидазы, поскольку считается, что за быстрое образование

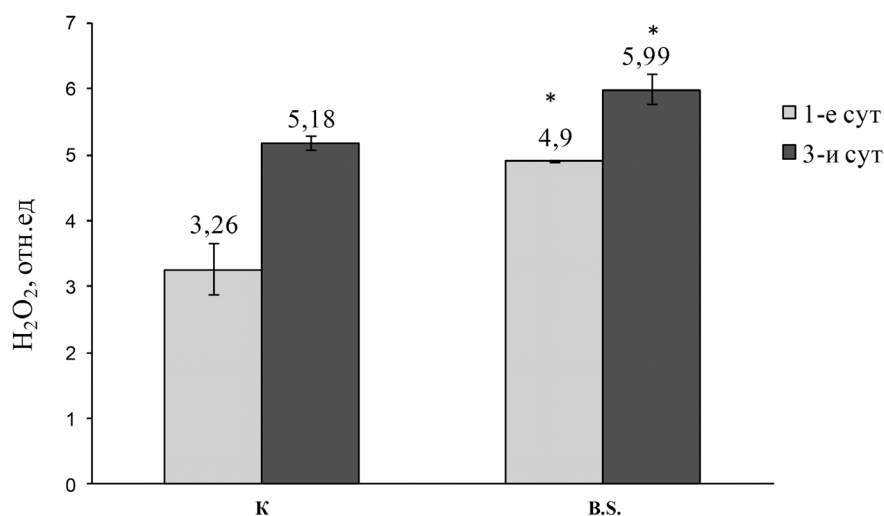


Рис. 2. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на содержание H₂O₂ в листьях 6- и 8-дневных зеленых проростков ячменя. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$

Fig. 2. Influence of the pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* on the H₂O₂ content in the leaves of 6- and 8-day-old green barley seedlings. * – differences in comparison with the control are significant at $p < 0.05$

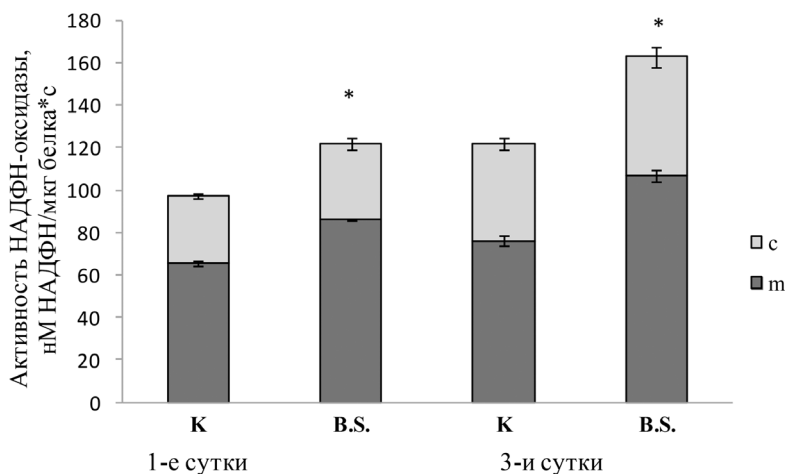


Рис. 3. Активность НАДФН-оксидазы в зеленых проростках ячменя в течение 3 сут после заражения грибом *B. sorokiniana*. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$

Fig. 3. The activity of NADPH-oxidase in green barley seedlings for 3 days after infection with *B. sorokiniana* (B.S). * – differences in comparison with the control are significant at $p < 0.05$

АФК в клетках растений ответственен именно этот фермент. Предполагается, что супероксид анион-радикал, производимый НАДФН-оксидазой, превращается с участием супероксиддисмутазы в H_2O_2 , наиболее стабильную форму АФК, способную пересекать цитоплазматическую мембрану через аквапорины и опосредующую быстрый системный сигнал [38]. Волна АФК распространяется относительно быстро (около 8 см/мин). Она передает сигнал тревоги от пораженных частей растения к незатронутой части, которая не получила первичный стимул, и, таким образом, играет важную роль в процессах защиты.

В наших экспериментах активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН в микросомальной и цитозольной фракциях, полученных путем дифференциального ультрацентрифугирования. В результате исследований установлено возрастание на 1-е и 3-и сутки после начала воздействия грибного патогена активности данного фермента в инфицированных грибом проростках ячменя на 25 и 33,5 % соответственно (рис. 3). При этом в обоих исследуемых вариантах ферментативная активность в микросомальной фракции была выше, чем в цитозольной, что подтверждает данные о мембранной локализации НАДФН-оксидазного ферментного комплекса.

Увеличение активности НАДФН-оксидазы в результате инокуляции и дальнейшей колонизации грибного патогена, таким образом, опосредует развитие и формирование локального окислительного всплеска, приводящего в дальнейшем к формированию системных сигналов, включающих последующие механизмы защиты растений в ответ на действие стресс-фактора.

Стресс-индуцированное возрастание содержания АФК, а также их токсичных продуктов в результате активации работы окислительных ферментов может негативно отразиться на жизнеспособности растительных клеток, что требует контроля их уровня. Важную роль в защите клеток и тканей от окислительных повреждений и поддержании нормального редокс-баланса играют системы естественной детоксикации, в том числе специализированные ферментные антиоксиданты. Одним из таких ферментов, которые важны для защиты растения от вредного воздействия АФК, является пероксидаза, катализирующая реакции окисления органического и неорганического субстратов с использованием в качестве окислителя пероксида водорода [37]. Кроме того, она принимает участие в лигнификации и связывании белков клеточных стенок, в метаболизме фенолов (превращает их в токсичные для фитопатогенов хиноны), в генерации АФК и способствует синтезу фитоалексинов и других защитных соединений [3]. Пероксидаза – это фермент, осуществляющий две независимые функции – оксидазную и пероксидазную и способный катализировать разнообразные реакции в зависимости от использования конкретного субстрата. Антиоксидантная активность пероксидазы проявляется во внутриклеточном пространстве в реакции с бензидином, в апопласте – с аскорбатом, прооксидантная – во внеклеточном

пространстве с НАД(Ф)Н и ИУК [39]. Таким образом, активация бензидин-пероксидазы может указывать на накопление в растительных образцах пероксида водорода при действии разных стресс-факторов и запуске механизмов его детоксикации. Согласно полученным данным (табл. 1), в результате инокуляции 5-дневных проростков спорами гриба *B. sorokiniana* на 1-е и 3-и сутки после воздействия наблюдалось увеличение активности пероксидазы по отношению к контролю (незараженные растения) в 1,6 и 2,2 раза соответственно.

Т а б л и ц а 1. Активность пероксидазы в зеленых проростках ячменя разного возраста в условиях заражения грибом *B. sorokiniana*

Table 1. Peroxidase activity in green barley seedlings of different ages under conditions of infection with *B. sorokiniana*

Вариант	Активность пероксидазы, нМ бензидина/мг белка·с (% к контролю)	
	6-дневные проростки	8-дневные проростки
Контроль	23,2 ± 2,2 (100)	34,5 ± 4,8 (100)
<i>B. sorokiniana</i>	38,6 ± 1,9* (166,4)	76,1 ± 1,2* (220,6)

* Различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$. То же в табл. 2, 3.

Таким образом, можно предположить, что пероксидаза участвует в формировании ответной реакции растений на инфицирование грибным патогеном, а ее активность положительно коррелирует с высокой адаптационной возможностью растительного организма и может служить маркером индукции неспецифической устойчивости у растений.

Данные о развитии цепи ответных защитных реакций растений при инфицировании их грибом, связанные как с активацией АФК, так и с последующей детоксикацией, согласуются с полученными результатами о накоплении в клетке продуктов ПОЛ вследствие изменения состояния мембран и переокисления липидов в ответ на действие стресс-факторов, что свидетельствует о стабилизации окислительных процессов (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Содержание продуктов ПОЛ в зеленых проростках ячменя разного возраста в условиях заражения патогенным грибом *B. sorokiniana*

Table 2. The content of lipid peroxidation products in green barley seedlings of different ages under conditions infection with pathogenic fungus *B. sorokiniana*

Вариант	Содержание МДА, мМ/мг сырой массы (% к контролю)	
	6-дневные проростки	8-дневные проростки
Контроль	4,73 ± 0,06 (100)	6,11 ± 0,12 (100)
<i>B. sorokiniana</i>	4,40 ± 0,13 (93,02)	4,77 ± 0,08* (76,44)

Известно, что в клетке при нормальных условиях ее жизнедеятельности постоянно происходят процессы ПОЛ, способные приводить к разнообразным структурно-функциональным нарушениям в ней, однако благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты данные процессы удерживаются на определенном уровне. Казалось бы, что такой достаточно агрессивный и продолжительный по времени стресс-фактор, как грибное инфицирование, должен приводить к повреждению биомембран, однако в наших экспериментах наблюдалась стабилизация процессов ПОЛ в течение первых 3 сут после инфицирования, что можно объяснить как включением механизмов антиоксидантной защиты, в частности возрастанием активности фермента пероксидазы, так и особенностями жизнедеятельности гемибиотрофного гриба, продуцирующего в растительной клетке в биотрофной фазе своего развития вещества цитокининовой природы [40], которые участвуют в стабилизации биомембран через стимуляцию синтеза белков.

Таким образом, активация путей защитной сигнализации приводит к генерации мобильного сигнала, который перемещается из локальной инфицированной ткани в дистальную ткань, вызывая формирование SAR, важным медиатором и индуктором которой является СК [8]. Исследования, проведенные на различных видах растений, подтвердили тот факт, что патогенная инфекция

приводит к накоплению СК не только в зараженных, но и в неинфицированных листьях, которые становятся устойчивыми к действию патогена [12, 20]. При этом накопление СК часто идет параллельно или предшествует увеличению экспрессии *PR*-генов и вызывает развитие SAR [7]. Кроме того, результаты исследования с использованием СК-дефицитного или дикого типа табака показали, что для развития SAR в неинфицированных листьях необходимо накопление СК. Это дает основания предполагать, что именно СК является мобильным SAR-индуцирующим сигналом, который передается от инокулированных к системным листьям [13].

По результатам наших исследований, в инфицированных тканях растений в течение первых 24 ч и последующих 3 сут после инфицирования достоверно возрастают общее содержание водорастворимых фенольных веществ, оказывающих защитное действие на растения в условиях стресса, а также свободный пул эндогенной СК – на 9 и 30 % соответственно (табл. 3). Уровень связанной СК заметно снижался через сутки после инокуляции и оставался ниже, чем в контрольных листьях, спустя 3 сут. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении эндогенной СК в ответные реакции на заражение проростков ячменя *B. sorokiniana*, что проявляется в накоплении свободной СК и уменьшении содержания ее конъюгированной формы.

Таблица 3. Изменение содержания связанной и свободной эндогенной СК (мкг/г сухой массы) в листьях зеленых проростков ячменя после инокуляции спорами гриба *B. sorokiniana*

Table 3. Content change of bound and free endogenous SA ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in the seedlings of barley green leaves after inoculation with spores of the fungus *B. sorokiniana*

Вариант	1-е сутки после инокуляции <i>B. s.</i>		3-и сутки после инокуляции <i>B. s.</i>	
	Свободная СК	Связанная СК	Свободная СК	Связанная СК
Контроль	1,56 ± 0,09	3,67 ± 0,11	1,43 ± 0,15	3,69 ± 0,10
<i>B. sorokiniana</i>	1,70 ± 0,27	2,99 ± 0,08*	2,26 ± 0,21*	3,01 ± 0,19*

Как известно, увеличение содержания СК в тканях растений может быть связано не только с активацией ее синтеза, но и с гидролизом *o*- β -D-глюкозилсалицилата, локализованного в клеточной стенке растений [12]. И хотя в наших экспериментах явное увеличение свободной СК регистрировали на 3-и сутки, в ранних ответных реакциях на действие *B. sorokiniana* определенно была задействована СК, высвобожденная из конъюгированных форм.

Заключение. Установлено, что инфицирование проростков ячменя спорами гриба *B. sorokiniana*, вызывающего темно-бурую пятнистость, приводит к различным биохимическим ответам, которые отражают присущие растению стратегии борьбы с гембиотрофным патогеном. Данные ответы растительного организма регулируются сигнальными путями, связанными с окислительным ответом – локализованным накоплением АФК в подвергшихся инфицированию и/или соседних клетках. Межклеточная продукция АФК в сочетании с работой фермента НАДФН-оксидазы индуцирует «окислительный взрыв», который активирует защитные механизмы в соседних клетках и неинфицированной части растений, вызывая формирование SAR. Таким образом, активация путей защитной сигнализации в растительной клетке приводит к генерации мобильного сигнала, который перемещается из локальной инфицированной ткани в дистальную, вызывая формирование системной приобретенной устойчивости – долговременного иммунитета к широкому спектру возбудителей. Возрастание уровня СК в клетке в ответ на действие грибного патогена подтверждает ее важную роль в формировании защитных реакций растительной клетки при патогенезе.

Список использованных источников

1. Spoel, S. H. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells / S. H. Spoel, X. Dong // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12, N 2. – P. 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
2. Plant innate immunity – sunny side up? / S. Stael [et al.] // Trends Plant Sci. – 2015. – Vol. 20, N 1. – P. 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>
3. Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques / D. Balmer [et al.] // Front. Plant Sci. – 2013. – Vol. 4. – Art. 82. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00082>

4. Jones, J. D. G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // *Nature*. – 2006. – Vol. 444, N 7117. – P. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
5. Kumar, H. Pathogen recognition by the innate immune system / H. Kumar, T. Kawai, S. Akira // *Int. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 30, N 1. – P. 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
6. Plant disease resistance genes: current status and future directions / M. A. Gururani [et al.] // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2012. – Vol. 78. – P. 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2012.01.002>
7. Seyfferth, C. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming / C. Seyfferth, K. Tsuda // *Front. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 697. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00697>
8. Asai, S. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors / S. Asai, K. Shirasu // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2015. – Vol. 28. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.008>
9. Network properties of robust immunity in plants / K. Tsuda [et al.] // *PLoS Genet.* – 2009. – Vol. 5, N 12. – P. e1000772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>
10. Durrant, W. E. Systemic acquired resistance / W. E. Durrant, X. Dong // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2004. – Vol. 42, N 1. – P. 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
11. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance / J. Shah [et al.] // *Plant J.* – 2014. – Vol. 79, N 4. – P. 645–658. <https://doi.org/10.1111/tpj.12464>
12. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present and future / D. F. Klessig [et al.] // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2018. – Vol. 31, N 9. – P. 871–888. <https://doi.org/10.1094/mpmi-03-18-0067-cr>
13. Systemic immunity in plants: biochemical signals and the challenge for practical application / A. L. Ádám [et al.] // *EC Agriculture*. – 2019. – Vol. 5, N 2. – P. 57–60.
14. Shah, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance / J. Shah, J. Zeier // *Front Plant Sci.* – 2013. – Vol. 4. – Art. 30. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>
15. Characterization of LhSorTGA2, a novel TGA2-like protein that interacts with LhSorNPR1 in oriental hybrid lily Sorbonne / L. Wang [et al.] // *Bot. Stud.* – 2017. – Vol. 58. – Art. 46. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0201-y>
16. Vallad, G. E. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture / G. E. Vallad, R. M. Goodman // *Crop Sci.* – 2004. – Vol. 44, N 6. – P. 1920–1934. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
17. Шамрай, С. Н. Гены устойчивости растений: молекулярная и генетическая организация, функция и эволюция / С. Н. Шамрай // *Журн. общ. биол.* – 2003. – Т. 64, № 3. – С. 195–214.
18. Shaw, M. W. Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) on winter wheat in the UK / M. W. Shaw, D. J. Royle // *Plant Pathol.* – 1993. – Vol. 42, N 6. – P. 882–899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb02674.x>
19. Zheng, Q. F. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense / Q. F. Zheng, D. Xinnian // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2013. – Vol. 64. – P. 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
20. Malamy, J. Salicylic acid and plant disease resistance / J. Malamy, D. F. Klessig // *Plant J.* – 1992. – Vol. 2, N 5. – P. 643–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1992.tb00133.x>
21. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance / S.-W. Park [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 318, N 5847. – P. 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>
22. Ward, E. R. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance / E. R. Ward // *Plant Cell*. – 1991. – Vol. 3, N 10. – P. 1085–1094. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.10.1085>
23. Bashyal, B. M. Emergence of aggressive population in the *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.) through anastomosis / B. M. Bashyal, R. Chand, R. Aggarwal // *Proceedings of the National Academy of Sciences India. Section B, Biological sciences.* – 2015. – Vol. 85, N 4. – P. 935–941. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0391-y>
24. Morphology, physiology, and virulence of *Bipolaris sorokiniana* isolates / A. Poloni [et al.] // *Curr. Microbiol.* – 2009. – Vol. 59, N 3. – P. 267–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9429-4>
25. Acharya K. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas / K. Acharya, A. K. Dutta, P. Pradhan // *AJCS*. – 2011. – Vol. 5, N 9. – P. 1064–1071.
26. Screening of barley germplasm for leaf blight (*Bipolaris sorokiniana*) resistance / N. Jain [et al.] // *Indian J. Agricult. Res.* – 2014. – Vol. 48, N 1. – P. 67–71. <https://doi.org/10.5958/j.0976-058x.48.1.012>
27. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М. Н. Мерзляк // *Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений.* – 1989. – Т. 6. – С. 111–123.
28. Heath, R. L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation / R. L. Heath, L. Packer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1968. – Vol. 125, N 1. – P. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
29. LeBel, C. P. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress / C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – Vol. 5, N 2. – P. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
30. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dehydroxyphenoxazine derivative / J. G. Mohanty [et al.] // *J. Immunol. Meth.* – 1997. – Vol. 202, N 2. – P. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
31. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по физиологии растений / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина. – М. : Высш. школа, 1975. – 392 с.
32. Shen, W. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars / W. Shen, K. Nada, S. Tachibana // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 124, N 1. – P. 431–440. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.431>

33. Pinton, R. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxider radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants / R. Pinton, I. Cakmak, H. Marschner // *J. Exp. Bot.* – 1994. – Vol. 45, N 1. – P. 45–50. <https://doi.org/10.1093/jxb/45.1.45>
34. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
35. Запрометов, М. Н. Основы биохимии фенольных соединений / М. Н. Запрометов. – М. : Высш. школа, 1974. – 214 с.
36. Евдокимова, О. В. Содержание салициловой кислоты и активных форм кислорода в листьях ячменя (*Hordeum vulgare*) при обработке салицилатами / О. В. Евдокимова, Л. Ф. Кабашникова, Г. Е. Савченко // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2014. – № 3. – С. 57–61.
37. Reactive oxygen species during plant – microbe early interactions / A. K. Nanda [et al.] // *J. Integ. Plant Biol.* – 2010. – Vol. 52, N 2. – С. 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00933.x>
38. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli / G. Miller [et al.] // *Sci. Signal.* – 2009. – Vol. 2, N 84. – P. ra45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000448>
39. Томилини, М. В. Пероксидазная ферментная система проростков пшеницы при развитии окислительного стресса в условиях смены светового режима : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 03.01.04 / М. В. Томилини ; Нижегород. гос. ун-т. – Нижн. Новгород, 2011. – 20 с.
40. Великанов, Л. Л. Почвенные фитопатогенные грибы / Л. Л. Великанов, Е. П. Дурынина. – М. : Изд-во МГУ, 1984. – 107 с.

References

1. Spoel S. H., Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 2012, vol. 12, no. 2, pp. 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
2. Stael S., Kmiciek P., Willems P., van der Kelen K., Coll N. S., Teige M., Van Breusegem F. Plant innate immunity – sunny side up? *Trends in Plant Science*, 2015, vol. 20, no. 1, pp. 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>
3. Balmer D., Flors V., Glauser G., Mauch-Mani B. Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4, art. 82. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00082>
4. Jones J. D. G., Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*, 2006, vol. 444, no. 7117, pp. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
5. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 2011, vol. 30, no. 1, pp. 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
6. Gururani M. A., Venkatesh J., Upadhyaya C. P., Nookaraju A., Pandey S. K., Park S. W. Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2012, vol. 78, pp. 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002>
7. Seyfferth C., Tsuda K. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, 2014, vol. 5, art. 697. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00697>
8. Asai S., Shirasu K. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, vol. 28, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.008>
9. Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J., Katagiri F. Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genetics*, 2009, vol. 5, no. 12, p. e1000772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>
10. Durrant W. E., Dong X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, vol. 42, no. 1, pp. 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
11. Shah J., Chaturvedi R., Chowdhury Z., Venables B., Petros R. A. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant Journal*, 2014, vol. 79, no. 4, pp. 645–658. <https://doi.org/10.1111/tpj.12464>
12. Klessig D. F., Choi H. W., Dempsey D. A. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present and future. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2018, vol. 31, no. 9, pp. 871–888. <https://doi.org/10.1094/mpmi-03-18-0067-cr>
13. Ádám A. L., Nagy Z. Á., Viczián O. Systemic immunity in plants: biochemical signals and the challenge for practical application. *EC Agriculture*, 2019, vol. 5, no. 2, pp. 57–60.
14. Shah J., Zeier J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4, art. 30. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>
15. Wang L., Guo Z., Zhang Y., Wang Y., Wang L., Yang G., Li W., Wang R., Xie Z. Characterization of LhSorTGA2, a novel TGA2-like protein that interacts with LhSorNPR1 in oriental hybrid lily Sorbonne. *Botanical Studies*, 2017, vol. 58, art. 46. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0201-y>
16. Vallad G. E., Goodman R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 2004, vol. 44, no. 6, pp. 1920–1934. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
17. Shamrai S. N. Genes for plant resistance: molecular and genetic organization, function and evolution. *Zhurnal obshchei biologii* [Biology bulletin reviews], 2003, vol. 64, no. 3, pp. 195–214 (in Russian).
18. Shaw M. W., Royle D. J. Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) on winter wheat in the UK. *Plant Pathology*, 1993, vol. 42, no. 6, pp. 882–899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb02674.x>
19. Zheng Q. F., Xinnian D. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, vol. 64, pp. 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>

20. Malamy J., Klessig D. F. Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant Journal*, 1992, vol. 2, no. 5, pp. 643–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1992.tb00133.x>
21. Park S.-W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S. L., Klessig D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 2007, vol. 318, no. 5847, pp. 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>
22. Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P., Metraux J. P., Ryals J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 1991, vol. 3, no. 10, pp. 1085–1094. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.10.1085>
23. Bshyal B. M., Chand R., Aggarwal R. Emergence of aggressive population in the *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.) through anastomosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences India. Section B, Biological sciences*, 2015, vol. 85, no. 4, pp. 935–941. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0391-y>
24. Poloni A., Pessi I. S., Frazzon A. P. G., van der Sand S. T. Morphology, physiology, and virulence of *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Current Microbiology*, 2009, vol. 59, no. 3, pp. 267–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9429-4>
25. Acharya K., Dutta A. K., Pradhan P. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, vol. 5, no. 9, pp. 1064–1071.
26. Jain N., Malik R., Selvakumar R., Kumar R., Pande V., Verma R. P. S. Screening of barley germplasm for leaf blight (*Bipolaris sorokiniana*) resistance. *Indian Journal of Agricultural Research*, 2014, vol. 48, no. 1, pp. 67–71. <https://doi.org/10.5958/j.0976-058x.48.1.012>
27. Merzlyak M. N. Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes. *Itogi nauki i tekhniki. Seriya Fiziologiya rastenii* [Results of science and technology. Plant physiology series], 1989, vol. 6, pp. 111–123 (in Russian).
28. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, vol. 125, no. 1, pp. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
29. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 1992, vol. 5, no. 2, pp. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
30. Mohanty J. G., Jaffe J. S., Schulman E. S., Raible D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dehydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*, 1997, vol. 202, no. 2, pp. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
31. Gavrilenko V. F., Ladygina M. E., Khandobina L. M. *Large workshop on plant physiology*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1975. 392 p. (in Russian).
32. Shen W., Nada K., Tachibana S. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology*, 2000, vol. 124, no. 1, pp. 431–440. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.431>
33. Pinton R., Cakmak I., Marschner H. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxideradical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. *Journal of Experimental Botany*, 1994, vol. 45, no. 1, pp. 45–50. <https://doi.org/10.1093/jxb/45.1.45>
34. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, p. 265.
35. Zaprometov M. N. *Fundamentals of biochemistry of phenolic compounds*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1974. 214 p. (in Russian).
36. Evdokimova O. B., Kabashnikova L. F., Savchenko G. E. The content of salicylic acid and reactive oxygen species in barley leaves (*Hordeum vulgare*) when treated with salicylates. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2014, vol. 3, pp. 57–61 (in Russian).
37. Nanda A. K., Andrio E., Marina D., Pauly N., Dunand C. Reactive oxygen species during plant–microbe early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, vol. 52, no. 2, pp. 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00933.x>
38. Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M. A., Shulaev V., Dangl J. L., Mittler R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2009, vol. 2, no. 84, p. 45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000448>
39. Tomilin M. V. *Peroxidase enzyme system of wheat seedlings during the development of oxidative stress under conditions of changing light conditions*. Abstract of Ph. D. diss. Nizhny Novgorod, 2011. 20 p. (in Russian).
40. Velikanov L. L., Durygina E. P. *Soil phytopathogenic fungi*. Moscow, Moscow State University Publishing House, 1984. 107 p. (in Russian).

Информация об авторе

Пашкевич Любовь Валерьевна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Ljubi.k87@gmail.com

Information about the author

Lyubov V. Pashkevich – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Ljubi.k87@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 575.17+599.723.2+ 502.1

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-275-282>

Поступила в редакцию 27.05.2020

Received 27.05.2020

Е. Э. Хейдорова¹, М. Е. Никифоров¹, К. В. Гомель¹, А. В. Шпак¹,
В. В. Шакун¹, В. Ч. Домбровский¹, М. Г. Шквыря²

¹Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

²Киевский зоологический парк общегосударственного значения, Киев, Украина

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МАРКЕРА D-LOOP ЛОШАДИ ПРЖЕВАЛЬСКОГО *EQUUS CABALLUS PRZEWALSKII* POLJAKOV, 1881 И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО СОХРАНЕНИЮ ВИДА В БЕЛАРУСИ

Аннотация. В статье впервые приводятся данные по гаплотипическому разнообразию популяции лошади Пржевальского в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС (ЧАЭС) и обсуждаются вопросы охранного статуса данного вида на территории Беларуси. Показано, что в настоящее время лошадь Пржевальского постоянно обитает на территории зоны отчуждения ЧАЭС в виде устойчивой популяционной группировки в условиях естественной свободы, для особей которой характерны типичный экстерьер и гаплотипическое своеобразие. Данные генетического анализа, проведенного на основе полиморфизма контрольного региона D-loop митохондриальной ДНК, показывают, что популяция лошадей Пржевальского имеет одинаковый гаплотип с особями украинской части популяции и выраженную генетическую дистанцию от других потомков этого вида из Аскании-Нова. Исходя из очень низкой численности лошади Пржевальского в мире и, соответственно, ее высокого международного природоохранного статуса, а также учитывая ценность и значимость свободно живущей популяции в зоне отчуждения ЧАЭС для естественного выживания вида в целом, вид *Equus caballus przewalskii* рекомендован для занесения в Красную книгу Республики Беларусь.

Ключевые слова: лошадь Пржевальского, зона отчуждения ЧАЭС, Красная книга, гаплотипы, мтДНК, D-loop

Для цитирования: Анализ полиморфизма митохондриального маркера D-loop лошади Пржевальского *Equus caballus przewalskii* Poljakov, 1881 и предложения по сохранению вида в Беларуси / Е. Э. Хейдорова [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 275–282. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-275-282>

Ekaterina E. Kheidorova¹, Mikhail E. Nikiforov¹, Kanstantin V. Homel¹, Aleksey V. Shpak¹,
Vasiliy V. Shakun¹, Valeriy Ch. Dombrovski¹, Marina G. Shkvrya²

¹Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

²Kiev Zoological Park of national importance, Kiev, Ukraine

ANALYSIS OF D-LOOP MITOCHONDRIAL MARKER POLYMORPHISM OF PRZEWALSKY HORSES *EQUUS CABALLUS PRZEWALSKII* POLJAKOV, 1881 AND PROPOSALS FOR THE SPECIES CONSERVATION IN BELARUS

Abstract. The article presents the first data on the haplotype diversity of the Przewalsky horse population in the Chernobyl exclusion zone and discusses the conservation status of this species in Belarus. It is shown that at present the Przewalsky horse constantly lives in the exclusion zone of the Chernobyl nuclear power plant in the form of a stable population group of individuals with a typical exterior and a haplotypic originality in a state of natural freedom. Data from a genetic analysis based on polymorphism of the control region of the D-loop mitochondrial DNA show that the Przewalsky horse population has the same haplotype with individuals of the Ukrainian part of the population and a pronounced genetic distance from other descendants of this species from Askania-Nova. Based on the rarity of the Przewalsky horse in the world and, accordingly, the high international conservation status, and also taking into account the value and significance of a freely living population in the Chernobyl exclusion zone for the natural survival of the species as a whole the species *Equus caballus przewalskii* is recommended for inclusion in the Red Book of the Republic of Belarus.

Keywords: Przewalsky horse, Chernobyl exclusion zone, Red Book, haplotypes, mtDNA, D-loop

For citation: Kheidorova E. E., Nikiforov M. E., Homel K. V., Shpak A. V., Shakun V. V., Dombrovski V. Ch., Shkvrya M. G. Analysis of D-loop mitochondrial marker polymorphism of Przewalsky horses *Equus caballus przewalskii* Poljakov, 1881 and proposals for the species conservation in Belarus. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 275–282 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-275-282>

Введение. Лошадь Пржевальского внесена в международную Красную книгу МСОП (IUCN Status Survey and Conservation Action Plan) со статусом *endangered* (угрожаемый вид). Мировая популяция лошади Пржевальского прошла через «бутылочное горлышко», т. е. радикальное снижение численности, чреватое значительной потерей генетического разнообразия, в середине 1960-х годов [1, 2]. Современная мегапопуляция лошадей Пржевальского ведет происхождение от 13 животных-основателей, 12 из которых относились к виду *Equus przewalskii* и 1 – к *Equus caballus* [3]. Однако в первые годы разведения в неволе число основателей популяции сократилось, поскольку две пары особей оставили только по одному потомку. Таким образом, современные популяции лошадей Пржевальского несут генетический материал 11 особей своего вида. В ходе дальнейшего разведения вида утрата его генофонда продолжалась до 1970-х годов [4], однако после принятия ряда эффективных решений этот негативный процесс удалось остановить. Источником информации по генеалогии лошадей Пржевальского служит Родословная книга лошади Пржевальского [5].

Обзор статуса и план действий по сохранению видов лошадиных, подготовленный МСОП, был опубликован в 2002 г. В нем указано, что необходимы поиск дополнительных мест реинтродукции, подробный мониторинг состояния поголовья, предотвращение гибридизации с домашними лошадьми в созданных природных популяциях, генетический контроль всех особей для минимизации эффектов инбридинга [6].

История появления лошади Пржевальского в Беларуси начинается с 1998 г., когда биосферный заповедник «Аскания-Нова» запустил программу по созданию свободноживущих популяций лошади Пржевальского в Чернобыльской зоне отчуждения на территории Украины [7]. Лошади из этого заповедника успешно адаптировались и с течением времени стали расселяться на соседние территории.

В 2007 и 2010 гг. в Полесский государственный радиационно-экологический заповедник (ПГРЭЗ) с территории Украины самостоятельно перешли две группы лошадей Пржевальского, каждая из которых состояла из жеребца и двух кобыл. Данные группы стали основателями двух территориально разобщенных репродуктивных табунов, обитающих на правом берегу р. Припять (Наровлянская часть заповедника) на площади 2 и 4 тыс. га. С 2009 г. отмечено регулярное размножение вида в заповеднике [8, 9]. В последующие годы произошло дальнейшее расселение и значительное увеличение численности лошади Пржевальского. Территория обитания в настоящее время охватывает Наровлянскую и Хойникскую части заповедника. Численность лошадей в заповеднике осенью 2018 г. составила около 50 особей. Весной 2019 г. она снизилась до 20–30 особей, что было обусловлено, скорее всего, обратной миграцией части табунов на территорию Украины. Такие переходы как в одну, так и в другую сторону наблюдались в заповеднике неоднократно. По информации украинских коллег, на украинской части зоны отчуждения обитает около сотни особей. Таким образом, популяция лошадей Пржевальского, обитающая в зоне отчуждения ЧАЭС на территории Беларуси и Украины, стала самой крупной свободно живущей дикой популяцией лошадей Пржевальского в мире.

В Полесском заповеднике лошади предпочитают территории бывших населенных пунктов как специфических местообитаний, отличающихся относительным богатством и мозаичностью растительного покрова. Стоянки лошадей часто отмечаются в пустующих каменных постройках – коровниках, конюшнях и свиноконплексах, которые используются лошадьми для отдыха, защиты от насекомых и непогоды. Другие биотопы (леса различных типов, поймы рек и пр.), как правило, являются для лошадей транзитными зонами. Противопожарные полосы, расположенные в районе обитания лошадей, интенсивно используются ими как торные тропы при обходе своего участка и для принятия песочных ванн [1, 9–11].

Большинство работ в заповеднике по изучению численности лошадей, их питания, территориального распределения, биотопических предпочтений и особенностей использования антропогенных сооружений базируется пока на небольшом фактическом материале, что связано со спецификой обитания животных на загрязненной радионуклидами территории и их высокой мобильностью.

Несмотря на высокую международную природоохранную значимость, статус лошади Пржевальского в Беларуси до недавнего времени по многим параметрам оставался неопределенным, что делает важным исследования особенностей биологии и экологии популяции этого вида

на украинской и белорусской частях зоны отчуждения ЧАЭС. Изолированное существование данной популяции, а также обитание в свободном состоянии в течение ряда лет и предполагаемая возможность контактов с домашними лошадьми обуславливают необходимость проведения молекулярно-генетического анализа для установления генетического статуса особей.

Целью работы было провести в рамках Государственной программы по ликвидации последствий катастрофы на Чернобыльской АЭС на 2011–2015 гг. и на период до 2020 г. первые генетические исследования популяционного статуса лошадей Пржевальского, обитающих на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника, и дать научное заключение для установления охранного статуса данного вида.

Материалы и методы исследования. ДНК-анализ проводили по стандартным методикам на основе образцов экскрементов и шерсти лошадей Пржевальского, собранных в ПГРЭЗ. Исследованиями была охвачена примерно треть популяции лошадей Пржевальского (13 животных) белорусской зоны отчуждения из шести б. н. п. Наровлянского района: Довляды, Вепры, Белая Сорока, Тихин, Березовка, Дубровы. В анализ также был включен один образец мышечной ткани от лошади Пржевальского Чернобыльского радиационно-экологического биосферного заповедника (ЧРЭБЗ), переданный коллегами из Украины (см. таблицу).

Характеристика проб полевого материала, использованного в изучении генетического статуса лошадей Пржевальского

Characterization of samples of field material used in the study of the genetic status of Przewalsky horses

Образец	Локализация	Дата сбора	Источник ДНК	Примечание
Eq4_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Довляды	23.03.2018	Экскременты	Взрослая самка
PH1_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Довляды		Шерсть	
PH2_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Березовка	12.04.2018	Шерсть	
PH3_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Березовка	12.04.2018	Шерсть	
PH4_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Березовка	12.04.2018	Шерсть	
PH5_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Вепры	11.04.2018	Шерсть	
PH6_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Белая Сорока		Шерсть	
PH7_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Довляды		Шерсть	
PH8_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Белая Сорока		Шерсть	
PH9_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Довляды	15.03.2017	Шерсть	
PH10_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Дубровы		Шерсть	
PH11_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Тихин		Шерсть	Взрослый самец, табунный
PH12_Bel	Беларусь, ПГРЭЗ, б. н. п. Тихин		Шерсть	
PH22_Ukr	Украина, ЧРЭБЗ		Мышцы	

Пробы шерсти замачивали на 5 мин в 2 %-ном растворе додецилсульфата натрия, после чего прополаскивали в деионизированной воде 3 раза и высушивали пассивно. Экстракцию ДНК проводили с использованием коммерческого набора «Арт ДНК Мини Эксперт» производства «АртБиоТех» (Беларусь) по протоколу, рекомендованному производителем, с модификациями: для улучшения лизиса шерсти во все образцы добавляли протеиназу К (1 мг/мл) и DTT (0,1 М). Лизис проводили при 56 °С в течение ночи. Концентрация полученных препаратов ДНК измерялась спектрофотометрически и составляла от 3 до 27 нг/мкл.

Пробы внешнего края фекалий перед выделением ДНК встряхивали на вортексе и заливали 96 %-ным спиртом. Смесь центрифугировали (1700 g, 10 мин), чтобы осадить содержащиеся в ней эпителиальные клетки. Супернатант удаляли, а осадок вновь заливали 96 %-ным спиртом. Процедуру повторяли троекратно. Затем высушивали осадок до полного удаления этанола. Выделение ДНК производили в соответствии с инструкцией производителя (Macherey Nagel) по оптимизированному протоколу для экскрементов, используя набор NucleoSpin® Tissue.

Для подтверждения видовой принадлежности полученных образцов ДНК и анализа гаплотипического полиморфизма лошадей Пржевальского нами выбран достаточно информативный участок митохондриального маркера D-loop. Для наработки целевого фрагмента использованы универсальные

праймеры P-L5 (5'-TCCTACCATCAGCACCCAAAGC-3') и T-H5 (5'-TTGACTGTATGGGGTATGTAC-3'), предложенные G. S. Wilkinson, A. M. Chapman [12].

Аmplификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10×буфер, 3 мМ MgCl₂; 10×dNTPs; по 10 pmol каждого праймера; 500 единиц Taq-полимеразы («Праймтех», Беларусь) и 10–100 нг ДНК. Для наработки достаточного количества участка гена D-loop проводили реамплификацию со следующим составом реакционной смеси: 10×буфер, 3 мМ MgCl₂, 10×dNTPs (по 15 pmol каждого праймера); 2500 единиц Taq-полимеразы («Праймтех», Беларусь); 2 мкл BSA; 1 мкл DMSO и 10–100 нг ПЦР-продукта. Условия проведения ПЦР: предварительная денатурация при 94 °С 4 мин; 30 циклов денатурации (94 °С, 30 с), отжига (58 °С, 45 с) и элонгации (72 °С, 1 мин); окончательная достройка цепей (72 °С, 20 мин).

Для очистки получившихся ПЦР-продуктов использовали протокол коммерческого набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Очищенные ПЦР-продукты секвенировали с использованием GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter, Германия) и системы генетического анализа GenomeLAB GEXP (Beckman Coulter, Германия).

В сравнительный анализ гаплотипического разнообразия лошадей Пржевальского на основе участков контрольного региона D-петли были вовлечены также нуклеотидные последовательности как диких, так и домашних лошадей из GenBank NCBI, в том числе от древних лошадей (HM581895.1 Eq.cab. Eclipse-Tibia United Kingdom hist. bone; KF197204.1 Eq.cab. BOR005 arch. Hungary: Budaors), от племенных лошадей различных пород (AF014413.2 Eq.cab. Mongolian horse, AF354441.1 Eq.cab. Cheju horse, KF038161.1 Eq.cab. Jeju03, JF951840.1 Eq.cab. H07 Hucul horses Czech Republic, KF197588.1 Eq.cab. IR040 Local Kyrgyz) и от лошадей Пржевальского с известными родословными (KT368743.1 Eq.prz. KB7848_SB528_Vjuga, KT368742.1 Eq.prz. KB7713_SB524_Viola, AP013094.1 Eq.prz. NOUMA1).

Результаты и их обсуждение. Все расшифрованные нуклеотидные последовательности участка контрольного региона D-loop мтДНК от лошадей Пржевальского как белорусской, так и украинской части зоны отчуждения ЧАЭС принадлежали к одному гаплотипу.

Дендрограмма генетических различий по участку контрольного региона D-петли мтДНК, построенная по методу максимального правдоподобия по модели Hasegawa–Kishino–Yano с учетом G-дистанций и высокой поддержкой бутстрепа (рис. 1), подтверждает видовую принадлежность исследованных образцов и четко указывает на наличие генетической дистанции между популяциями лошади Пржевальского из зоны отчуждения (белорусские и украинские образцы представлены одним гаплотипом) и предковой линией, ведущей свое происхождение из Аскании-Нова, что может свидетельствовать о наличии дивергенции. Обнаружение гаплотипа, не характерного для других особей из Аскании-Нова, еще больше повышает ценность описываемой свободноживущей группировки для сохранения вида и расселения в другие местообитания. С другой стороны, вопрос формирования гаплотипической уникальности данной группировки вызывает научный интерес и требует более глубоких генетических исследований.

Отсутствие гаплотипического разнообразия по консервативному участку гена *D-loop* популяции лошадей Пржевальского зоны отчуждения и генетическую дистанцию в отношении других потомков диких лошадей из Аскании-Нова, а также домашних лошадей более наглядно отображает парсимониальная сеть. Как видно из рис. 2, гаплотип, выявленный в зоне отчуждения ЧАЭС (SQ1), отстоит на две нуклеотидные замены от гаплотипа, характерного для других потомков лошадей Пржевальского из Аскании-Нова (SQ3), и на дистанцию в диапазоне от 2 до 6 замен от гаплотипов домашних лошадей (SQ4–SQ6), в том числе древних их представителей (SQ9, SQ10).

Принимая во внимание данные экологического и генетического анализа, можно констатировать, что в настоящее время на территории Республики Беларусь лошадь Пржевальского постоянно обитает в виде устойчивой популяционной группировки из генетически ценных особей с типичным экстерьером и гаплотипическим своеобразием в условиях естественной свободы.

В соответствии с принятыми определениями в Законе Республики Беларусь «О животном мире» от 10 июля 2007 г. № 257-З (в ред. Законов Республики Беларусь от 10.11.2008 № 444-З, 02.07.2009 № 32-З, 04.01.2010 № 109-З, 17.05.2011 № 261-З, 22.01.2013 № 18-З) лошадь Пржевальского (в составе всей ее дикой популяции в границах Беларуси) относится к объектам животного

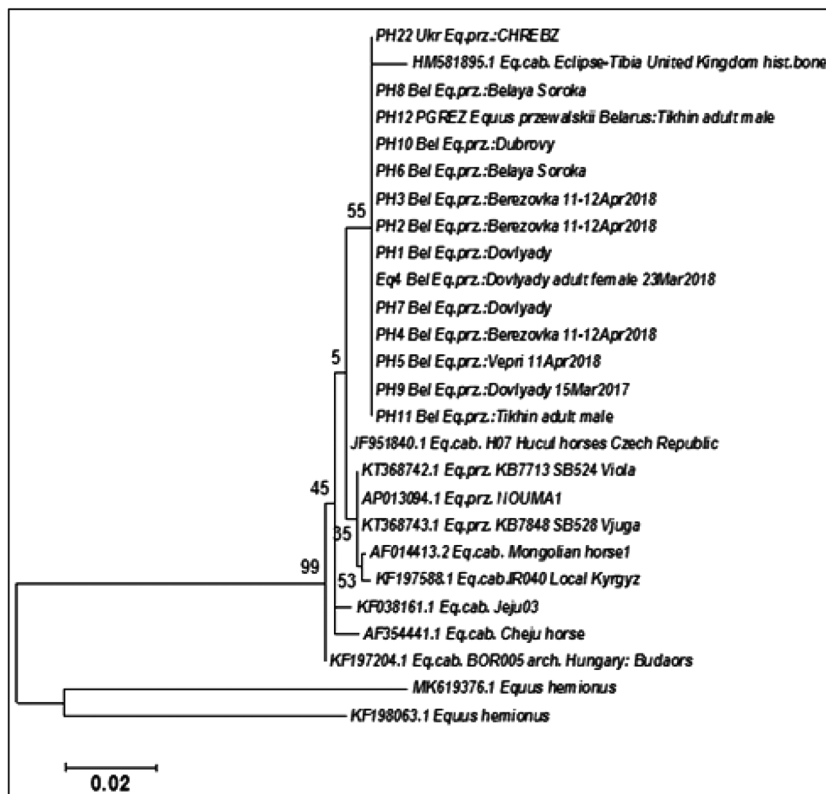


Рис. 1. Дендрограмма генетических различий по участку контрольного региона D-петли мтДНК лошадей Пржевальского и домашних лошадей (ML-метод, модель HKY + G, IB = 500)

Fig. 1. Dendrogram of genetic differences in the control region of the mtDNA D-loop of Przewalsky horses and domestic horses (ML-method, model HKY + G, IB = 500)

мира и подпадает под действие вышеупомянутого Закона, а в соответствии со ст. 6 Закона находится в собственности государства. На этом основании данный вид, включенный в списки позвоночных животных ПГРЭС, может быть включен также во все списки фауны Беларуси. Других специальных действий по легализации ее как вида фауны Беларуси не требуется.

Однако для лошади Пржевальского, как и для любого биологического вида, требуется установление мер государственного регулирования и управления в области охраны и использования. Согласно ст. 2 Закона о животном мире, отношения, связанные с охраной и использованием животного мира на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате катастрофы на ЧАЭС, регулируются законодательством об охране и использовании животного мира,

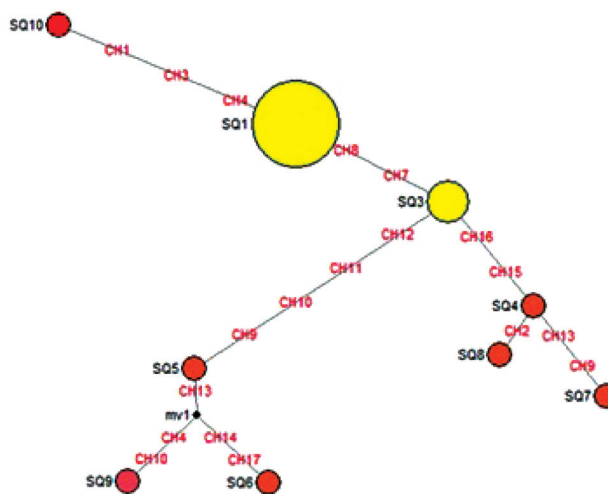


Рис. 2. Парсимониальная сеть гаплотипов диких и домашних лошадей из различных регионов на основании полиморфизма D-лооп мтДНК. Желтые круги – гаплотипы лошадей Пржевальского, оранжевые – гаплотипы домашних лошадей, розовый и красный – гаплотипы исторических лошадей

Fig. 2. Parsimonial network of wild and domestic horse haplotypes from various regions based on D-loop mtDNA polymorphism. The yellow circles are the haplotypes of Przewalsky horses, the orange circles are the haplotypes of domestic horses, the pink and red circles are the haplotypes of historical horses

если иное не установлено соответственно законодательством о Государственной границе Республики Беларусь и законодательством о правовом режиме территорий, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате катастрофы на ЧАЭС.

В соответствии со ст. 8 Закона о животном мире Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь устанавливает в случаях и порядке, установленных Законом и иными законодательными актами, ограничения, запреты или другие меры в отношении охраны, изъятия, содержания и (или) разведения в неволе, экспонирования диких животных, в том числе диких животных, относящихся к видам, включенным в Красную книгу Республики Беларусь, и к видам, подпадающим под действие международных договоров Республики Беларусь. При этом определение размера возмещения вреда, причиненного окружающей среде физическими и юридическими лицами в результате незаконного изъятия или уничтожения диких животных и вредного воздействия на среду их обитания, находится в компетенции Президента Республики Беларусь.

Как было показано выше, современная численность лошади Пржевальского в нашей стране чрезвычайно низка, а ее распространение очень локально и ограничено зоной отчуждения ЧАЭС. Это обуславливает высокую уязвимость вида на данной территории как перед факторами среды, так и перед внутривидовыми угрозами. Поэтому закономерно встает вопрос о придании данному виду природоохранного статуса, что позволит применять к нему более действенные меры по сохранению и содействию популяционному росту. В соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь редкие животные с угрожаемым статусом должны быть занесены в Красную книгу Беларуси.

В соответствии с Законом Республики Беларусь от 26 ноября 1992 г. № 1982-ХІІ «Об охране окружающей среды» включение редких и находящихся под угрозой исчезновения на территории Республики Беларусь видов диких животных и дикорастущих растений в Красную книгу Республики Беларусь и исключение их из нее осуществляются Министерством природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь на основании предложений НАН Беларуси. При включении редких и находящихся под угрозой исчезновения на территории Республики Беларусь видов диких животных и дикорастущих растений в Красную книгу Республики Беларусь им присваиваются категории национальной природоохранной значимости. Для включения в Красную книгу Республики Беларусь лошадь Пржевальского как таксон, имеющий неблагоприятный международный или европейский охранный статус, может быть отнесена ко II категории, а как таксон, имеющий очень низкую численность, сохранение популяции которого невозможно вне режима охраны, – к I категории национальной природоохранной значимости.

Закключение. Таким образом, в настоящее время лошадь Пржевальского постоянно обитает на территории зоны отчуждения ЧАЭС в виде устойчивой популяционной группировки из генетически ценных особей в условиях естественной свободы. Данные проведенного генетического анализа показывают, что популяция лошадей Пржевальского имеет одинаковый гаплотип с особями из украинской части популяции и выраженную генетическую дистанцию по митохондриальному маркеру от других потомков этого вида из Аскании-Нова. Исходя из чрезвычайно низкой численности лошади Пржевальского в мире и, соответственно, ее высокого международного природоохранного статуса, а также учитывая ценность и значимость свободно живущей популяции в зоне отчуждения ЧАЭС для естественного выживания вида в целом, вид *Equus caballus przewalskii* имеет все основания быть занесенным в Красную книгу Республики Беларусь в установленном порядке либо как таксон, имеющий неблагоприятный международный или европейский охранный статус (II категория), либо как таксон, имеющий очень низкую численность, сохранение популяции которого невозможно вне режима охраны (I категория).

Благодарности. Авторы выражают благодарность за сбор и передачу биологического материала от лошади Пржевальского заведующему отделом экологии флоры и фауны Чернобыльского радиационно-экологического биосферного заповедника Денису Вишневному и младшему научному сотруднику отдела паразитологии Института зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины Егору Яковлеву.

Acknowledgements. The authors of the article are grateful for the collection and transfer of biological material from Przewalski's horses to the Head of Department of flora and fauna ecology of Chornobyl Radiation and Ecological Biosphere reserve Denis Vishnevsky, Young researcher of Department of Parasitology of I. I. Schmalhausen Institute of Zoology of the National Academy of Sciences of Ukraine Dr Yegor Yakovlev.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ryder, O. A. A cooperative breeding program for the Mongolian wild horse, *Equus przewalskii*, in the United States / O. A. Ryder, E. A. Wedemeyer // *Biol. Conserv.* – 1982. – Vol. 22, N 4. – P. 259–272. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(82\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(82)90021-0)
2. Животный мир в зоне аварии Чернобыльской АЭС / АН Беларуси, Ин-т зоологии ; под ред. Л. М. Сушени, М. М. Пикулика, А. Е. Пленина. – Минск : Наука і тэхніка, 1995. – 263 с.
3. Geyer, Ch. J. Gene survival in the Asian wild horse (*Equus przewalskii*): I. Dependence of gene survival in the Calgary breeding group pedigree / Ch. J. Geyer, A. Thompson // *Zoo Biol.* – Vol. 7, N 4. – 1988. – P. 313–327. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430070403>
4. Geyer, C. J. Gene survival in the Asian wild horse (*Equus przewalskii*): II. Gene survival in the whole population, in subgroups, and throu history / C. J. Geyer, E. A. Thompson, O. A. Ryder // *Zoo Biol.* – 1989. – Vol. 8, N 4. – P. 313–329. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430080402>
5. Kus, E. General studbook of the Przewalski horse / E. Kus (ed.). – Prague : Zoological garden, 1995. – 231 p.
6. Status and action plan for the Przewalski's Horse (*Equus ferus przewalskii*) / S. Wakefield [et al.] // *Equids: zebras, asses and horses. Status survey and conservation action plan* / ed. P. D. Moehlman. – Gland, 2002. – P. 82–92.
7. Zharkikh, T. L. Przewalski horse in the Zone of Chernobyl nuclear power / T. L. Zharkikh, N. I. Yasynetska, N. S. Zvegintsova // *Gazella.* – 2002. – Vol. 29. – P. 93–111.
8. Schlichting, P. E. Use of abandoned structures by Przewalski's wild horses and other wildlife in the Chernobyl Exclusion Zone / P. E. Schlichting, V. Dombrovski, J. C. Beasley // *Mammal Res.* – 2020. – Vol. 65, N 1. – P. 161–165. <https://doi.org/10.1007/s13364-019-00451-4>
9. Козорез, А. И. Особенности освоения биотопов лошадей Пржевальского в Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике / А. И. Козорез, В. В. Шакун, М. В. Кудин // Проблемы и перспективы развития территорий, пострадавших в результате катастрофы на Чернобыльской АЭС на современном этапе: материалы междунар. науч.-практ. конф. (г. Хойники, 26–27 июля 2018 г.) / ред. М. В. Кудин. – Хойники, 2018. – С. 35–39.
10. Дерябина, Т. Г. Результаты наблюдений за лошадью Пржевальского (*Equus przewalskii*) на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника, 2011–2013 гг. / Т. Г. Дерябина // Современные экологические проблемы устойчивого развития Полесского региона и сопредельных территорий: наука, образование, культура : материалы VI Междунар. науч.-практ. конф. (Мозырь, 23–24 октября 2014 г.) / редкол. : О. П. Позывайло (отв. ред.) [и др.]. – Мозырь, 2014. – С. 75–78.
11. Дерябина, Т. Г. Лошадь Пржевальского (*Equus ferus przewalskii* Polj., 1881) в условиях белорусской зоны отчуждения Чернобыльской АЭС / Т. Г. Дерябина // *Вісті Біосфер. заповід. «Асканія-Нова».* – Т. 17. – 2015. – С. 54–59.
12. Wilkinson, G. S. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA / G. S. Wilkinson, A. M. Chapman // *Genetics.* – 1991. – Vol. 128, N 3. – P. 607–617.

References

1. Ryder O. A., Wedemeyer E. A. A cooperative breeding program for the Mongolian wild horse, *Equus przewalskii*, in the United States. *Biological Conservation*, 1982, vol. 22, no. 4, pp. 259–272. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(82\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(82)90021-0)
2. Sushchenya L. M., Pikulik M. M., Plenina A. E. (ed.). *Fauna in the accident zone of the Chernobyl nuclear power plant*. Minsk, Navuka i tekhnika Publ., 1995. 263 p. (in Russian).
3. Geyer Ch. J., Thompson A. Gene survival in the Asian wild horse (*Equus przewalskii*): I. Dependence of gene survival in the Calgary breeding group pedigree. *Zoo Biology*, 1988, vol. 7, no. 4, pp. 313–327. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430070403>
4. Geyer Ch. J., Thompson A. Gene survival in the Asian wild horse (*Equus przewalskii*): II. Gene survival in the whole population, in subgroups, and throu history. *Zoo Biology*, 1989, vol. 8, no. 4, pp. 313–329. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430080402>
5. Kus E. (ed.). *General studbook of the Przewalski horse*. Prague, Zoological garden Publ., 1995. 231 p.
6. Wakefield S., Knowles J., Zimmermann W., van Dierendonck M. Status and action plan for the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Equids: zebras, asses and horses. Status survey and conservation action plan*. Gland, 2002, pp. 82–92.
7. Zharkikh T. L., Yasynetska N. I., Zvegintsova N. S. Przewalski horse in the Zone of Chernobyl nuclear power. *Gazella*, 2002, vol. 29, pp. 93–111.
8. Schlichting P. E., Dombrovski V., Beasley J. C. Use of abandoned structures by Przewalski's wild horses and other wildlife in the Chernobyl Exclusion Zone. *Mammal Research*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 161–165. <https://doi.org/10.1007/s13364-019-00451-4>
9. Kozorez A. I., Shakun V. V., Kudin M. V. Features of the familiarization of biotopes by Przewalski's horses in the Polesky State Radiation-Ecological Reserve. *Problemy i perspektivy razvitiya territorii, postradavshikh v rezul'tate katastrofy na Chernobyl'skoi AES, na sovremennom etape: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (g. Khoyniki, 26–27 iyulya 2018 goda)* [Problems and prospects of development of territories affected by the Chernobyl disaster at the present stage: proceedings of an International scientific and practical conference (Khoyniki, July 26–27, 2018)]. Khoyniki, 2018, pp. 35–39 (in Russian).
10. Deryabina T. G. The results of observations of the Przewalski's horse (*Equus przewalskii*) on the territory of the Polesky State Radiation and Ecological Reserve. *Sovremennye ekologicheskie problemy ustoichivogo razvitiya Polesskogo regiona i sopredel'nykh territorii: nauka, obrazovanie, kul'tura : materialy V Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Mozyr', 23–24 oktyabrya 2014 goda)* [Modern environmental problems of sustainable development of the Polesie region

and adjacent territories: science, education, culture: materials of the V International scientific and practical conference (Mozyr, October 23–24, 2014)]. Mozyr, 2014, pp. 75–78 (in Russian).

11. Deryabina T. G. Przewalsky horse (*Equus ferus przewalskii* Polj., 1881) in the conditions of the Belarusian exclusion zone of the Chernobyl nuclear power plant. *Visti Biosfernogo zapovidnika "Askaniya-Nova" = News Biosphere Reserve "Askania Nova"*, 2015, vol. 17, pp. 54–59 (in Russian).

12. Wilkinson G. S., Chapman A. M. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics*, 1991, vol. 128, no. 3, pp. 607–617.

Информация об авторах

Хейдорова Екатерина Эдуардовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: hejkat@mail.ru

Никифоров Михаил Ефимович – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikif@tut.by

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

Шпак Алексей Викторович – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shpak.dvergr@gmail.com

Шакун Василий Васильевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: terioforest@tut.by

Домбровский Валерий Чеславович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: valdombr@rambler.ru

Шквыря Марина Геннадьевна – канд. биол. наук, гл. зоолог. Киевский зоологический парк общегосударственного значения (пр. Победы, 32, г. Киев, Украина). E-mail: maryna.shkvyria@zoo.kiev.ua

Information about the authors

Ekaterina E. Kheidorova – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hejkat@mail.ru

Mikhail E. Nikiforov – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikif@tut.by

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

Aleksey V. Shpak – Senior 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: shpak.dvergr@gmail.com

Vasily V. Shakun – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: terioforest@tut.by

Valeriy Ch. Dombrovski – Ph. D. (Biol.), Senior 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: valdombr@rambler.ru

Marina G. Shkvyrya – Ph. D. (Biol.), Chief Zoologist. Kiev Zoological Park of national importance (32, Pobeda Ave., Kiev, Ukraine). E-mail: maryna.shkvyria@zoo.kiev.ua

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.4:635.64:577.355.3/4:577.352.38

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-283-291>

Поступила в редакцию 05.12.2019

Received 05.12.2019

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

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

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ «ИММУНАКТ-ГК» И «ЭКОСИЛ» НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ ТОМАТА В УСЛОВИЯХ МАЛООБЪЕМНОЙ ГИДРОПОНИКИ

Аннотация. Показано многостороннее положительное действие препарата «Иммунакт-ГК» на основе β -1,3-глюкана на растения томата, выращенные в условиях малообъемной гидропоники в защищенном грунте. Так, например, он оказывает стимулирующий эффект на биосинтез фотосинтетических пигментов и фотохимическую активность фотосистемы II хлоропластных мембран, индуцирует накопление фенольных соединений, способствует генерации активных форм кислорода, выполняющих сигнальную функцию и включающих естественные внутренние защитные механизмы, способствует стабилизации уровня окислительных процессов в листьях томата. Установлено, что в производственных условиях препарат «Иммунакт-ГК» по эффективности превосходит отечественный регулятор роста «Экосил», обеспечивая получение прибавки урожая томата до 5 кг/м².

Ключевые слова: β -1,3-глюкан, «Экосил», хлорофилл, каротиноиды, фотосистема II, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, томаты

Для цитирования: Влияние препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил» на фотосинтетический аппарат и окислительный статус растений томата в условиях малообъемной гидропоники / Л. М. Абрамчик [и др.]. // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 283–291. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-283-291>

**Larisa M. Abramchik, Irina N. Domanskaya, Vladimir N. Makarov, Elena V. Serdiuchenko,
Tatsiana S. Bachyshcha, Viktoria V. Kondratieva, Yulia N. Dovbniuk,
Sviatoslav N. Shpilevski, Luidmila F. Kabashnikova**

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

INFLUENCE OF “IMMUNACT-GK” AND “ECOSIL” PREPARATIONS ON THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS AND OXIDATIVE STATUS OF TOMATO PLANTS IN CONDITIONS OF SMALL VOLUME HYDROPONICS

Abstract. It was shown that the preparation “Immunact-GK” based on β -1,3-glucan exerts a multilateral positive effect on tomato plants grown under conditions of low-volume hydroponics in protected ground. In particular, it has a stimulating effect on the biosynthesis of photosynthetic pigments and the photochemical activity of PS II in chloroplast membranes, induces the accumulation of phenolic compounds, promotes the generation of ROS, which perform a signaling function and start a natural internal defense mechanisms, contributes to stabilize the level of oxidative processes in tomato leaves. It has been established that under manufacturing conditions, the preparation “Immunact-GK” provides an increase in tomato yield up to 5 kg/m² and exceeds the efficiency of the native growth regulator “Ecosil”.

Keywords: β -1,3-glucan, Ecosil, chlorophyll, carotenoids, photosystem 2, lipid peroxidation, reactive oxygen species, tomato

For citation: Abramchik L. M., Domanskaya I. N., Makarov V. N., Serdiuchenko E. V., Bachyshcha T. S., Kondratieva V. V., Dovbniuk Yu. N., Shpilevski S. N., Kabashnikova L. F. Influence of “Immunact-GK” and “Ecosil” preparations on the photosynthetic apparatus and oxidative status of tomato plants in conditions of small volume hydroponics. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 283–291 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-283-291>

Введение. Болезни овощных культур защищенного грунта приводят не только к существенным потерям урожая, но и к снижению качества овощной продукции. Ввиду огромного разнообразия фитопатогенов, их высокой вариабельности и колоссальной способности приспособиться к растению-хозяину первоочередной задачей с целью увеличения производства овощной продукции и повышения качества урожая овощных культур защищенного грунта является снижение распространенности болезней, вызываемых микроорганизмами разной природы. Комплекс мер по борьбе с болезнями растений, наряду с использованием устойчивых сортов и стимуляторов роста растений, включает прежде всего ряд химических методов защиты, которые при всей

их эффективности несут в себе опасность возникновения негативных последствий. Интенсивное применение пестицидов для подавления грибной инфекции приводит, с одной стороны, к химическому загрязнению экосистем, а с другой – к появлению высокорезистентных к пестицидам форм патогенов. Поэтому не случайно в настоящее время большое значение придается получению экологически безопасных видов продукции сельского хозяйства путем использования новых малотоксичных средств защиты растений.

В последние годы большое внимание уделяется регуляторам роста растений, обладающим иммуномодулирующей активностью. Механизм их действия основан на антибактериальных и фунгипротекторных свойствах, опосредованных стимуляцией иммунитета растений, ускорении процессов метаболизма и активации синтеза белков и углеводов [1]. Во всем мире развернуты работы по созданию индукторов устойчивости растений на основе метаболитов иммунного ответа, элиситоров или авирулентных штаммов фитопатогенов. В отличие от фунгицидов, иммуномодуляторы не вызывают резистентности у возбудителей болезней и являются идеальным средством для профилактики большинства инфекционных и неинфекционных заболеваний растений. К таким препаратам нового поколения можно отнести глюканы, которые выполняют роль сигнальных молекул, обладают элиситорными свойствами и способны активировать гены устойчивости, что приводит к повышению общей неспецифической устойчивости растений (иммунного статуса) к неблагоприятным факторам биотической и абиотической природы путем индукции природных защитных механизмов [2, 3]. Как правило, глюканы отличаются друг от друга типом и местом гликозидных связей, молекулярной массой, длиной боковых ответвлений и их расположением, наличием в молекулах кроме глюкозы других сахаров [1]. Большинство из них могут легко биодеградировать и образовывать из высокомолекулярных соединений низкомолекулярные цепочки и олигоглюканы, что увеличивает их разнообразие. Далеко не все глюканы являются элиситорами. Некоторые низкомолекулярные грибные глюканы могут обладать свойствами супрессоров реакций устойчивости растений [4], а их синтез, вероятно, контролируется генами вирулентности патогена. Все это тормозит создание коммерческих препаратов для защиты растений на основе глюканов. В настоящее время наибольшее внимание уделяется иммуномодулирующей способности глюканов, имеющих β -конфигурацию гликозидных связей. Известно, что β -1,3-глюкан является метаболитом иммунного ответа растений, что делает его экологически безопасным и пригодным для использования на предприятиях агропромышленного комплекса.

Цель работы – сравнить эффективность воздействия препарата «Имунакт-ГК» и стандартного регулятора роста «Экосил», рекомендованного к применению на овощных культурах, на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата и окислительный статус растений томата, выращенных в условиях защищенного грунта на малообъемной гидропонике.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили растения томата сорта Тореро F1, которые выращивали на малообъемной гидропонике в условиях естественного патогенного фона на Минском парниково-тепличном комбинате (МППК).

В лаборатории прикладной биофизики и биохимии ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» создан препарат «Имунакт-ГК» на основе β -1,3-глюкана природного происхождения и полимера синтетического водорастворимого (ВРП-3). Препарат предназначен для повышения урожая и устойчивости к болезням овощных культур, выращиваемых на гидропонике в защищенном грунте.

Регулятор роста «Экосил» содержит тритерпеновые кислоты в концентрации 50 г/л (УП «Бел-Универсал Продукт», Беларусь) и рекомендован для применения на растениях томата и огурца в открытом и защищенном грунте.

Обработку растений регуляторами роста проводили в фазу образования 1-й цветочной кисти методом опрыскивания рабочими растворами из расчета 200 л препарата «Имунакт-ГК» и 300 л препарата «Экосил» на 1 га. Анализ эффективности действия препаратов проводили на листьях 3-го яруса через 8 дней после обработки. Контролем служили растения, выращенные в условиях стандартных защитных мероприятий.

Содержание хлорофилла (Хл) и каротиноидов в листьях томата определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Shimadzu LC 20 Prominence (Shimadzu, Япония) с использованием хроматографической колонки типа Nucleodur C18 Gravity, размер частиц

5 мкм, длина 15 см (Macherey Nagel, Германия). Навески растительного материала по 0,1 г помещали в фарфоровые ступки, добавляли 100 мг CaCO_3 , приливали 0,5 мл 99,5 %-ного ацетона и растирали до гомогената. Гомогенат переносили в эппендорфы объемом 2 мл. Ступки смывали 1,5 мл (3 раза по 0,5 мл) 99,5 %-ного ацетона. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g. Супернатант переносили в новые эппендорфы. Если объем супернатанта был менее 2 мл, то его доводили до 2 мл 99,5 %-ным ацетоном. Перед хроматографией супернатант еще раз центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g. В виалы для хроматографии вносили по 0,5 мл супернатанта и помещали их в камеру хроматографа. Объем инъекции составлял 20 мкл. Разделение пигментов в колонке производили со скоростью 0,5 мл/мин с использованием растворов А (90 % ацетонитрила, 9,9 % фильтрованной H_2O , 0,1 % триэтиламина) и В (100 % этилацетата). Пигменты регистрировали детектором с диодной матрицей по спектрам поглощения в диапазоне 200–700 нм [5].

Для определения содержания фенольных соединений листовую ткань растирали в фарфоровой ступке, добавив несколько капель 1 %-ного раствора HCl . В гомогенат добавляли 2 мл 1 %-ного раствора HCl и проводили серию центрифугирований по 10 мин при 7000 g до полного обесцвечивания осадка. Полученные экстракты объединяли, добавляли 95 %-ный раствор этанола до общего объема 20 мл и выдерживали при температуре 4 °С в течение 12–15 ч, затем вновь центрифугировали. Оптическую плотность полученного прозрачного экстракта оценивали на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu, Япония) [6].

Фотохимическую активность фотосистемы II (ФС II) определяли с помощью метода импульсно-модулированной флуоресцентной спектроскопии (РАМ, pulse-amplitude modulated fluorometry), который позволяет проводить прижизненную регистрацию с помощью кинетической кривой индукции флуоресценции Хл *a*. Параметры флуоресценции Хл *a* ФС II измеряли на флуориметре Dual-РАМ 100 (Walz, Германия) по методам, предложенным в работе [7]. Листья предварительно адаптировали к темноте в течение 15 мин. Модулированный с низкой частотой (32 Гц) свет (650 нм) очень низкой интенсивности (0,04 мкмоль квантов/м²·с) вызывал повышение минимального уровня (F_0) флуоресценции, а увеличение показателя флуоресценции до уровня F_m инициировали включением света (665 нм) высокой интенсивности (3500 мкмоль квантов/м²·с). Параметры флуоресценции измеряли с использованием актиничного света (120 мкмоль квантов/м²·с) и рассчитывали по формулам

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

$$F_v = F_m - F_0,$$

$$\Phi_{\text{ФС II}} = (F'_m - F)/F'_m,$$

$$qP = (F'_m - F)/(F'_m - F_0),$$

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

$$qL = qP(F'_0/F),$$

где F_0 и F'_0 – минимальный уровень флуоресценции Хл *a* в листьях, адаптированных к темноте и свету соответственно; F_v – переменная флуоресценция Хл *a*; F_m и F'_m – максимальный уровень флуоресценции Хл *a* в листьях, адаптированных к темноте и свету соответственно; F_v/F_m – потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II; $\Phi_{\text{ФС II}}$ – эффективный квантовый выход фотохимических реакций ФС II; qP и qN – фотохимическое и нефотохимическое тушение флуоресценции Хл *a* соответственно; qL – параметр, отражающий степень открытости реакционных центров ФС II.

Скорость нециклического электронного транспорта рассчитывали по формуле $\text{ETR} = \Phi_{\text{ФС II}} \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0,5$, где $\Phi_{\text{ФС II}}$ – эффективный квантовый выход фотохимических реакций ФС II; PAR – интенсивность света (мкмоль квантов/м²·с); c – часть абсорбированного света (обычно 0,84); 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на ФС II.

Для анализа активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли количество ТБК-активных продуктов по методу, приведенному в работе [8]. Растительный материал гомогене-

низировали в 5 мМ фосфатном буфере (рН 7,2). К полученному гомогенату добавляли равный объем 0,5 %-ной тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 20 %-ной трихлоруксусной кислоте. Полученные образцы нагревали на кипящей бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали при 3000 об/мин. Супернатант измеряли фотометрически при 532 нм. Количество малонового диальдегида (МДА) рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА-ТБК, который равен $1,55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, с поправкой на неспецифическое поглощение при 600 нм ($1,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [9].

Для определения общего уровня активных форм кислорода (АФК) использовали флуоресцентный тест, в основе которого лежит образование дихлорфлуоресцеина (ДХФ) из нефлуоресцирующего дихлорфлуоресцеин-диацетата (ДХФДА) в экстрактах листьев. Навески листьев по 0,25 г гомогенизировали в 2 мл 0,2 н HClO_4 . Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 г. Для нейтрализации кислого рН к 500 мкл суспензии добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение рН – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 г. Для определения АФК к 950 мкл 0,15 М Трис-НСI буфера, рН 7,5, последовательно добавляли 25 мкл нейтрализованного супернатанта и 25 мкл 0,15 мМ раствора ДХФДА. Контролем служила проба, состоявшая из 975 мкл 0,15 М Трис-НСI буфера и 25 мкл 0,15 мМ ДХФДА. Все пробы инкубировали в течение 20 мин в термостате при 37 °С в темноте. Уровень АФК определяли, регистрируя интенсивность флуоресценции ДХФ ($\lambda_{\text{возб}} = 496 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} = 524 \text{ нм}$) с помощью спектрофлуориметра «СОЛАР СМ 2203» («СОЛАР», Беларусь) [10].

Концентрацию пероксида водорода в экстрактах листьев рассчитывали с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии H_2O_2 , катализируемая пероксидазой хрена. Содержание H_2O_2 определяли, регистрируя интенсивность флуоресценции скополетина ($\lambda_{\text{возб}} = 370 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} = 464 \text{ нм}$) на спектрофлуориметре «СОЛАР СМ 2203» («СОЛАР», Беларусь) [11].

Все исследования проводили в трехкратной биологической повторности. Достоверность различий средних значений определяли по *t*-критерию Стьюдента с использованием компьютерных программ Statistica 6.0 (StatSoft) и Excel 2010. Статистически достоверные различия между показателями при $p \leq 0,05$ в таблицах и на графиках отмечены звездочкой.

Результаты и их обсуждение. Анализ количественного содержания фотосинтетических пигментов показал, что обработка растений томата препаратом «Иммунакт-ГК» стимулирует накопление хлорофилловых пигментов и каротиноидов (рис. 1, 2).

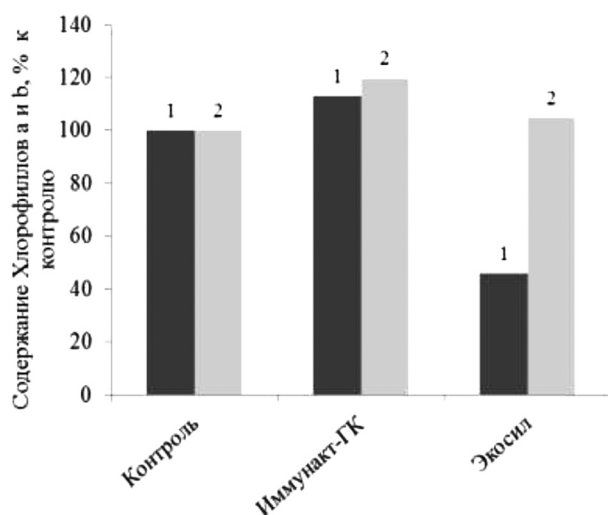


Рис. 1. Влияние препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил» на содержание хлорофилловых пигментов (1 – Хл а; 2 – Хл б) в растениях томата, выращенных на малообъемной гидропонике

Fig. 1. The effect of preparations “Immunact-GK” and “Ecosil” on chlorophyll pigment content (1 – chlorophyll a; 2 – chlorophyll b) in tomato plants grown in conditions of small volume hydroponics

В то же время при использовании стандартного регулятора роста «Экосил» отмечено его негативное действие на метаболизм Хл а: у обработанных этим препаратом растений количество пигмента снижалось на 45 % (рис. 1). Содержание Хл б сохранялось на уровне контрольного варианта, а количество каротиноидов (за исключением лютеина) возрастало (рис. 2). Причем, как видно из рис. 2, уровень β -каротина – основного пигмента, защищающего клеточные структуры от действия синглетного кислорода, образующегося в присутствии Хл в триплетном состоянии, – крайне высок в тканях листа, обработанных препаратом «Экосил».

Препарат «Иммунакт-ГК» вызывал двукратное увеличение количества полифенольных соединений в листьях томата, в отличие от регулятора роста «Экосил», при обработке которым данный показатель оставался неизменным

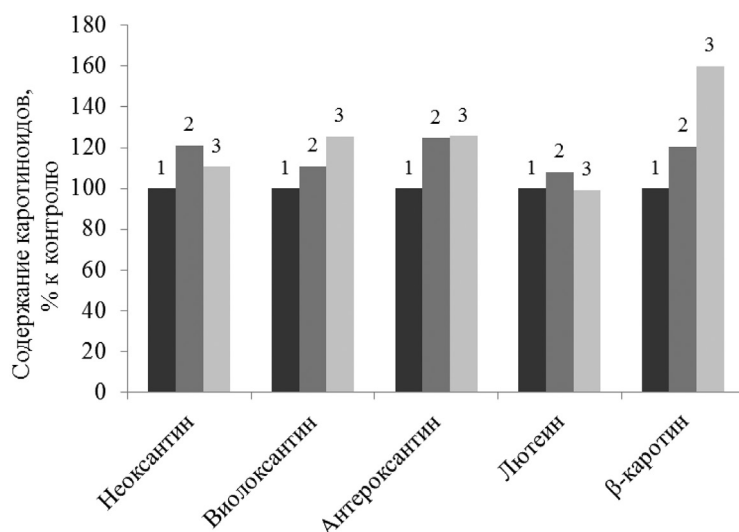


Рис. 2. Влияние иммуномодулирующих препаратов (1 – контроль; 2 – «Иммунакт-ГК»; 3 – «Экосил») на содержание каротиноидов в растениях томата, выращенных на малообъемной гидропонике

Fig. 2. The effect of immunomodulatory preparations (1 – control; 2 – “Immunact GK” ; 3 – “Ecosil”) on the carotenoids content in tomato plants grown in conditions of small volume hydroponics

по сравнению с таковым у необработанного варианта (рис. 3).

В настоящее время основным тестом на изменение функциональной активности фотосинтетического аппарата является измерение кинетики флуоресценции Хл *a in vivo*. Результаты исследования действия препарата «Иммунакт-ГК» и стандартного регулятора роста «Экосил» на показатели фотохимической активности мембран хлоропластов в растениях томата представлены в таблице и на рис. 4.

Из таблицы видно, что статистически значимые различия величины потенциального квантового выхода фотохимических реакций ФС II (F_v/F_m) в результате использования составов «Экосил» и «Иммунакт-ГК» по сравнению с контрольным вариантом отсутствуют. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что изученные препараты не вызывают существенных изменений процессов светосбора и передачи энергии в реакционные центры фотосинтетических мембран.

По результатам анализа индукции флуоресценции Хл *a* установлено повышение скорости линейного транспорта электронов ETR в мембранах хлоропластов растений томата при обработке

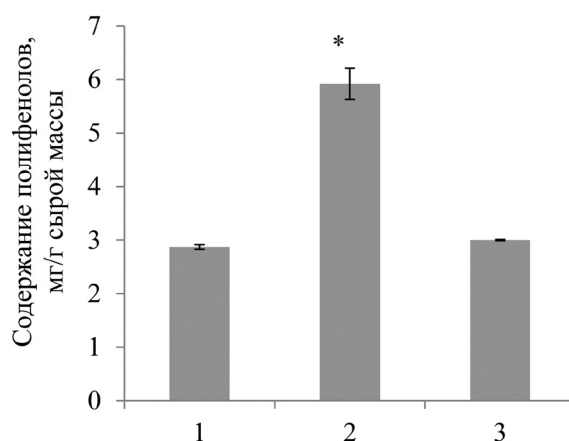


Рис. 3. Влияние иммуномодулирующих препаратов (1 – контроль; 2 – «Иммунакт-ГК»; 3 – «Экосил») на содержание полифенолов в растениях томата, выращенных на малообъемной гидропонике

Fig. 3. The effect of immunomodulatory preparations (1 – control; 2 – “Immunact GK” ; 3 – “Ecosil”) on polyphenol content in tomato plants grown in conditions of small volume hydroponics

Влияние препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил» на параметры индукции флуоресценции Хл *a* в листьях томата, выращенного на малообъемной гидропонике

The effect of “Immunact GK” and “Ecosil” preparations on the parameters of Chl *a* fluorescence induction in tomato leaves grown in conditions of small volume hydroponics

Вариант	F_0	F_m	F_v	F_v/F_m
Контроль	0,089 ± 0,010	0,334 ± 0,004	0,245 ± 0,005	0,735 ± 0,020
«Иммунакт-ГК»	0,086 ± 0,004	0,331 ± 0,003	0,245 ± 0,001	0,740 ± 0,010
«Экосил»	0,087 ± 0,002	0,377 ± 0,004*	0,290 ± 0,003*	0,769 ± 0,029

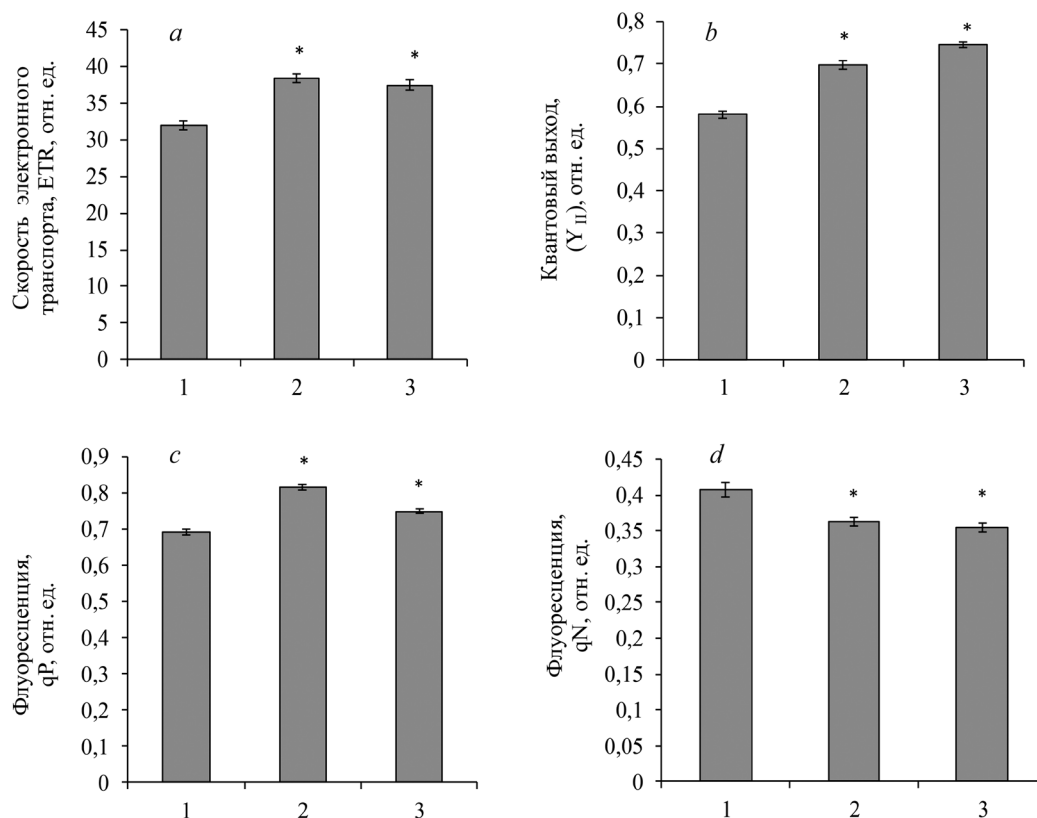


Рис. 4. Влияние иммуномодулирующих препаратов (1 – контроль; 2 – «Иммунакт-ГК»; 3 – «Экосил») на скорость электронного транспорта (a), квантовый выход фотохимических реакций (b), фотохимическое тушение флуоресценции Хл а (qP) (c), нефотохимическое тушение флуоресценции Хл а (qN) (d) в растениях томата, выращенных на малообъемной гидропонике

Fig. 4. The effect of the immunomodulatory preparations (1 – control; 2 – “Immunact-GK”; 3 – “Ecosil”) and on the electron transport speed (a), quantum yield of photochemical reactions (b), photochemical quenching of Chl a fluorescence (qP) (c), non-photochemical quenching of Chl a (qN) fluorescence (d) in tomato plants grown in conditions of small volume hydroponics

тестируемыми препаратами. В обоих случаях различия были статистически достоверными (рис. 4, a). Кроме того, влияние препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил» проявлялось также и в увеличении значения эффективного квантового выхода фотохимических реакций Y_{II} по отношению к контрольному варианту (рис. 4, b). Результаты измерения фотохимического тушения возбужденного состояния Хл а (qP), характеризующего степень реокисления первичного хинонового акцептора Q_A , в результате применения препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил» представлены на рис. 4, c. Установлено, что значения коэффициента фотохимического тушения qP у растений томата, обработанных данными препаратами, выше, чем у контрольного варианта, на 18 и 8 % соответственно.

Таким образом, согласно полученным данным о фотохимическом тушении и скорости электронного транспорта в хлоропластах томата, в результате обработки растений препаратами «Иммунакт» и «Экосил» большая часть фотонов, поглощаемых ФС II, используется в фотохимических процессах. Об этом свидетельствует и обнаруженное нами уменьшение величины нефотохимического тушения флуоресценции Хл а (qN) у растений томата, обработанных препаратами «Иммунакт-ГК» и «Экосил» (рис. 4, d), что указывает на способность данных препаратов содействовать эффективному протеканию фотохимических реакций в мембранах хлоропластов с минимальным расходом поглощенной энергии света на тепловую диссипацию, так как параметр qN служит показателем изменения тепловых потерь поглощенной энергии света в фотосинтетических реакциях [12]. На основании полученных данных можно заключить, что действие данных препаратов способствует эффективному протеканию световых стадий фотосинтеза, что в свою очередь создает благоприятные предпосылки для повышения урожайности овощных культур, выращенных на гидропонике.

Для оценки действия препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил, ВЭ» на протекание окислительных процессов в растениях томата, выращенных на малообъемной гидропонике, изучено содержание конечного продукта в ПОЛ – МДА, количество которого является одним из важнейших показателей устойчивости растений к стрессу. Установлено, что образование ТБК-активных продуктов несколько подавлялось при обработке растений томата препаратом «Экосил» и оказалось нечувствительным к действию «Иммунакт-ГК» (рис. 5, *a*). Полученные данные служат подтверждением стабилизирующего действия «Иммунакт-ГК» на хлоропластные мембраны, так как накопление продуктов ПОЛ в листьях растений, как правило, наблюдается при нарушении процессов переноса электронов в растительной клетке [8].

Одним из важных показателей, характеризующих окислительный потенциал в листьях растений, является образование АФК, которые, как принято считать в настоящее время, являются не только прямой защитой растений от патогенов, но и выступают в качестве сигнальных молекул, индуцирующих ряд генетических, биохимических и физиологических реакций, способствующих формированию адаптивных механизмов и повышению устойчивости растений [13] при биотическом стрессе. Проведенный анализ содержания АФК в листьях томата после обработки регуляторами роста «Иммунакт-ГК» и «Экосил» выявил повышение в них уровня АФК относительно контроля на 24 и 18 % соответственно (рис. 5, *b*). При этом ответной реакцией растений томата на обработку данными препаратами являлось также усиление генерации H_2O_2 (рис. 5, *c*). Известно, что повышение содержания пероксида водорода (так называемый «окислительный взрыв») также оказывает подавляющее действие на развитие патогенных микроорганизмов в растительной ткани. В то же время образующийся пероксид водорода после достижения определенной концентрации способен изменять экспрессию различных генов, в том числе активировать защитные гены [14]. Таким образом, наблюдаемое под действием препаратов «Иммунакт-ГК» и «Экосил» повышение генерации АФК, включая пероксид водорода, которые рассматривают в качестве необходимых посредников в процессах активации адаптивных реакций на стрессы разной природы, является подтверждением целесообразности использования этих препаратов в условиях защищенного грунта для повышения урожайности и устойчивости растений томата к патогенной инфекции.

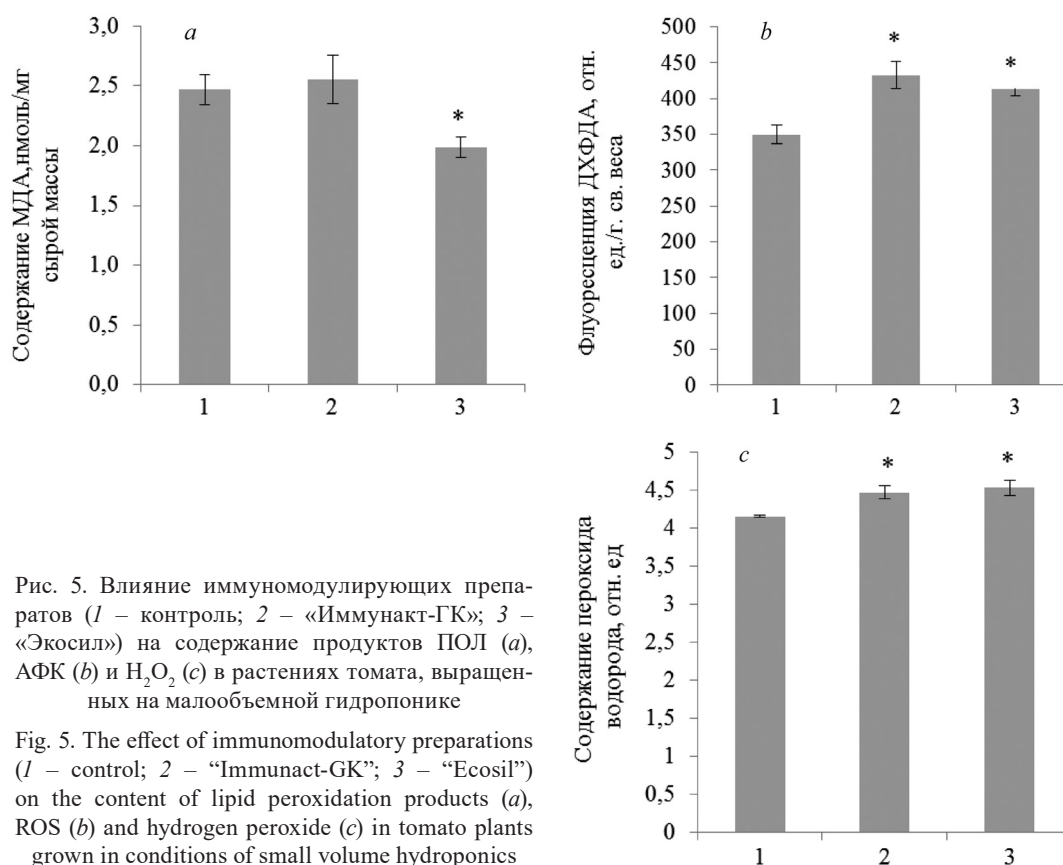


Рис. 5. Влияние иммуномодулирующих препаратов (1 – контроль; 2 – «Иммунакт-ГК»; 3 – «Экосил») на содержание продуктов ПОЛ (*a*), АФК (*b*) и H_2O_2 (*c*) в растениях томата, выращенных на малообъемной гидропонике

Fig. 5. The effect of immunomodulatory preparations (1 – control; 2 – “Immunact-GK”; 3 – “Ecosil”) on the content of lipid peroxidation products (*a*), ROS (*b*) and hydrogen peroxide (*c*) in tomato plants grown in conditions of small volume hydroponics

В результате производственных испытаний эффективности действия «Иммунакт-ГК» в МПТК, проведенных совместно с сотрудниками РУП «Институт защиты растений», установлено, что препарат «Иммунакт-ГК» превосходит отечественный регулятор роста «Экосил, ВЭ» по эффективности, обеспечивая высокое качество овощной продукции и получение прибавки урожая томата до 5 кг/м².

Закключение. Показано, что препарат «Иммунакт-ГК» на основе β-1,3-глюкана проявляет многостороннее положительное действие на растения томата, выращенные в условиях защищенного грунта. Так, например, он оказывает стимулирующий эффект на биосинтез фотосинтетических пигментов и фотохимическую активность ФС II хлоропластных мембран, индуцирует накопление в растениях фенольных соединений, что имеет существенное значение для укрепления клеточной стенки растения, способствует генерации АФК, выполняющих сигнальную функцию и включающих естественные внутренние защитные механизмы, и способствует стабилизации уровня окислительных процессов в листьях томата. Следовательно, препарат «Иммунакт-ГК» обладает иммуномодулирующей способностью, благоприятно влияет на рост и развитие растений, в связи с чем его можно рекомендовать для использования в качестве индуктора устойчивости растений томата в тепличных хозяйствах с целью повышения устойчивости и урожайности этой овощной культуры.

Список использованных источников

1. Препараты нового поколения для защиты растений / Л. Ф. Горовой [и др.]. – М. : Наука, 2010. – 45 с.
2. Leubner-Metzger, G. Functions and regulation of β-1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening / G. Leubner-Metzger // *Seed Sci. Res.* – 2003. – Vol. 13, N 1. – P. 17–34. <https://doi.org/10.1079/ssr2002121>
3. Фундаментальная фитопатология / С. Ф. Багирова [и др.] ; под ред. Ю. Т. Дьякова. – М. : Красанд, 2012. – 508 с.
4. Doke, N. Effect on host hypersensitivity of suppressors released during the germination of *Phytophthora infestans* cystospores / N. Doke, N. A. Garas, J. Kuć // *Phytopathology.* – 1980. – Vol. 70. – P. 35–39. <https://doi.org/10.1094/phyto-70-35>
5. Rodriguez-Amaya, D. B. *HarvestPlus Handbook for carotenoid analysis* / D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. – Washington : International Food Policy Research Institute, 2004. – 63 p.
6. Singleton, V. L. Analysis of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós // *Methods in Enzymology* / ed. Lester Packer. – San Diego, 1999. – Vol. 299 : Oxidants and Antioxidants, Part A. – P. 152–178.
7. Krause, G. H. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics / G. H. Krause, E. Weis // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 42, N 1. – P. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
8. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М. Н. Мерзляк. – М. : ВИНТИ, 1989. – 168 с. – (Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений ; Т. 6).
9. Heath, R. L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation / R. L. Heath, L. Packer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1968. – Vol. 125, N 1. – P. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
10. LeBel, C. P. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress / C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – Vol. 5, N 2. – P. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
11. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dehydroxy-phenoxazine derivative / J. G. Mohanty [et al.] // *J. Immunol. Meth.* – 1997. – Vol. 202, N 2. – P. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
12. Карапетян, Н. В. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений / Н. В. Карапетян, Н. Г. Бухов // *Физиология растений.* – 1986. – Т. 33, № 5. – С. 1013–1026.
13. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В. Д. Креславский [и др.] // *Физиология растений.* – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163–178.
14. Тарчевский, И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М. : Наука, 2002. – 294 с.

References

1. Gorovoi L. F., Koshevskii I. I., Teslyuk V. V., Red'ko V. V. *Preparations of a new generation for plant protection*. Moscow, Nauka Publ., 2010. 45 p. (in Russian).
2. Leubner-Metzger G. Functions and regulation of β-1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*, 2003, vol. 13, no. 1, pp. 17–34. <https://doi.org/10.1079/ssr2002121>
3. Bagirova S. F., Dzhavakhiya V. G., D'yakov Yu. T., Ozeretskovskaya O. L., Provorov N. A., Tikhonovich I. A., Shcherbakova L. A. *Fundamental phytopathology*. Moscow, Krasand Publ., 2012. 508 p. (in Russian).
4. Doke N., Garas N. A., Kuć J. Effect on host hypersensitivity of suppressors released during the germination of *Phytophthora infestans* cystospores. *Phytopathology*, 1980, vol. 70, pp. 35–39. <https://doi.org/10.1094/phyto-70-35>
5. Rodriguez-Amaya D. B., Kimura M. *HarvestPlus Handbook for carotenoid analysis*. Washington, International Food Policy Research Institute, 2004. 63 p.

6. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Vol. 299. *Oxidants and Antioxidants, Part A*. San Diego, 1999, pp. 152–178.

7. Krause G. H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, vol. 42, no. 1, pp. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>

8. Merzlyak M. N. *Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes*. Moscow, VINITI Publ., 1989. 168 p. (in Russian).

9. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, vol. 125, no. 1, pp. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

10. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 1992, vol. 5, no. 2, pp. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>

11. Mohanty J. G., Jaffe, J. S., Schulman E. S., Raible D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dehydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*, 1997, vol. 202, no. 2, pp. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)

12. Karapetyan N. V., Bukhov N. G. Variable chlorophyll fluorescence as an indicator of the physiological state of plants. *Fiziologiya rastenii = Plant Physiology*, 1986, vol. 33, no. 5, pp. 1013–1026 (in Russian).

13. Kreslavski V. D., Allakhverdiev S. I., Los D. A., Kuznetsov V. V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, vol. 59, no. 2, pp. 141–154. <https://doi.org/10.1134/s1021443712020057>

14. Tarchevskii I. A. *Signal systems of plant cells*. Moscow, Nauka Publ., 2002. 229 p. (in Russian).

Информация об авторах

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

Доманская Ирина Николаевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: domanin07@mail.ru

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

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

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

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

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

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

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

Information about the authors

Larisa M. Abramchik – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lmabramchik@mail.ru

Irina N. Domanskaya – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: domanin07@mail.ru

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

Elena V. Serdiuchenko – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: temporo@mail.ru

Tatsiana S. Bachyshcha – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatsiana.bachyshch@gmail.com

Viktoria V. Kondratyeva – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vislika@mail.ru

Yulia N. Dovbniuk – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: y.dovbniyk@gmail.com

Sviatoslav N. Shpilevski – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: metanova@mail.ru

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

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.218:577.182.99:577.152.1

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-292-298>

Поступила в редакцию 16.03.2020

Received 16.03.2020

Д. А. Ермоленко, А. Ю. Мисюкевич, А. Г. Полешко, И. Д. Волотовский

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

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА МУКОВИСЦИДОЗА – НАСЛЕДСТВЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ ДНК больного муковисцидозом с целью определения природы мутации, лежащей в основе данного заболевания. ДНК была получена из фибробластов больного муковисцидозом согласно общепринятым методикам. Сконструированы праймеры к фрагменту ДНК в 10-м экзоне гена *CFTR*, в котором локализована одна из часто встречаемых мутаций – F508del, обуславливающая муковисцидоз. С помощью ПЦР-амплификации получен фрагмент ДНК, в котором содержится данная мутация. Электрофорез амплифицированного материала выявил один продукт ДНК размером около 153 пар нуклеотидов. Методом секвенирования по Сэнгеру установлена природа и последовательность нуклеиновых оснований выделенного фрагмента ДНК. Сравнение данных о нуклеотидной последовательности, полученных после секвенирования фрагмента у больного муковисцидозом, с аналогичными данными здорового человека показало наличие мутации на уровне 10-го экзона в положении 1521–1523 кодирующей последовательности гена *CFTR*, представляющей собой выпадение трех пар нуклеотидов, которая, по общепринятым представлениям, относится к мутации F508del. Анализ данных секвенирования позволил отнести данную мутацию к разряду компаундных гетерозигот.

Ключевые слова: аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, муковисцидоз, *CFTR*, мутация F508del, компаундная гетерозигота

Для цитирования: Молекулярно-генетическая природа муковисцидоза – наследственного заболевания человека / Д. А. Ермоленко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 292–298. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-292-298>

Darya A. Ermolenko, Alla Y. Misiukevich, Anna G. Poleshko, Igor D. Volotovski

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

MOLECULAR-GENETIC NATURE OF CYSTIC FIBROSIS, A HUMAN HEREDITARY DISEASE

Abstract. Molecular genetic analysis of DNA patient with cystic fibrosis to determine the nature of mutation to be the reason of this disease. DNA was obtained from fibroblast of given patient according to generally known methods. For that a pair of primers to DNA fragment in 10 exon were a mutation conditioning cystic fibrosis was designed. With help PCR-amplification an amplicon containing desired mutation. The electrophoresis of amplified material one band in DNA of which about 153 nucleotides are contained has shown. The nature and sequence of nucleotides in this fragments were established. A comparison of sequence date for this fragments of cystic fibrosis patient with date of health human has shown existence of mutation on the level of 10 exons at position 1521–1523 of the coding sequence of the *CFTR* gene, which is the loss of 3 pairs of nucleotides, which, according to conventional ideas, refers to the F508del mutation. The analysis sequence date allowed attribute to compound heterozygotes.

Keywords: autosomal recessive hereditary disease, cystic fibrosis, *CFTR*, F508del mutation, compound heterozygote

For citation: Ermolenko D. A., Misiukevich A. Y., Poleshko A. G., Volotovski I. D Molecular-genetic nature of cystic fibrosis, a human hereditary disease. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 292–298 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-292-298>

Введение. Муковисцидоз – аутосомно-рецессивное наследственное заболевание [1]. Клинически муковисцидоз характеризуется поражением легких, а также желудочно-кишечного тракта, в основе которого лежит синдром мальабсорбции. При данном заболевании эпителиальные клетки утрачивают способность к нормальному транспорту воды вследствие дисбаланса ионов хлора. Установлено, что муковисцидоз связан с мутацией в определенном гене, кодирующем белок *CFTR* (от *англ. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), или МВТР – муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости, который ответственен за транспорт ионов хлора и бикарбонатов [2]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в среднем в мире муковисцидоз встречается с частотой 1 случай на 2500 новорожденных.

Мутации гена *CFTR* подразделяют на 6 классов, определяющих тяжесть проявления клинической картины заболевания на белковом уровне. Принято считать, что мутации I–III классов приводят к тяжелым нарушениям функционирования белка *CFTR* – к классическому фенотипу проявления муковисцидоза, в то время как мутации IV–VI классов вызывают частичные «мягкие» нарушения функции транспортера, что клинически проявляется в более легких формах заболевания [3].

Ген был идентифицирован в 1989 г. [4]. Показано, что он локализован на длинном плече 7-й хромосомы, имеет протяженность 250 000 пар оснований, включает в себя 27 экзонов, кодирующих белковый продукт длиной 1480 аминокислот [5]. Известно порядка 2000 мутаций, вызывающих данное заболевание, среди которых к наиболее часто встречающейся, в том числе в Республике Беларусь, относят мутацию F508del (делеция фенилаланина в 508-м положении). Относительная доля этой мутации составляет около 66 % от всех выявленных мутаций в гене *CFTR*, приводящим к манифестации данного заболевания. У 35 % больных муковисцидозом указанная мутация находится в гетерозиготном состоянии, у 38 % – в гомозиготном. Оказывается, что замена (делеция) всего лишь одной аминокислоты в гене транспортного белка сопровождается посттрансляционной модификацией макромолекулы транспортера, в результате чего белок *CFTR* становится структурно нестабильным и функционально неполноценным.

Прогресс в молекулярной генетике привел к разработке оригинального метода генетической коррекции строения генов, получившего название CRISPR/Cas9-технологии [6]. Данная технология позволяет элиминировать поврежденный участок гена и заменять его исходной неповрежденной нуклеотидной последовательностью. В ряде работ последних лет описаны попытки генетического редактирования муковисцидоза. Однако прежде чем приступить к генетическому редактированию того или иного гена, следует определить точную локализацию мутации, которая проводится в несколько стадий.

Цель настоящей работы – определение природы мутации в гене *CFTR* у больного (мужской пол, 20 лет), приводящая к нарушению нормального функционирования транспортного белка *CFTR*, ответственного за развитие тяжелого наследственного заболевания – муковисцидоза, с целью последующего проведения CRISPR/Cas 9 редактирования мутированного гена.

Объекты и методы исследования. Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали фибробласты кожи. В центре «Клеточные технологии» Института биофизики и клеточной инженерии в условиях операционной был произведен забор фрагмента кожи размером 2–3 мм у пациента мужского пола 20 лет с диагнозом «муковисцидоз», обслуживавшегося в 9-й больнице г. Минска.

В качестве контроля в работе использовали образцы ДНК, выделенной из фибробластов здорового человека.

Выделение и культивирование фибробластов. В Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси был выбран следующий подход. Из кожи (папиллярного слоя дермы) пациента выделяли небольшой фрагмент размером 2×3 мм и помещали его в чашку Петри с ростовой средой. Затем чашку накрывали предметным стеклом с отверстием в центре и помещали ее в инкубатор на 2 недели. Ростовую среду готовили на основе DMEM (среда Дульбекко) с добавлением 10 %-ной фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Как только в чашке Петри образовывался сливной монослой, фрагмент переносили в другую чашку с ростовой средой того же состава для получения вторичного монослоя. Манипуляцию с эксплантом повторяли несколько раз. Каждый образовавшийся монослой снимали и пересеивали в ростовую среду, содержащую DMEM/F12 в соотношении 3:1 и 10 % от общего объема ФБС. Данный способ позволял в течение 1 мес. накопить в культуре большое количество пролиферативно активных фибробластов.

В стационарной стадии роста культура фибробластов была представлена морфологически однородными клетками, имеющими вытянутую форму. Результаты иммунофенотипического анализа, полученные в культуре фибробластов дермы больного муковисцидозом, показали отсутствие значимых различий в уровне экспрессии основных маркеров фибробластов кожи по сравнению с фибробластами здоровых доноров. CD90+ экспрессировали 92 % клеток, CD44+ – 95 %, CD105+ – 76 %, CD73+ – 92 %, виментин – 97 %, фибронектин – 28 %. Кроме того, фибробласты экспрессировали белок нестин (3 %) и маркер эпителиальных клеток – K19 (4 %).

Выделение геномной ДНК из клеток. ДНК из фибробластов выделяли и очищали с помощью набора NucleoSpin®Tissue по протоколу производителя (Macherey-Nagel, США). Протокол включает четыре ключевых (основных) шага: клеточный лизис, адсорбцию нуклеиновых кислот, отмывку и десорбцию (элюцию).

Разрушение клеточной структуры (лизис клеток) достигалось путем инкубации образцов в количестве 10^7 клеток фибробластов в растворе, содержащем SDS, входящего в состав буфера T1, и протеиназу K, при 70°C .

Связывание ДНК с силикагелевой мембраной колонок NucleoSpin® Tissue Column происходило после добавления к лизату большого количества хаотропных солей, входящих в состав буфера В3 с добавлением абсолютного этанола. Нежелательные примеси удаляли на стадии промывания с помощью двух буферных растворов: ВW, В5 (wash buffer), которые содержат вещества, не дающие им адсорбироваться.

Связанную с мембраной ДНК отмывали в 30 мкл буфера ВЕ для элюции (выведения в раствор). Растворенную в буфере ДНК хранили при -20°C .

ПЦР-амплификация целевого участка CFTR. Поскольку самая частая мутация гена CFTR F508del локализована в его 10-м экзоне, использовали метод ПЦР-амплификации для выделения и клонирования целевого фрагмента гена, в котором, предположительно, располагается мутация.

Праймеры, фланкирующие исследуемый участок, подбирали с помощью программы Primer-BLAST, основываясь на нуклеотидной последовательности из базы данных GenBank. Праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех».

ПЦР проводили в термоциклере Biometra T1 Thermoblock Thermal Cycler PCR DNA с использованием набора DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США).

Реакционная смесь включала 12,5 мкл готового раствора Dream Taq PCR Master Mix (2X), в состав которого входили ДНК-полимераза, 2×ПЦР буфер, раствор 0,4 мМ мононуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) в свободном виде, 0,4 мМ MgCl_2 , по 16 рМ прямого и обратного праймеров, 0,5 нг матричной ДНК, Milli-Q вода. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл.

Программа для термоциклера была следующей: предварительная денатурация при 95°C – 5 мин. Далее 35 циклов: денатурация при 95°C – 30 с, отжиг праймеров при 56°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин. Окончательная элонгация: при 72°C – 5 мин, при 10°C – 10 мин. Приготовление инкубационной смеси проводили в стерильных условиях под ламинатором.

Оценка результатов ПЦР. Детекцию продукта амплификации проводили методом гелеэлектрофореза в 2 %-ном агарозном геле.

Электрофоретический анализ полученных ампликонов осуществляли в агарозном геле по стандартному протоколу [7].

После завершения ПЦР-реакции проводили электрофоретическое разделение пробы в 2 %-ном агарозном геле в буфере TBE 1X (89 мМ Трис, 89 мМ борной кислоты, 2,5 мМ ЭДТА, pH 8,3).

Анализируемый образец смешивали с красителем для нанесения ДНК на гель 6X Loading Dye (в состав которого входили: 2,5 % Ficoll®-400, 10 мМ ЭДТА, 3,3 мМ Трис-HCl, 0,08 % SDS, 0,02 % Краситель 1, 0,001 % Краситель 2, pH 8 при 25°C) для визуализации контроля за матрицей фрагментов ДНК в геле так, чтобы его итоговая концентрация в пробе для нанесения была 1X, и вносили в лунки агарозного геля. Разделение ДНК-фрагментов проводили при напряжении 65 В в течение 40–60 мин. Визуализация геля осуществлялась методом детекции флуоресценции в ультрафиолетовом свете на приборе для документирования гелей «ГельДок 2000» (Bio-Rad, США).

Выделение ПЦР-фрагментов из агарозного геля. После электрофоретического разделения амплифицированный материал был представлен на геле-электрофореграмме в виде отдельной полосы. Затем, согласно протоколу Monarch DNA Extraction Gel Kit (New England Biolabs, США), полосу, содержащую нужный фрагмент, вырезали, взвешивали и к материалу добавляли Dessolving Buffer в соотношении 4:1 (объем раствора к массе полоски геля). Полученную смесь инкубировали в пробирке объемом 1,5 мл в течение 10 мин при 55°C в термошейкере до растворения геля и переносили на колонку для очистки ПЦР-продукта и центрифугировали 1 мин

при 12 500 об/мин. Затем оставшийся в колонке материал дважды промывали Wash Buffer (по 200 мкл) и центрифугировали 1 мин при 12 500 об/мин. Колонку переносили в новую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли в центр ее мембраны 10 мкл Elution Buffer (буфер для элюции), инкубировали в течение 1–2 мин при комнатной температуре, центрифугировали. Очищенную ДНК использовали для последующего секвенирования.

Пробоподготовка очищенных ПЦР-продуктов к секвенированию (секвенирующая реакция).

Анализ полученных последовательностей ПЦР-продуктов (образцов), выделенных из агарозного геля, производили методом секвенирования по Сэнгеру с использованием ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США) – генетического анализатора флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК, разделяемых с помощью капиллярного гель-электрофореза, используя, согласно рекомендациям производителя, набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Для секвенирующей реакции использовали 1 нг очищенного продукта ПЦР.

Реакционная смесь для проведения секвенирующей ПЦР-реакции включала 4 мкл Reaction Mix, 2 мкл Seg Buffer, по 2 мкл раствора праймера в концентрации 1,6 пмоль/мкл, 1 мкл геномной ДНК, 11 мкл воды. Условия проведения реакции были следующие: при 96 °С – 1 мин, далее 25 циклов: при 96 °С – 10 с, при 50 °С – 5 с, при 60 °С – 4 мин на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR (BioRad, США).

После секвенирования производили очистку продукта реакции смесью этанол/ЭДТА. Смесь объемом 20 мкл переносили в стерильные центрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляли по 5 мкл 0,125М ЭДТА, 60 мкл абсолютного (96 %) этанола, аккуратно перемешивали на вортексе, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем осаждали при –4 °С со скоростью 3000 g в течение 45 мин. После удаления супернатанта в пробирку вносили 60 мкл 70 %-ного спирта и центрифугировали 15 мин со скоростью 3000 g. Затем надосадочную жидкость удаляли, очищенный образец высушивали при комнатной температуре и хранили при –4 °С.

Исследуемый материал растворяли в 25 мкл формамида, денатурировали в течение 5 мин при 95 °С и немедленно охлаждали в морозильной камере. Затем пробы загружали в генетический анализатор для капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Результаты и их обсуждение. С использованием программы Primer-BLAST были сконструированы олигонуклеотидные праймеры (см. таблицу), фланкирующие целевой участок гена *CFTR*, предположительно несущий мутацию del508F.

Характеристики специфических прямых и обратных пар праймеров, использованных в работе для проведения ПЦР

Characteristics of specific direct and reverse pairs of primers used in the work for PCR

Праймер	Последовательность 5'-3'	Длина праймера, п. н.	T_m	GC, %	ПЦР-матрица
10F	ACTGGAGCCTTCAGAGGGTAA	21	59,59	55,00	ДНК
10R	TGGCATGCTTTG ATGACGCT	20	61,49	47,62	ДНК

Примечание. Размер продукта – 153 п. н.

Отобранная пара праймеров (NCBI Primer-BLAST) располагается в пределах 10-го экзона гена *CFTR* и обеспечивает в ходе транскрипции образование исходного ПЦР-продукта (ампликона) размером 153 нуклеотидов. Праймеры не образуют термодинамически стабильные продукты на последовательностях других генов (рис. 1). Длина праймеров составляет 21 и 20 нуклеотидов, а температура их плавления отличается приблизительно на 1°.

В результате проведения прямого секвенирования и биоинформатического анализа данных у пациента П. обнаружена мутация в гене *CFTR*, патологический вариант 1521_1523delCTT (выпадение трех пар нуклеотидов в положении 1521–1523 гена *CFTR*). Мутация F508del является наиболее распространенной во всех популяциях мутаций и приводит к нарушению созревания белка *CFTR* и его полному отсутствию на поверхности клеток: нарушается фолдинг белка в плазматической мембране и работа цАМФ-зависимого канала, отвечающего за регуляцию

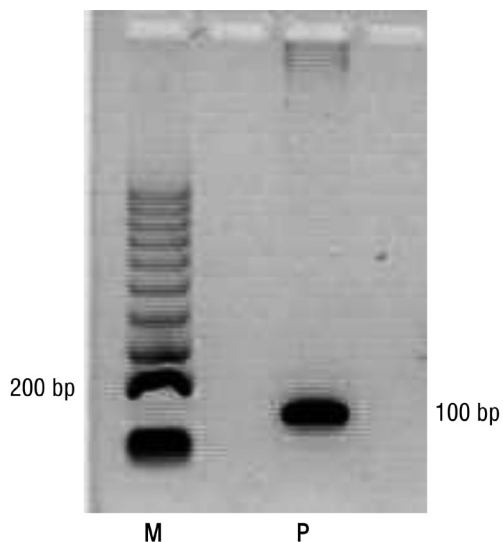


Рис. 1. Визуализация амплифицированного участка 10-го экзона гена *CFTR*. P – электрофореграмма ПЦР-продукта; M – электрофорез маркерных ДНК-фрагментов (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

Fig. 1. Visualization of amplified region 10 of the exon of the *CFTR* gene. P – electrophoregram of the PCR product; M – electrophoresis of marker DNA fragments (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

последовательности разной нуклеотидной структуры, что выражается в наложении (перекрывании) спектральных профилей (рис. 2).

Характер различий нуклеотидной структуры последовательностей связан не с отдельными нуклеотидными заменами, а с делецией/инсерцией нуклеотидных оснований, что приводит к смещению структуры последовательностей при их сопоставлении. Визуальным выражением такого явления на электрофореграммах является наличие начального участка с «чистыми» неперекрывающимися спектральными профилями и следующим за ним участком со «смешанными» перекрывающимися спектральными профилями (наложение пиков разной окраски).

Биоинформационный анализ электрофореграмм показал, что спектральное перекрытие обусловлено делецией/инсерцией размером в три нуклеотидных основания. Таким образом, спектральные пики более длинной цепи (последовательности) на электрофореграмме были постоянно смещены (по мере возрастания порядкового номера последовательности) на три нуклеотидные позиции относительно аналогичных позиций, представленных в короткой цепи.

Сравнительный анализ с депонентами базы данных NCBI Blast позволил установить, что в одной из последовательностей отмечалась делеция трех нуклеотидов «СТТ», соответствующая

транспорта ионов хлора и натрия через мембраны эпителиальных клеток легких, поджелудочной железы и ЖКТ, репродуктивной системы и печени. Мутации в гене *CFTR* приводят к нарушению процесса секреции, вследствие чего секреты желез становятся вязкими и их выделение затрудняется, что приводит к патологическим изменениям в жизненно важных органах.

Результаты секвенирования анализировали в программном обеспечении Sequencing Analysis 5.1.1 (Applied Biosystems, США).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей. Полученные последовательности анализировали путем их сравнения с последовательностью из базы данных GenBank, используя пакет программ BLAST.

Согласно проведенному анализу, исследуемая нуклеотидная последовательность может быть идентифицирована как нуклеотидная последовательность гена *CFTR* на основании 90 %-ного сходства (максимальная идентичность – 90 %).

Результаты секвенирования гена *CFTR*. Предварительный анализ данных секвенирования в программном обеспечении Sequencing Analysis 5.1.1 (Applied Biosystems) показал, что образец электрофореграммы является смешанным, т. е. содержит одновременно последовательности разной нуклеотидной структуры, что выражается в наложении (перекрывании)

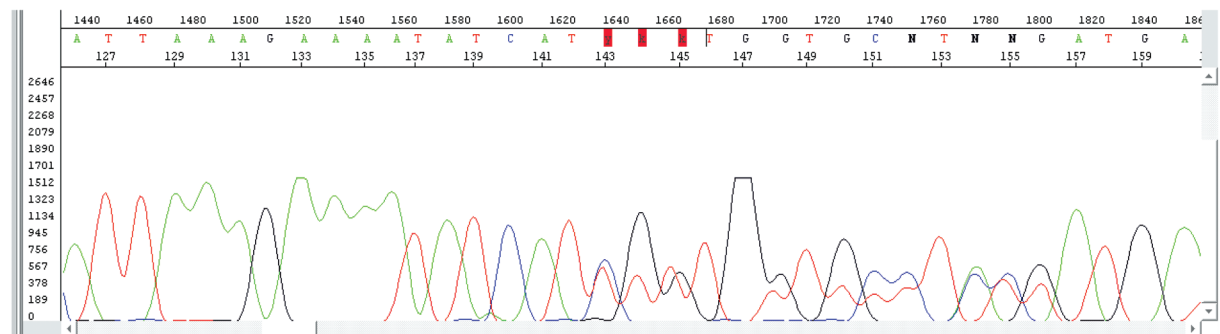


Рис. 2. Данные, полученные в результате автоматического секвенирования по Сенгеру

Fig. 2. Data obtained as a result of automatic sequencing of the *CFTR* gene by SangerExon

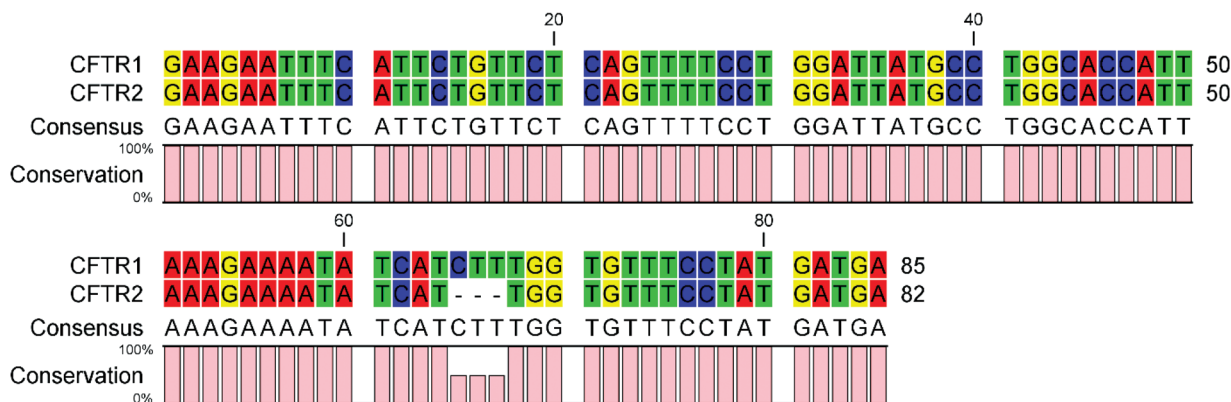


Рис. 3. Расшифровка полученной нуклеотидной последовательности двойной цепи ДНК больного муковисцидозом в области 10-го экзона гена *CFTR*

Fig. 3. Decryption of the obtained nucleotide sequence of the double DNA chain of a patient with cystic fibrosis from 10 exons of the *CFTR* gene

мутации F508del (муковисцидоз) – номер в базе данных NCBI rs113993960. Вторая последовательность характеризовалась отсутствием данной делеции и соответствовала аллелю дикого типа (норма). Таким образом, в случае происхождения последовательностей от одного биологического образца (одного и того же индивида) генотип данного образца по изученному локусу (10-й экзон гена *CFTR*) является гетерозиготным и описывается как CFTR-E10^N/CFTR-E10^{F508del} (рис. 3). Следует подчеркнуть, что кроме выпадения трех пар оснований del508CTT других мутаций как в аллеле CFTR-E10^N, так и в аллеле CFTR-E10^{F508del} не выявлено, что визуально выражалось в отсутствии в «чистых» регионах электрофореграммы единичных налагающихся друг на друга пиков разной окраски при секвенировании как с праймером 10F, так и с праймером 10R.

Заключение. Таким образом, можно сделать заключение, что данный пациент является компаундной гетерозиготой в отношении мутации в гене *CFTR*. Одна из двух мутаций в гене является известной мутацией F508del, локализованной в 10-м экзоне гена и приводящей к выпадению аминокислоты фенилаланина в 508-м положении транспортного белка, а локализация другой неизвестна. Последняя может находиться в пределах всего гена *CFTR* и совместно с F508del приводит к фенотипическому проявлению заболевания. Функциональные классы мутаций *CFTR* могут только частично объяснить связь между генотипом и фенотипом. Так, у пациентов с двумя мутациями классов I–III имеется тенденция к проявлению фенотипа, связанного с недостаточностью поджелудочной железы (PI), более высокой частотой мекониевого илеуса, более ухудшенной функцией легких, тяжелой болезнью печени и ранней смертностью. Мутации классов IV–VI обычно связаны с более легким проявлением болезни, более длительной продолжительностью жизни и достаточностью поджелудочной железы (PS) и являются фенотипически доминантными, когда встречаются в комбинациях с мутациями классов I–III. Тем не менее, гетерогенность клинических проявлений у людей с одинаковыми генотипами *CFTR* указывает на то, что тяжесть заболевания модулируется другими генами и факторами окружающей среды. Так, для мутации F508del характерны смешанная форма заболевания, а также быстрое прогрессирование бронхолегочного процесса, частое инфицирование грамотрицательной флорой и формирование цирроза печени, что наблюдается у больного П.

Полученные данные могут быть использованы в дальнейшем для коррекции мутации с помощью системы редактирования CRISPR/Cas9.

Благодарности. Авторы выражают благодарность докторам биологических наук Владимиру Евгеньевичу Падутову и Олегу Юрьевичу Баранову (Институт леса НАН Беларуси), а также кандидату биологических наук Станиславу Викторовичу Пантелееву (Институт леса НАН Беларуси) за помощь в анализе экспериментальных данных.

Aknowledgements. The authors are grateful to the doctors of biological sciences Vladimir Evgenievich Padutov and Oleg Yuryevich Baranov (Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus), as well as candidate of biological sciences Stanislav Viktorovich Panteleev (Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus) for their help in the analysis of experimental data.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA / R. Riordan [et al.] // *Science*. – 1989. – Vol. 245, N 4922. – P. 1066–1073. <https://doi.org/10.1126/science.2475911>
2. Mutation analysis and haplotype correlation for 139 cystic fibrosis patients from the Nebraska Regional Cystic Fibrosis Center / M. D. Traystman [et al.] // *Human Mutation*. – 1993. – Vol. 2, N 1. – P. 7–15. <https://doi.org/10.1002/humu.1380020103>
3. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations / G. Veit [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. – 2016. – Vol. 27, N 3. – P. 424–433. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0935>
4. Correction of the $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by zinc-finger nuclease homology-directed repair / C. M. Lee [et al.] // *BioRes. Open Access*. – 2012. – Vol. 1, N 3. – P. 99–108. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0218>
5. Tsui, L.-C. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective / L.-C. Tsui, R. Dorfman // *Cold Spring Harbor Perspectives Med*. – 2013. – Vol. 3, N 2. – P. a009472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009472>
6. Экспериментальные подходы к таргетному редактированию гена *CFTR* с помощью CRISPR/Cas9 / С. А. Смирнихина [и др.] // *Вестн. Рос. гос. мед. ун-та*. – 2018. – № 2. – С. 15–21. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.022>
7. Лагодич, А. В. Методы анализа нуклеиновых кислот : учеб.-метод. пособие / А. В. Лагодич, О. В. Лагодич. – Минск : БГУ, 2013. – 47 с.

References

1. Riordan J. R., Rommens, J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z. [et al.]. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989, vol. 245, no. 4922, pp. 1066–1073. <https://doi.org/10.1126/science.2475911>
2. Traystman M. D., Schulte N., Colombo J. L., Sammut P. H., Reilly P., Patel Ch. [et al.]. Mutation analysis and haplotype correlation for 139 cystic fibrosis patients from the Nebraska Regional Cystic Fibrosis Center. *Human Mutation*, 1993, vol. 2, no. 1, pp. 7–15. <https://doi.org/10.1002/humu.1380020103>
3. Veit G., Avramescu R. G., Chiang N. Ch., Houck S. A., Cai Z., Peters K. W. [et al.]. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, vol. 27, no. 3, pp. 424–433. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0935>
4. Lee C. M., Flynn R., Hollywood J. A., Scallan M. F., Harrison P. T. Correction of the $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by zinc-finger nuclease homology-directed repair. *BioResearch Open Access*, 2012, vol. 1, no. 3, pp. 99–108. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0218>
5. Tsui L.-C., Dorfman R. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, vol. 3, no. 2, p. a009472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009472>
6. Smirnikhina S. A., Anuchina A. A., Kochergin-Nikitsky K. S., Adilgereeva E. P., Yakushina V. D., Lavrov A. V. Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2018, no. 2, pp. 14–20. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.022>
7. Lagodich A. V., Lagodich O. V. *Nucleic acid analysis methods: a training manual*. Minsk, Publishing House of the Belarusian State University, 2013. 47 p. (in Russian).

Информация об авторах

Ермоленко Дарья Андреевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ermolenko_darya94@gmail.ru

Мисюкевич Алла Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru

Полешко Анна Григорьевна – ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: renovasio888@yandex.ru

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovskiy@yahoo.com

Information about the authors

Darya A. Ermolenko – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ermolenko_darya_94@gmail.ru

Alla Y. Misyukevich – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru

Anna G. Poleshko – Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: renovasio888@yandex.ru

Igor D. Volotovskiy – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovskiy@yahoo.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 581.174:582.263:546.712

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-299-309>

Поступила в редакцию 09.03.2020

Received 09.03.2020

И. А. Ильючик, В. Н. Никандров

Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь

**ДИНАМИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В КУЛЬТУРЕ
ВОДРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* ШТАММА С 111 IBCE C-19 ПРИ РОСТЕ
НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ С ДОБАВЛЕНИЕМ ХЛОРИДА МАРГАНЦА**

Аннотация. Изучено влияние добавления в питательную среду хлорида марганца (II) в концентрации 0,01–25,0 мг/л на уровень хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в клетках *Chlorella vulgaris* штамма С 111 IBCE C-19 при культивировании на протяжении 40 сут. Установлено, что динамика уровня всех трех фотосинтетических пигментов носит колебательный характер и в целом однотипна. При использовании всех вариантов питательной среды выявлены выраженные сдвиги содержания пигментов фотосинтеза на 7–10, 22–28 и 28–34-е сутки. В отдельных случаях в дополнение к указанным выявлены и другие сдвиги. Данная картина согласуется с описанной ранее для содержания внутриклеточного белка и подтверждает наличие функционально-метаболических перестроек клеток хлореллы в динамике роста культуры. Судя по состоянию фонда фотосинтетических пигментов, клетки культуры хлореллы остаются в метаболически активном состоянии и через 40 сут после начала их культивирования.

Ключевые слова: микроводоросль, фотосинтетические пигменты, хлорид марганца (II), функционально-метаболические перестройки

Для цитирования: Ильючик, И. А. Динамика фотосинтетических пигментов в культуре водоросли *Chlorella vulgaris* штамма С 111 IBCE C-19 при росте на питательной среде с добавлением хлорида марганца / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 299–309. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-299-309>

Irina A. Plyuchyk, Vitaliy N. Nikandrov

Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

**DYNAMICS OF A PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS LEVEL OF THE *CHLORELLA VULGARIS*
STRAIN C 111 IBCE C-19 DURING THE GROWTH AT THE NUTRIEN MEDIUM
WITH MANGANESE CHLORIDE ADDITION**

Abstract. The effect of the manganese (II) chloride addition at concentrations of 0.01–25.0 mg/l in the nutrient medium on chlorophylls *a*, *b* and carotenoids in *Chlorella vulgaris* cells of C 111 IBCE C-19 strain was studied during cultivation for 40 days. It was found, that the dynamics of all three photosynthetic pigments was possessed fluctuating character and, in general, was the same type. Using all versions of nutrient medium, marked shifts in content of photosynthesis pigments on 7–10, 22–28 and 28–34 days were revealed. In some cases, additional changes to above mentioned ones have been identified. The pattern found was generally the same as described earlier for intracellular protein content and confirms the presence of functional metabolic reorganizations of the chlorella cells in the growth dynamics of the culture. According to the state of the photosynthetic pigments, the cells of the chlorella culture remain in the metabolically active state even of 40 days after the beginning of cultivation.

Keywords: microalgae, photosynthetic pigments, manganese (II) chloride, functional-metabolic rearrangements

For citation: Plyuchyk I. A., Nikandrov V. N. Dynamics of a photosynthetic pigments level of the *Chlorella vulgaris* strain C 111 IBCE C-19 during the growth at the nutrient medium with manganese chloride addition. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 299–309 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-299-309>

Введение. Одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella* благодаря ее широкому распространению в природе, относительно простой организации, большой скорости размножения, возможности культивирования в лабораторных условиях и высокой пластичности метаболизма нашла применение в промышленной биотехнологии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности (например, при очистке сточных вод, биологическом и токсикологическом контроле воды, получении топлива и др.) [1–6].

США, Япония, Китай, Тайвань и Индонезия производят более 2500 т высушенной хлореллы в год [7]. Она является одним из перспективных возобновляемых ресурсов органического сырья [8], так как способна превращать 9–10 % солнечной энергии в биомассу, выход которой теоретически составляет около 280 т/га в год [9]. Для хлореллы характерна более высокая, чем у традиционных сельскохозяйственных культур, эффективность фотосинтеза [10]. Она способна улавливать более 70 % солнечного света, тогда как для большинства высших растений этот показатель составляет до 3 %, при этом 1 кг хлореллы выделяет в сутки до 270 л кислорода [11]. Около 60 % хлорофилла, содержащегося в водоросли, входит в состав белков [12].

Минеральное питание растений – один из существенных факторов реализации фотохимической активности хлоропластов [13]. Марганец является истинным биоэлементом и поступает в клетки в форме ионов Mn^{2+} [14]. Он необходим для фоторазложения воды с выделением кислорода и восстановления CO_2 при фотосинтезе. Марганец способствует увеличению содержания сахаров у растений и их оттоку из листьев. Два энзима цикла Кребса – малатдегидрогеназа и изоцитратдегидрогеназа активируются ионами марганца. Последний необходим также для функционирования нитратредуктазы при восстановлении нитратов и является кофактором РНК-полимеразы и ауксиноксидазы, разрушающей 3-индолилуксусную кислоту [15]. Быстро проникая в клетки, он способствует значительному увеличению интенсивности фотосинтеза, участвуя в окислении, существенно активизирует полный круг метаболических реакций [16].

Недостаток марганца у фотосинтезирующих микроорганизмов тормозит деление клеток, вызывая нарушение их физиологических функций, сопровождающееся деструкцией структуры хлоропластов (например, уменьшаются межгнанные ламеллы, в строме появляются пустоты, у дисков гранов проявляется тенденция к разрушению) [17].

Для фотосинтеза одноклеточных зеленых водорослей (*Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*) необходимо небольшая концентрация Mn^{2+} [18]. При его дефиците у хлореллы образуются неестественно большие клетки неправильной формы, а на полностью освобожденной от марганца среде почти прекращается рост водорослей [19].

Данные литературы об оптимальных концентрациях марганца в питательной среде крайне разнородны. Несмотря на длительное изучение, в литературе недостаточно информации о влиянии Mn^{2+} на физиолого-биохимическое состояние клетки хлореллы, в частности на процессы фотосинтеза. Да и механизм его биологического действия еще далек от исчерпывающей ясности [20].

Ранее нами [21, 22] при культивировании *Ch. vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 на питательной среде, содержащей $MnCl_2$ в широком диапазоне концентраций, было выявлено несколько функционально-метаболических перестроек культуры, выражающихся в изменении скорости накопления биомассы, уровня внутриклеточного белка и протеолитической активности клеток. Установлено, что и сдвиги протеолитической активности носят колебательный характер. Эти обстоятельства диктуют необходимость выяснения динамики уровня фотосинтетических пигментов хлореллы в аналогичных условиях.

Цель работы – раскрыть особенности динамики накопления фотосинтетических пигментов в клетках зеленой микроводоросли *Ch. vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на альгологически чистом штамме *Chlorella vulgaris* С 111 ИВСЕ С-19, полученном из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Микроводоросль выращивали на среде Тамия [23], не содержащей этилендиаминтетрауксусной кислоты. В контрольном варианте соль марганца ($MnCl_2$) отсутствовала. В остальные варианты дополнительно вносили $MnCl_2$ «хч» до конечной концентрации 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,500; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 и 25,0 мг/л. Культивирование проводили в прозрачных сосудах объемом 0,25 л, при толщине слоя 7 см, температуре 23 °С, непрерывном барботировании суспензии воздухом со скоростью 20–25 л/ч, чередовании световых и темновых фаз – 12 ч/12 ч, освещенности на поверхности сосуда 86 мкЭ/м·с, которую регистрировали с помощью люксметра Ю-116. Для перехода от освещенности в люксах к энергетическим единицам использовали коэффициент

перехода: $1000 \text{ лк} = 17,2 \text{ мкЭ/м}\cdot\text{с}$ [24]. Посевная доза составляла $7,8 \pm 0,7$ млн/мл клеток. Концентрацию клеток хлореллы определяли визуально с помощью камеры Горяева.

На 1, 4, 7, 10, 13, 16, 22, 28, 34 и 40-е сутки отбирали аликвоты культуры, содержащие по $50 \pm 0,43$ млн клеток, отделяли их путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 10 мин, трижды отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой. Образцы клеток замораживали и хранили при температуре -20°C .

Для определения содержания пигментов в процессе роста культуры хлореллы (40 сут культивирования) использовали ацетоновые экстракты ее клеток. Для этого три параллельные аликвоты по $50 \pm 0,43$ млн клеток хлореллы измельчали в гомогенизаторе Поттера–Эльвейема при 4°C в 0,5 мл бидистиллированной воды и CaCO_3 , как описано в работе [25]. Затем в гомогенат добавляли холодный ацетон «хч», содержимое встряхивали, центрифугировали при 4000 об/мин 2 мин при 4°C , надосадочную жидкость, которая представляла собой вытяжку пигментов, быстро переливали в кварцевую кювету и спектрофотометрировали. Процедуру повторяли до полного обесцвечивания осадка.

Для количественных определений хлорофиллов и каротиноидов полученный экстракт фотометрировали при длинах волн, соответствующих максимуму абсорбции пигментов, – 663 нм (хлорофилл *a*), 645 нм (хлорофилл *b*), 630 нм (хлорофилл *c*), 470 нм (каротиноиды) и 750 нм. Последний максимум абсорбции использовали для введения поправки на неспецифическую абсорбцию и рассеяние света экстрактом. Концентрацию (мг/л) исследуемых пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) в клетках хлореллы определяли по формулам Н. К. Lichtenthaler при экстрагировании пигментов в 80 %-ном ацетоне [26], хлорофилла *c* – по формуле, рекомендованной рабочей группой № 17 при ЮНЕСКО [25]. Расчет концентраций пигментов (мг/млн клеток) производили по формуле $F = CV/X$, где F – концентрация пигмента в клетках культуры, мг/млн клеток; C – концентрация пигмента, мг/л; V – объем экстракта, л; X – количество взятых для исследования клеток хлореллы, млн.

Пигментный индекс Маргалефа находили как соотношение ацетоновых экстрактов общих каротиноидов к хлорофиллу *a* ($C_{\text{car}}/C_{\text{chl } a}$) [27].

Все операции при гомогенизации и спектрофотометрировании выполняли в затемненном помещении. Исследования проведены 9-кратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что клетки данного штамма хлореллы не содержат хлорофилл *c* (он не выявлен во всех исследуемых нами образцах), что согласуется с данными литературы [25].

В контрольном варианте за весь период культивирования концентрация хлорофилла *a* возросла в 3,07 раза (см. таблицу, рисунок). Динамика его уровня в интервале 1–22 сут, в принципе, приближалась к линейной зависимости, что в целом согласуется с ранее описанной линейной динамикой накопления биомассы [21]. Однако, в отличие от последней, через 28 сут концентрация хлорофилла *a* падала на 36 %, но вновь возрастала в последующий период культивирования, достигая максимума в конце культивирования.

Концентрации этого пигмента в контрольном варианте отличались от таковых внутриклеточного белка. Примечательно, что уровень внутриклеточного белка в период с 1-х по 4-е сутки снижался на 34 % [21]. Возможно, этот сдвиг отражает адаптацию культуры к среде. На 1–7-е сутки роста культуры концентрация хлорофилла *a* в клетках контрольного варианта возросла на 86 %. К 10-м суткам уровень его несущественно снизился (–15 %), а начиная с 13-х до 22-х суток включительно значение этого показателя увеличилось на 63 % в сравнении с таковым на 10-е сутки. На 28-е сутки уровень пигмента вновь падал на 36 %, но к концу культивирования практически не отличался от такового на 22-е сутки. В данном случае снижения уровня пигмента в 1–4-е сутки роста культуры не наблюдалось, но отмечалось через 28 сут роста, что отличалось от динамики внутриклеточного белка, концентрация которого заметно возросла [21].

Добавление в питательную среду соли марганца во всем диапазоне концентраций уже через 24 ч вызвало увеличение содержания хлорофилла *a* на 54–127 % с максимумом при концентрации эффектора 0,1 мг/л.

Концентрация пигментов в клетках хлореллы при добавлении в питательную среду хлорида марганца, соотношение хлорофиллов *a/b* и пигментный индекс Маргалефа

The concentration of pigments in chlorella cells and Margalef pigment index when manganese chloride was added to the nutrient medium, the ratio of chlorophylls *a/b*

Концентрация Mn^{2+} , мг/л	Концентрация пигментов, мг/млн клеток			$C_{chl\ a}/C_{chl\ b}$	Пигментный индекс Маргалефа
	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Каротиноиды		
<i>1-е сутки</i>					
Контроль	40,24 ± 1,55	18,88 ± 0,72	12,48 ± 0,32	2,13	0,31
0,010	76,38 ± 2,28*	26,67 ± 0,95*	20,07 ± 1,60*	2,86	0,26
0,025	81,67 ± 2,98*	32,61 ± 0,74*	22,21 ± 1,07*	2,50	0,27
0,050	82,94 ± 3,75*	31,97 ± 0,91*	24,05 ± 1,06*	2,59	0,29
0,100	91,50 ± 2,53*	32,73 ± 0,91*	23,01 ± 0,83*	2,80	0,25
0,500	88,01 ± 1,07*	33,64 ± 0,84*	22,29 ± 0,52*	2,62	0,25
1,000	76,35 ± 2,72*	25,87 ± 0,92*	20,05 ± 0,56*	2,95	0,26
2,500	77,80 ± 2,77*	27,28 ± 0,14*	19,30 ± 0,52*	2,85	0,25
5,000	75,46 ± 0,86*	26,39 ± 0,94*	19,46 ± 0,86*	2,86	0,26
10,000	64,18 ± 1,78*	21,02 ± 0,72	14,27 ± 0,52*	3,05	0,22
25,000	62,15 ± 1,61*	26,93 ± 0,93*	17,56 ± 0,43*	2,31	0,28
<i>4-е сутки</i>					
Контроль	55,81 ± 0,31	24,72 ± 0,92	22,84 ± 0,30	2,26	0,41
0,010	86,60 ± 1,01*	30,31 ± 1,03*	21,99 ± 0,14	2,86	0,25
0,025	100,62 ± 0,84*	35,83 ± 0,27*	23,97 ± 0,07	2,81	0,24
0,050	89,46 ± 1,46*	29,19 ± 0,97*	21,63 ± 0,43	3,06	0,24
0,100	96,26 ± 1,57*	32,05 ± 1,13*	23,35 ± 0,86	3,00	0,24
0,500	98,84 ± 1,79*	32,79 ± 1,25*	23,87 ± 0,28	3,01	0,24
1,000	97,46 ± 0,49*	33,22 ± 0,41*	23,56 ± 0,97	2,93	0,24
2,500	93,89 ± 2,78*	31,48 ± 1,12*	22,76 ± 1,62	2,98	0,24
5,000	93,63 ± 1,75*	31,32 ± 1,32*	21,99 ± 2,20	2,99	0,23
10,000	93,01 ± 2,25*	32,50 ± 1,12*	21,56 ± 0,65	2,86	0,23
25,000	91,82 ± 1,69*	29,32 ± 1,71*	22,13 ± 1,46	3,13	0,24
<i>7-е сутки</i>					
Контроль	87,64 ± 0,46	34,75 ± 0,12	21,95 ± 0,43	2,52	0,25
0,010	166,51 ± 0,85*	67,02 ± 0,42*	41,68 ± 0,54*	2,48	0,25
0,025	164,30 ± 1,29*	64,79 ± 0,84*	43,70 ± 0,60*	2,54	0,27
0,050	153,58 ± 1,22*	59,90 ± 0,88*	37,35 ± 0,03*	2,56	0,24
0,100	132,72 ± 3,25*	54,42 ± 2,21*	32,10 ± 1,51*	2,44	0,24
0,500	153,94 ± 2,10*	62,36 ± 0,95*	36,99 ± 1,41*	2,47	0,24
1,000	153,51 ± 3,75*	58,41 ± 0,96*	36,43 ± 0,86*	2,63	0,24
2,500	142,78 ± 0,38*	53,46 ± 1,14*	33,92 ± 0,97*	2,67	0,24
5,000	105,05 ± 3,74*	37,57 ± 1,17	25,66 ± 1,92*	2,80	0,24
10,000	106,83 ± 1,83*	36,27 ± 0,99	24,63 ± 1,32*	2,81	0,23
25,000	103,77 ± 2,48*	37,11 ± 1,08	27,68 ± 0,45*	2,80	0,27
<i>10-е сутки</i>					
Контроль	74,78 ± 0,91	22,96 ± 1,06	17,34 ± 0,97	3,26	0,23
0,010	133,97 ± 2,97*	54,18 ± 0,21*	32,99 ± 0,58*	2,47	0,25
0,025	105,90 ± 4,63*	40,94 ± 1,43*	28,58 ± 0,45*	2,59	0,27
0,050	104,84 ± 0,84*	39,91 ± 0,24*	26,51 ± 0,29*	2,63	0,25
0,100	97,26 ± 2,15*	35,55 ± 0,97*	25,25 ± 2,17*	2,74	0,26
0,500	116,22 ± 3,84*	45,16 ± 2,04*	30,39 ± 2,40*	2,57	0,26
1,000	93,18 ± 1,75*	35,83 ± 1,02*	26,69 ± 2,25*	2,60	0,29
2,500	92,63 ± 1,68*	33,87 ± 1,32*	25,72 ± 1,06*	2,73	0,28
5,000	93,38 ± 1,27*	34,80 ± 1,29*	23,70 ± 1,18*	2,68	0,25
10,000	103,88 ± 3,38*	37,22 ± 2,17*	24,95 ± 1,35*	2,79	0,24
25,000	92,37 ± 1,51*	33,89 ± 1,42*	21,33 ± 1,09*	2,73	0,23
<i>13-е сутки</i>					
Контроль	90,97 ± 1,08	33,62 ± 1,08	24,57 ± 2,71	2,71	0,27
0,010	105,82 ± 2,48*	39,37 ± 0,92*	27,32 ± 2,10	2,69	0,26
0,025	92,72 ± 1,48	34,23 ± 0,81	25,03 ± 1,11	2,71	0,27

Продолжение таблицы

Концентрация Mn^{2+} , мг/л	Концентрация пигментов, мг/млн клеток			$C_{chl a} / C_{chl b}$	Пигментный индекс Маргалефа
	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Каротиноиды		
<i>13-е сутки</i>					
0,050	98,00 ± 1,84	41,77 ± 0,74*	27,92 ± 1,00*	2,35	0,28
0,100	119,31 ± 3,78*	45,01 ± 0,97*	31,30 ± 2,81*	2,65	0,26
0,500	157,18 ± 2,36*	58,73 ± 1,91*	41,90 ± 3,72*	2,68	0,27
1,000	121,85 ± 3,43*	47,33 ± 1,24*	33,49 ± 3,32*	2,57	0,27
2,500	155,22 ± 2,36*	59,06 ± 0,81*	43,10 ± 0,90*	2,63	0,28
5,000	154,54 ± 2,67*	58,63 ± 0,63*	41,26 ± 1,81*	2,64	0,27
10,000	147,75 ± 2,07*	57,59 ± 1,82*	39,12 ± 1,72*	2,57	0,26
25,000	119,11 ± 1,34*	46,70 ± 1,71*	30,46 ± 2,64*	2,55	0,26
<i>16-е сутки</i>					
Контроль	106,14 ± 1,17	45,56 ± 0,85	27,83 ± 0,22	2,71	0,26
0,010	154,72 ± 1,22*	57,55 ± 0,94*	40,26 ± 0,10*	2,69	0,26
0,025	174,11 ± 2,77*	70,23 ± 0,42*	46,35 ± 0,22*	2,71	0,27
0,050	123,72 ± 1,70*	48,00 ± 0,71	31,29 ± 0,22*	2,35	0,25
0,100	121,43 ± 3,83*	47,27 ± 0,15	32,95 ± 0,34*	2,65	0,27
0,500	157,30 ± 0,83*	57,29 ± 0,72*	40,23 ± 0,13*	2,68	0,26
1,000	167,64 ± 2,45*	70,48 ± 0,68*	44,94 ± 0,74*	2,57	0,27
2,500	156,28 ± 2,47*	64,79 ± 0,34*	39,53 ± 0,09*	2,63	0,25
5,000	155,99 ± 3,03*	64,11 ± 1,08*	42,67 ± 0,10*	2,64	0,27
10,000	127,14 ± 1,24*	48,55 ± 1,14	29,15 ± 0,23	2,57	0,23
25,000	169,07 ± 2,00*	67,94 ± 0,24*	42,76 ± 0,77*	2,55	0,25
<i>22-е сутки</i>					
Контроль	121,67 ± 2,20	50,69 ± 0,29	32,74 ± 0,41	2,40	0,27
0,010	182,30 ± 1,73*	78,10 ± 1,17*	41,93 ± 0,38*	2,33	0,23
0,025	183,12 ± 1,67*	73,98 ± 0,14*	45,15 ± 0,20*	2,48	0,25
0,050	166,33 ± 3,45*	67,96 ± 1,03*	42,48 ± 0,11*	2,45	0,26
0,100	176,65 ± 4,67*	71,77 ± 0,24*	43,30 ± 0,22*	2,46	0,25
0,500	152,74 ± 2,23*	56,92 ± 0,86*	37,90 ± 0,50*	2,68	0,25
1,000	98,33 ± 0,76*	33,23 ± 0,16*	22,22 ± 0,44*	2,96	0,23
2,500	90,17 ± 2,52*	31,80 ± 0,29*	20,80 ± 0,63*	2,84	0,23
5,000	87,01 ± 1,08*	30,29 ± 0,18*	20,62 ± 0,38*	2,87	0,24
10,000	92,63 ± 1,97*	29,90 ± 0,76*	18,67 ± 0,21*	3,10	0,20
25,000	89,93 ± 1,02*	28,09 ± 0,12*	18,02 ± 0,64*	3,20	0,20
<i>28-е сутки</i>					
Контроль	77,85 ± 0,22	29,81 ± 0,33	23,77 ± 0,03	2,61	0,31
0,010	81,04 ± 1,84	29,67 ± 1,13	21,97 ± 0,48	2,73	0,27
0,025	203,50 ± 4,90*	91,24 ± 1,46*	50,84 ± 0,65*	2,23	0,25
0,050	93,80 ± 1,27*	33,24 ± 1,81	21,73 ± 0,97	2,82	0,23
0,100	81,34 ± 0,97	31,55 ± 0,72	21,62 ± 0,91	2,58	0,27
0,500	85,39 ± 1,74	31,59 ± 0,42	22,87 ± 0,86	2,70	0,27
1,000	185,35 ± 3,08*	81,28 ± 1,51*	41,36 ± 0,98*	2,28	0,22
2,500	152,11 ± 2,29*	59,98 ± 0,39*	32,66 ± 0,25*	2,54	0,21
5,000	155,15 ± 1,21*	54,26 ± 0,27*	37,50 ± 0,07*	2,86	0,24
10,000	137,99 ± 3,28*	54,45 ± 0,61*	25,55 ± 0,53	2,53	0,19
25,000	145,12 ± 2,48*	55,74 ± 0,93*	31,08 ± 0,08*	2,60	0,21
<i>34-е сутки</i>					
Контроль	107,49 ± 1,61	31,57 ± 0,26	31,40 ± 0,02	3,41	0,29
0,010	168,60 ± 3,25*	70,40 ± 1,16*	44,37 ± 0,43*	2,39	0,26
0,025	120,49 ± 2,78*	45,75 ± 0,59*	34,38 ± 0,42	2,63	0,29
0,050	140,74 ± 3,73*	53,88 ± 0,35*	40,67 ± 0,84*	2,61	0,29
0,100	124,00 ± 3,94*	46,44 ± 0,74*	35,92 ± 0,71*	2,67	0,29
0,500	127,66 ± 2,77*	49,24 ± 0,14*	37,75 ± 0,43*	2,59	0,30
1,000	129,57 ± 1,86*	48,85 ± 0,25*	32,90 ± 0,08	2,65	0,25
2,500	109,77 ± 1,59	31,20 ± 0,94	29,03 ± 0,65	3,52	0,26
5,000	124,01 ± 3,69*	42,93 ± 0,27*	32,33 ± 0,63	2,89	0,26
10,000	177,95 ± 2,78*	68,29 ± 0,16	37,40 ± 0,76*	2,61	0,21
25,000	118,34 ± 0,82	39,26 ± 0,66*	28,29 ± 0,09	3,01	0,24

Окончание таблицы

Концентрация Mn^{2+} , мг/л	Концентрация пигментов, мг/млн клеток			$C_{chl a} / C_{chl b}$	Пигментный индекс Маргалефа
	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Каротиноиды		
<i>40-е сутки</i>					
Контроль	123,73 ± 1,01	43,91 ± 0,36	30,91 ± 0,85	2,82	0,25
0,010	212,29 ± 3,06*	102,63 ± 2,01*	54,72 ± 0,96*	2,07	0,26
0,025	173,87 ± 1,78*	68,28 ± 1,81*	45,70 ± 0,42*	2,55	0,26
0,050	131,89 ± 1,57	53,52 ± 0,25*	35,51 ± 0,65*	2,46	0,27
0,100	138,79 ± 1,34*	68,14 ± 0,38*	37,82 ± 0,18*	2,04	0,27
0,500	146,89 ± 1,87*	63,01 ± 1,06*	46,87 ± 0,80*	2,33	0,32
1,000	183,09 ± 3,40*	70,72 ± 1,14*	46,78 ± 0,64*	2,59	0,26
2,500	185,01 ± 3,13*	68,24 ± 0,17*	47,12 ± 0,18*	2,71	0,25
5,000	195,54 ± 2,11*	78,99 ± 2,30*	51,82 ± 0,77*	2,48	0,27
10,000	184,39 ± 0,85*	71,59 ± 1,78*	43,61 ± 0,04*	2,58	0,24
25,000	125,57 ± 2,34	45,98 ± 0,29	30,34 ± 0,39	2,73	0,24

Примечание. * – изменения статистически достоверны при $p \leq 0,05$.

Более того, введение в питательную среду $MnCl_2$ сопровождалось сложной, колебательного характера, динамикой уровня данного пигмента фотосинтеза. Для наглядности нами дано детальное описание динамики хлорофилла *a* при росте культуры в присутствии соли марганца.

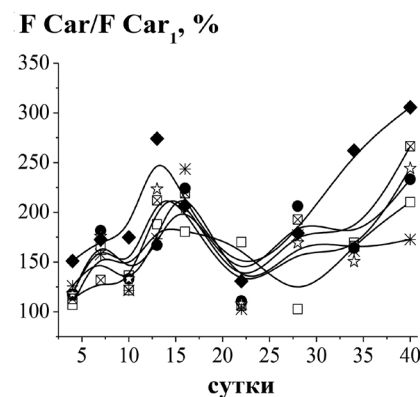
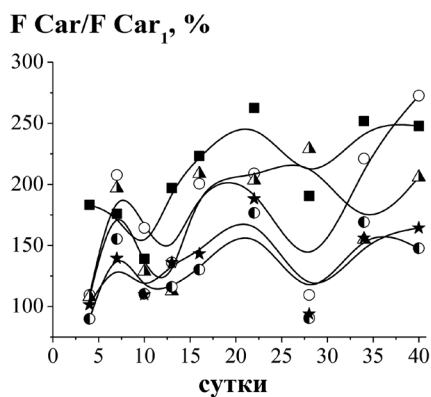
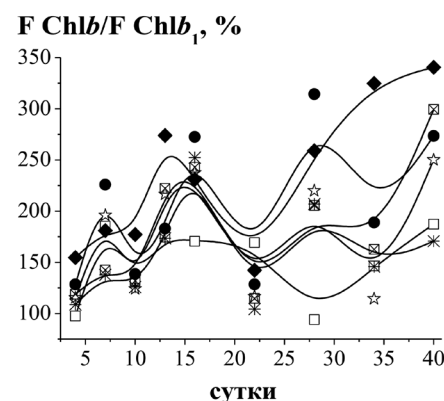
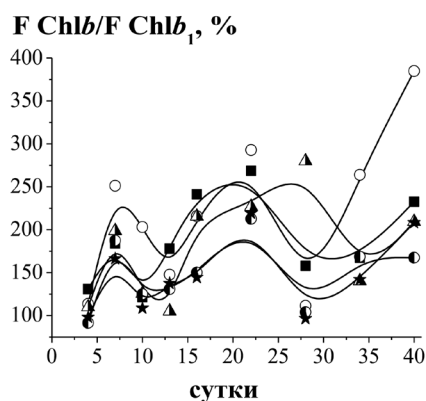
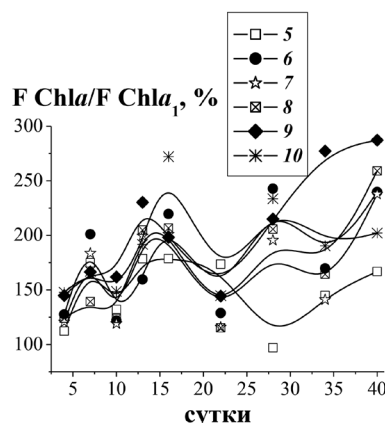
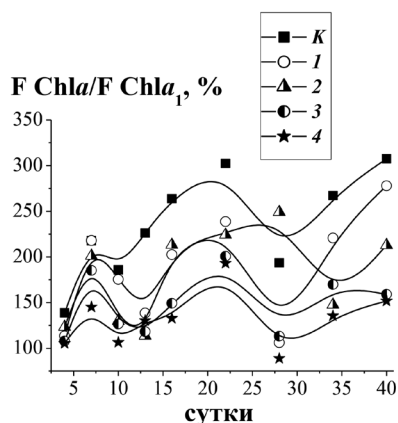
Так, при добавлении хлорида марганца во всем концентрационном диапазоне в первые 7 сут уровень хлорофилла *a* возрос на 45–118 % с максимумом при концентрации эффектора 0,01 мг/л. Снижение же этого уровня в последующий период (7–10-е сутки) составило 20–39 %, причем было слабо выраженным при трех максимальных концентрациях $MnCl_2$. Следует отметить, что при добавлении в питательную среду соли марганца в диапазоне концентраций от 1,0 до 10,0 мг/л максимум накопления хлорофилла *a* обнаружен на 40-е сутки. И лишь при концентрациях эффектора 0,025 и 25 мг/л этот максимум проявился на 28-е и 16-е сутки соответственно.

При трех же минимальных концентрациях $MnCl_2$ содержание этой формы хлорофилла продолжало снижаться или оставалось на низком уровне до 16-х суток, когда содержание хлорофилла *a* вновь увеличилось по сравнению с 13-ми сутками на 26–88 %.

В остальных случаях рост концентрации хлорофилла *a* начинался уже с 13-х суток. При этом наблюдалась сложная концентрационная зависимость. Так, при концентрации соли 0,5–2,5 мг/л после роста содержания этой формы хлорофилла к 16-м суткам наблюдалось снижение этого параметра. Причем для варианта с концентрацией эффектора 0,5 мг/л его уровень с 13-х по 16-е сутки был максимальным (178 % по отношению к началу культивирования), а при дальнейшем культивировании он снижался и вновь возрастал, не достигая уже этой величины. Для вариантов с концентрациями эффектора 1,0; 2,5 и 5,0 мг/л падение уровня хлорофилла *a* на 22-е сутки сменялось его ростом, достигая максимального значения к концу культивирования: 240, 238 и 259 % соответственно по отношению к началу культивирования. При максимальной концентрации соли марганца наибольшая величина уровня этой формы хлорофилла выявлена через 16 сут роста культуры (272 % по отношению к началу культивирования), а в дальнейшем величина этого параметра уменьшалась. Через 28 сут вновь отмечено увеличение содержания хлорофилла *a* в клетках водоросли, однако его концентрация не достигала уровня 28-х суток.

Принципиально близкая динамика с небольшими отклонениями от описанной детально выше для хлорофилла *a* наблюдалась также для хлорофилла *b* и каротиноидов. Во всех случаях выявлены выраженные сдвиги содержания пигментов фотосинтеза на 7–10, 22–28 и 28–34-е сутки. При некоторых концентрациях эффектора в питательной среде выявлены дополнительные сдвиги к указанным выше. Подобная картина отмечалась нами ранее для уровня внутриклеточного белка [21].

Пигментный состав автотрофов, как известно, характеризует состояние их фотосинтетического аппарата. И важным показателем его сбалансированной работы является соотношение форм хлорофиллов *a* и *b*, поскольку хлорофилл *a* связан с реакционными центрами фотосистем, а хлорофилл *b* – со светособирающим комплексом фотосистемы II [28]. Соотношение хлорофиллов



Динамика уровней хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в клетках культуры *Chlorella vulgaris* (% по отношению к первым суткам) при росте на питательной среде, содержащей $MnCl_2$ (концентрация $MnCl_2$, мг/л: К – контроль (без $MnCl_2$); 1 – 0,01; 2 – 0,025; 3 – 0,05; 4 – 0,1; 5 – 0,5; 6 – 1,0; 7 – 2,5; 8 – 5,0; 9 – 10,0; 10 – 25,0)

Dynamics of the chlorophylls *a*, *b* and carotenoids levels in the cells of *Chlorella vulgaris* culture (% to the first days) when growing on a nutrient medium containing $MnCl_2$ (concentration of $MnCl_2$, mg/l: К – control (without $MnCl_2$); 1 – 0.01; 2 – 0.025; 3 – 0.05; 4 – 0.1; 5 – 0.5; 6 – 1.0; 7 – 2.5; 8 – 5.0; 9 – 10.0; 10 – 25.0)

связано с активностью хлорофилла *a*: чем оно выше, тем активнее протекает фотосинтез. По данным литературы, в норме этот показатель должен соответствовать 2,2–3,0 [29]. Полученные нами соотношения форм хлорофиллов *a* и *b* лежат в пределах 2,13–3,41, что свидетельствует о высокой активности фотосинтеза. Прямой концентрационной зависимости активности фотосинтеза от ионов марганца в среде нами не наблюдалось.

Показано, хлорофилл *a* и каротиноиды являются обязательной составляющей фотосинтетического комплекса. При этом только хлорофилл *a* служит непосредственным донором энергии для реакций фотосинтеза, остальные пигменты принимают участие в процессах поглощения и миграции энергии [30], благодаря чему более полно используется свет видимой части спектра [31].

Роль каротиноидов заключается не только в выполнении функции дополнительных пигментов фотосинтеза, но и в защите хлорофилла от окисления свободными радикалами [32]. В отличие от хлорофилла *a*, каротиноиды являются более стабильными компонентами. Пигментный индекс Маргалефа ($car/chl\ a$) в известной мере отражает метаболический уровень и функциональное состояние клеток [33]. Этот показатель может колебаться в достаточно широких пределах и зависит от факторов среды, физиологического состояния фитопланктона и его видового состава. Величина данного соотношения в молодых культурах обычно невелика и, как правило, находится в пределах от 0,28 до 0,40 [34]. Принято считать, что увеличение данного индекса свидетельствует об ухудшении физиологического состояния и «старении» фитопланктона или об увеличении его пигментного разнообразия [35].

Во всех наших исследованиях пигментный индекс Маргалефа находился в границах 0,19–0,41. Это согласуется с физиологически активным состоянием микроводоросли на протяжении всего культивирования. Сопоставление этих результатов с ранее полученными данными о динамике биомассы, внутриклеточного белка позволяет увидеть различия в сроках наступления фаз «понижение–повышение», «рост–понижение» всех изучаемых показателей. Это обстоятельство дает основания полагать, что уровень биомассы, содержание белка и концентрация хлорофиллов и каротиноидов имеют довольно сложные взаимосвязи, которые не укладываются в прямые зависимости и, возможно, регулируются различными механизмами. В динамике уровня биомассы скорость ее роста во всех случаях не остается одинаковой на протяжении всего периода культивирования хлореллы [21]. Однако кинетические кривые имеют вид кривой с насыщением. Иная ситуация прослеживается в динамике белка и фотосинтетических пигментов.

Казалось бы, рост уровня фотосинтетических пигментов, предполагающий интенсификацию фотосинтеза, должен способствовать размножению клеток водоросли и увеличению биомассы. Однако этого не происходит, что позволяет предположить, что имеет место расходование определенных важных для размножения клеток компонентов питательной среды. Вместе с тем, судя по состоянию фонда фотосинтетических пигментов и накоплению внутриклеточного белка (их динамика, за исключением периода с 1-х по 4-е сутки практически однотипна), клетки культуры хлореллы остаются в метаболически активном состоянии и через 40 сут после начала культивирования.

Следует отметить, что в литературе отсутствуют материалы об изложенном выше столь детальном разборе динамики белка и фотосинтетических пигментов, а тем более суждения о причинах подобной картины. Можно предположить, что выявленные перестройки обусловлены постепенным исчерпанием одного из компонентов среды и переходом культуры на другой. Однако это требует исследования динамики потребления компонентов питательной среды культурой.

Заключение. Полученные результаты исследований подтверждают ранее сделанный вывод о наличии в культуре хлореллы структурно-метаболических перестроек. При этом периоды «спада–роста» в клетках уровня фотосинтетических пигментов практически совпадают с ранее описанными нами сдвигами концентрации внутриклеточного белка. Судя по динамике накопления внутриклеточного белка и фотосинтетических пигментов, несомненно, что даже при прекращении роста количества клеток культура остается в физиологически активном состоянии. Следовательно, подобные перестройки обусловлены постепенным исчерпанием одного из компонентов среды и переходом культуры на другой источник питания. Выяснение данного механизма предполагает дальнейшее изучение динамики компонентов питательной среды, что и составляет задачу исследований в перспективе.

Список использованных источников

1. *Chlorella* / J. Silva [et al.] // Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements / ed. : S. M. Nabavi, A. S. Silva. – London ; San Diego, 2019. – P. 187–193.
2. Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition / Y. Panahi [et al.] // Adv. Pharm. Bull. – 2019. – Vol. 9, N 2. – P. 182–194. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.022>
3. Production of amino acids and acylcarnitine by microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* from wastewater culture / J. M. Ballesteros-Torres [et al.] // Peer J. – 2019. – Vol. 7. – P. e7977. <https://doi.org/10.7717/peerj.7977>

4. Taubert, A. Glycolate from microalgae: an effective carbon source for biotechnological applications / A. Taubert, T. Jacob, C. Wilhelm // *Plant Biotechnol. J.* – 2019. – Vol. 17, N 8. – P. 1538–1546. <https://doi.org/10.1111/pbi.13078>
5. Зеленый корм для птицы круглый год / Н. В. Шалыго [и др.] // *Наука и инновации.* – 2018. – № 2. – С. 24–27.
6. Biofuel production from plant and algal biomass / R. A. Voloshin [et al.] // *Int. J. Hydrogen Energy.* – 2016. – Vol. 41, N 39. – P. 17257–17273. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.084>
7. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa* / A. G. Waghmare [et al.] // *Biores. Bioproc.* – 2016. – Vol. 3. – Art. 16. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>
8. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики / К. Н. Сорокина [и др.] // *Катализ в промышленности.* – 2012. – № 2. – С. 63–72.
9. Khan, M. I. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products / M. I. Khan, J. H. Shin, J. D. Kim // *Microb. Cell Fact.* – 2018. – Vol. 17. – Art. 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
10. Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors / A.-M. Lakaniemi [et al.] // *Microb. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 5, N 1. – P. 69–78. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00298.x>
11. Богданова, А. А. Влияние различных концентраций питательной среды на увеличение биомассы микроводоросли штамма ИФР № С-111 / А. А. Богданова, Е. А. Флерова // *Инновационные направления развития АПК и повышение конкурентоспособности предприятий, отраслей и комплексов – вклад молодых ученых : сб. науч. тр. по материалам XVI междунар. науч.-практ. конф. (Ярославль, 23–25 янв. 2013 г.) / гл. ред. П. И. Дугин.* – Ярославль, 2013. – С. 51–55.
12. Капустин, Н. К. Культивирование хлореллы и использование ее при откорме свиней в условиях БССР : автореф. дис. канд. с.-х. наук : 06.02.02 / Н. К. Капустин ; Эстон. науч.-исслед. ин-т животноводства и ветеринарии. – Тарту, 1984. – 23 с.
13. Зими́на, Ж. А. Влияние микроэлементов и препарата Гумат +7 на интенсивность фотосинтеза и накопление сухого вещества в растениях кукурузы / Ж. А. Зими́на // *Успехи совр. естествознания.* – 2006. – № 4. – С. 48–49.
14. Fisher, W. W. Manganese and the evolution of photosynthesis / W. W. Fisher, J. Cannabis, J. E. Johnson // *Orig. Life Evol. Biosph.* – 2015. – Vol. 45, N 3. – P. 351–357. <https://doi.org/10.1007/s11084-015-9442-5>
15. Физиология растений : конспект лекций [Электронный ресурс] / В. М. Гольд [и др.]. – Режим доступа : http://bio.sfu-kras.ru/files/1839_Konspekt_lekcii_Fiziologiya_rastenii.pdf. – Дата доступа : 11.02.2020.
16. Белоус, О. Г. Влияние микроэлементов на интенсивность фотосинтеза растений чая в зоне влажных субтропиков России [Электронный ресурс] / О. Г. Белоус // *Современные проблемы науки и образования.* – 2011. – № 5. – Режим доступа : <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=4919>. – Дата доступа : 08.01.2020.
17. Лукьянов, В. А. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе / В. А. Лукьянов, А. И. Стифеев. – Курск : Изд-во Кур. гос. с.-х. акад., 2014. – 181 с.
18. Pirson, A. Manganese requirement and carbon source in *Chlorella* / A. Pirson, L. Bergmann // *Nature.* – 1955. – Vol. 176, N 4474. – P. 209–210. <https://doi.org/10.1038/176209a0>
19. Упитис, В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Рига : Зинатне, 1983. – 240 с.
20. Andresen, E. Trace metal metabolism in plants / E. Andresen, E. Peiter, H. Küpper // *J. Exp. Botany.* – 2018. – Vol. 69, N 5. – P. 909–954. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx465>
21. Ильючик, И. А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // *Вестн. Палеск. дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук.* – 2018. – № 1. – С. 53–64.
22. Ильючик, И. А. Изменения протеолитической активности гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* и функционально-метаболические перестройки культуры при росте в присутствии $MnCl_2$ / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // *Вестн. Палеск. дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук.* – 2018. – № 2. – С. 25–33.
23. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточной инженерии ; сост. : С. С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 101 с.
24. Мансурова, И. М. Влияние различных источников азота на рост динофитовых водорослей Черного моря [Электронный ресурс] / И. М. Мансурова, Л. В. Стельмах // *Вопр. совр. альгологии.* – 2014. – № 2 (6). – Режим доступа : <http://algology.ru/598>. – Дата доступа : 11.02.2020.
25. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л. А. Сиренко [и др.]; отв. ред. А. В. Топачевский. – Киев : Наук. думка, 1975. – 247 с.
26. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова ; под ред. И. П. Ермакова. – М. : Изд. центр «Академия», 2003. – 256 с.
27. Елизарова, В. А. Содержание фотосинтетических пигментов в фитопланктоне водоемов разного типа : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.18 / В. А. Елизарова ; Ин-т биологии внутренних вод АН СССР. – М., 1975. – 24 с.
28. Кошкин, Е. И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур / Е. И. Кошкин. – М. : Дрофа, 2010. – 638 с.
29. Титова, М. С. Содержание фотосинтетических пигментов в хвое *Picea abies* и *Picea koraiensis* / М. С. Титова // *Вестн. Оренбург. гос. ун-та.* – 2010. – № 12 (118). – С. 9–12.
30. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. / Д. Нельсон, М. Кокс. – Т. 2 : Биоэнергетика и метаболизм. – М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2020. – 636 с.
31. Кретович, В. Л. Биохимия растений / В. Л. Кретович. – М. : Высш. школа, 1986. – 503 с.

32. Demming-Adams, B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin / B. Demming-Adams // *Biochem. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics*. – 1990. – Vol. 1020, N 1. – P. 1–24. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-1)
33. Фотосинтетические пигменты в фитопланктоне Азовского моря / Ю. В. Косенко [и др.]. // *Изв. вузов. Сев.-Кавказ. регион. Естеств. науки*. – 2018. – № 3. – С. 88–97.
34. Минаев, О. В. Выращивание двухлеток судака в условиях карповых хозяйств II зоны рыбоводства / О. В. Минаев // *Молодежь в науке–2011 : прил. к журн. «Вест. НАН Беларуси» : материалы Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 25–29 апр. 2011 г. : в 5 ч. / ред. : В. Г. Гусаков [и др.]*. – Минск, 2012. – Ч. 4. – С. 106–112.
35. Яворская, Н. М. Содержание фотосинтетических пигментов в водорослях перифитона протоки Амурской (Хабаровский край) / Н. М. Яворская // *Регион. проблемы*. – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 5–10.

References

- Silva J., Alves C., Pinteus S., Reboleira J., Pedrosa R., Bernardino S. *Chlorella. Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements*. London, San Diego, 2019, pp. 187–193.
- Panahi Y., Khosroushahi A. Y., Sahebkar A., Heidari H. R. Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 182–194. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.022>
- Ballesteros-Torres J. M., Samaniego-Moreno L., Gomez-Flores R., Tamez-Guerra R. S., Rodríguez-Padilla C., Tamez-Guerra P. Production of amino acids and acylcarnitine by microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* from wastewater culture. *Peer Journal*, 2019, vol. 7, p. e7977. <https://doi.org/10.7717/peerj.7977>
- Taubert A., Jacob T., Wilhelm C. Glycolate from microalgae: an effective carbon source for biotechnological applications. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, vol. 17, no. 8, pp. 1538–1546. <https://doi.org/10.1111/pbi.13078>
- Shalygo N. V., Manankina E. E., Romashko A. K., Erashevich V. S. Green bird food year round. *Nauka i innovatsii [Science and innovation]*, 2018, no. 2, pp. 24–27 (in Russian).
- Voloshin R. A., Rodionova M. V., Zharmukhamedov S. K., Veziroglu T. N., Allakhverdiev S. I. Biofuel production from plant and algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016, vol. 41, no. 39, pp. 17257–17273. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.084>
- Waghmare A. G., Salve M. K., Leblanc J. G., Arya S. S. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2016, vol. 3, art. 16. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>
- Sorokina K. N., Yakovlev V. A., Piligaev A. V., Kukushkin R. G., Pel'tek S. E., Kolchanov N. A., Parmon V. N. The potential use of microalgae as a raw material for bioenergy. *Kataliz v promyshlennosti [Catalysis in industry]*, 2012, no. 2, pp. 63–72 (in Russian).
- Khan M. I., Shin J. H., Kim J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 2018, vol. 17, art. 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Lakaniemi A.-M., Intihar V. M., Tuovinen O. H., Puhakka J. A. Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microbial Biotechnology*, 2012, vol. 5, no. 1, pp. 69–78. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00298.x>
- Bogdanova A. A., Flerova E. A. The effect of various concentrations of the nutrient medium on the increase in the biomass of the micro-growth of strain IFR № C-111. *Innovatsionnye napravleniya razvitiya APK i povyshenie konkurentosposobnosti predpriyatii, otraslei i kompleksov – vklad molodykh uchenykh: sbornik nauchnykh trudov po materialam XVI mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Yaroslavl', 23–25 yanvarya 2013 goda)* [Innovative directions in the development of agribusiness and increasing the competitiveness of enterprises, industries and complexes – the contribution of young scientists: a collection of scientific papers based on the materials of the 16th International scientific and practical conference (Yaroslavl, January 23–25, 2013)]. Yaroslavl, 2013, pp. 51–55 (in Russian).
- Kapustin N. K. *Cultivation of chlorella and its use in fattening pigs in the BSSR*. Abstract of Ph. D. diss. Tartu, 1984. 23 p. (in Russian).
- Zimina Zh. A. The effect of trace elements and the drug Humate +7 on the intensity of photosynthesis and the accumulation of dry matter in corn plants. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya [Successes in modern science]*, 2006, no. 4, pp. 48–49 (in Russian).
- Fisher W. W., Cannabis J., Johnson J. E. Manganese and the evolution of photosynthesis. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 2015, vol. 45, no. 3, pp. 351–357. <https://doi.org/10.1007/s11084-015-9442-5>
- Gol'd V. M., Gaevskii N. A., Golovanova T. I., Belonog N. P., Gorbaneva T. B. *Plant physiology*. Available at: http://bio.sfu-kras.ru/files/1839_Konspekt_lekcii_Fiziologiya_rastenii.pdf (accessed 11.02.2020) (in Russian).
- Belous O. G. The influence of trace elements on the intensity of photosynthesis of tea plants in the zone of wet subtropics of Russia. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]*, 2011, no. 5. Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=4919> (accessed 08.01.2020) (in Russian).
- Luk'yanov V. A., Stifeev A. I. *Applied aspects of the use of microalgae in agrocenosis*. Kursk, Publishing House of the Kursk State Agricultural Academy, 2014. 181 p. (in Russian).
- Pirson A., Bergmann L. Manganese requirement and carbon source in *Chlorella*. *Nature*, 1955, vol. 176, no. 4474, pp. 209–210. <https://doi.org/10.1038/176209a0>
- Upitis V. V. *Macro and micronutrients in the optimization of mineral nutrition of microalgae*. Riga, Zinatne Publ., 1983. 240 p. (in Russian).

20. Andresen E., Peiter E., Küpper H. Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2018, vol. 69, no. 5, pp. 909–954. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx465>
21. Іл'ючык І. А., Нікандров В. Н. *Chlorella vulgaris* culture growth and protein accumulation at MnCl₂ addition in nutrient medium. *Vesnik Paleskaga dzyarzhavnaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in natural sciences], 2018, no. 1, pp. 53–64 (in Russian).
22. Іл'ючык І. А., Нікандров В. Н. Changes in the proteolytic activity of *Chlorella vulgaris* cell homogenates and functional-metabolic rearrangements of the culture during growth in the presence of MnCl₂. *Vesnik Paleskaga dzyarzhavnaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in natural sciences], 2018, no. 2. pp. 25–33 (in Russian).
23. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Shalygo N. V., Budakova E. A. (comp.). *Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
24. Mansurova I. M., Stel'makh L. V. The influence of various nitrogen sources on the growth of dinofit algae of the Black Sea. *Voprosy sovremennoi al'gologii* [Questions of modern algology], 2014, no. 2. Available at: <http://algology.ru/598> (accessed 11.02.2020) (in Russian).
25. Sirenko L. A., Sakevich A. I., Osipov L. F., Topachevskii A. V. *Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1975. 247 p. (in Russian).
26. Gavrilenko V. F., Zhigalova T. V. *Large workshop on photosynthesis*. Ed. I. P. Ermakova. Moscow, Izdatel'skii tsentr "Akademiya" Publ., 2003. 256 p. (in Russian).
27. Elizarova V. A. *The content of photosynthetic pigments in phytoplankton of reservoirs of various types*. Abstract of Ph. D. diss. Moscow, 1975. 24 p. (in Russian).
28. Koshkin E. I. *Physiology of crop sustainability*. Moscow, Drofa Publ., 2010. 638 p. (in Russian).
29. Titova M. S. The content of photosynthetic pigments in the needles of *Picea abies* and *Picea koraiensis*. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta* [Bulletin of Orenburg State University], 2010, no. 12 (118), pp. 9–12 (in Russian).
30. Nelson D. L., Cox M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed. New York, W.H. Freeman and Company. 1312 p. (Russ. ed.: Nel'son D., Koks M. *Osnovy biokhimii Lenindzhera. Tom 2*. Moscow, Binom. Laboratoriya znaniy Publ., 2020. 636 p.).
31. Kretovich V. L. *Biochemistry of plants*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1986. 503 p. (in Russian).
32. Demming-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1990, vol. 1020, no. 1, pp. 1–24. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-1)
33. Kosenko Yu. V., Baskakova T. E., Barabashin T. O., Safronova L. M. Photosynthetic pigments in the phytoplankton of the Sea of Azov. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Severo-Kavkazskii region. Estestvennye nauki = Bulletin of Higher Educational Institutions. North Caucasus Region. Natural Science*, 2018, no. 3, pp. 88–97 (in Russian).
34. Minaev O. V. Cultivation of two-year-old zander in the conditions of carp farms of the II fish farming zone. *Molodezh' v nauke – 2011: prilozhenie k zhurnalu "Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi": materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchenykh (g. Minsk, 25–29 aprelya 2011 goda). Chast' 4* [Youth in Science–2011: appendix to the journal "Vetsti Natsyonal'nay Akademii Navuk Belarusi": materials of the International scientific conference of young scientists (Minsk, April 25–29, 2011). Part 4]. Minsk, 2012, pp. 106–112 (in Russian).
35. Yavorskaya N. M. Content of photosynthetic pigments in algae of the Amurskaya Channel (Khabarovsk Territory). *Regional'nye problemy* [Regional issues], 2017, vol. 20, no. 1, pp. 5–10 (in Russian).

Информация об авторах

Іл'ючык Ірына Анатольевна – аспирант, ст. преподаватель. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: irina.iliuchik@mail.ru

Нікандров Виталий Николаевич – д-р биол. наук, профессор. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Irina A. Ilyuchyk – Postgraduate student, Senior Lecturer. Polesky State University (23, Dnieper Flotilla Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: irina.iliuchik@mail.ru

Vitaliy N. Nikandrov – D. Sc. (Biol.), Professor. Polesky State University (23, Dnieper Flotilla Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus).

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

UDC 574.583(285.2)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-310-318>

Received 21.02.2020

**Zhanna F. Buseva¹, Shabnam G. Farahani¹, Elena A. Sysova¹, Davis Ozolins²,
Nadezhda N. Sushchik³, Angelika A. Kolmakova³, Yulia K. Veras⁴**

¹*Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Biology of the University of Latvia, Salaspils, Latvia*

³*Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Krasnoyarsk, Russian Federation*

⁴*Belarusian State University, Naroch, Minsk Region, Republic of Belarus*

SEASONAL CHANGES IN THE PHYTOPLANKTON TAXONOMIC STRUCTURE AND PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN PELAGIAL AND LITTORAL OF TWO INTERCONNECTED LAKES IN BELARUS

Abstract. The seasonal pattern of phytoplankton taxonomical composition and phytoplankton chlorophyll *a* content from pelagial and littoral locations with and without macrophyte beds in two interconnected lakes (north-west of Belarus) under contrasting trophic conditions were studied. We estimated influence of hydrochemical parameters on phytoplankton in studied lakes. There was “a clear water phase” in pelagial and low phytoplankton abundance in littoral of mesotrophic Lake Obsterno but we revealed a brief pulse of *Chrysophyta* and “a late spring bloom” with high total phytoplankton abundance in shallow macrophyte-covered low trophic state Lake Nobisto. It was found some prominent differences in total phytoplankton abundance and taxonomic composition in littoral and pelagial locations of both lakes. We used Phyto-Pam phytoplankton analyser for analysis of algae pigments. Phyto-Pam method allowed roughly identify two types of pigments – pigments of green algae and diatoms and revealed differences in concentrations of pigments between littoral locations and pelagial in both lake types. Results indicated that total chlorophyll *a* content has a pronounced seasonal cycle with high values during the early fall and low values throughout the late spring in mesotrophic lake and have shown differences in phytoplankton pigments between lakes littoral locations.

Keywords: phytoplankton, pigments, chlorophyll *a*, seasonal changes, littoral, pelagial, macrophyte beds, mesotrophic lake, shallow lake

For citation: Buseva Zh. F., Farahani Sh. G., Sysova E. A., Ozolins D., Sushchik N. N., Kolmakova A. A., Veras Yu. K. Seasonal changes in the phytoplankton taxonomic structure and photosynthetic pigments in pelagial and littoral of two interconnected lakes in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 310–318. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-310-318>

**Ж. Ф. Бусева¹, Ш. Г. Фарахани¹, Е. А. Сысова¹, Д. Озолиньш², Н. Н. Сущик³,
А. А. Колмакова³, Ю. К. Верес⁴**

¹ *Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь*

² *Институт биологии Латвийского университета, Саласпилс, Латвия*

³ *Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия*

⁴ *Белорусский государственный университет, Нарочь, Республика Беларусь*

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ ФИТОПЛАНКТОНА В ПЕЛАГИАЛИ И ЛИТОРАЛИ ДВУХ СООБЩАЮЩИХСЯ ОЗЕР В БЕЛАРУСИ

Аннотация. Исследованы сезонные изменения таксономической структуры и фотосинтетических пигментов фитопланктона в пелагиали, а также в литорали, заросшей разными видами макрофитов, и литорали без зарослей в двух сообщающихся озерах разного трофического статуса (северо-запад Беларуси). Установлено, что для мезотрофного оз. Обстерно весной характерна «фаза чистой воды» в пелагиали и низкая численность фитопланктона в литорали. В то же время высокая численность хризифитовых водорослей (*Chrysophyta*) вызывала «осеннее цветение» фитопланктона в мелководном макрофитного типа оз. Нобисто с низкой трофностью. Выявлены существенные различия в общей численности и таксономической структуре фитопланктона между пелагиалью и литоралью в обоих озерах. С помощью специального метода с использованием прибора Phyto-Pam для определения содержания пигментов различных групп водорослей – зеленых и диатомовых и общего хлорофилла *a* установлено, что общее содержание хлорофилла *a* имело выраженный сезонный цикл с пиком ранней осенью и низким содержанием весной в ме-

зотрофном озере, а уровни хлорофилла *a* в литорали двух исследованных озер существенно различались. Согласно полученным данным, указанный метод может использоваться только для быстрого определения или грубой оценки содержания хлорофилла *a* в водоемах.

Ключевые слова: фитопланктон, пигменты, хлорофилл *a*, сезонные изменения, литораль, пелагиаль, заросли макрофитов, мезотрофное озеро, мелководное озеро

Для цитирования: Сезонные изменения таксономической структуры и фотосинтетических пигментов фитопланктона в пелагиали и литорали двух сообщающихся озер в Беларуси / Ж. Ф. Бусева [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 310–318 (in English). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-310-318>

Introduction. Clear differences exist in algal species composition, both between lakes and within a single lake over time, but the relative importance of nutrient competition among different taxa and purely physical processes among variable taxa in different seasons have not been clarified yet [1, 2] in the literature, a large number of methods are available to measure chlorophyll from phytoplankton [3]. Phytoplankton pigment are measured directly by means of spectrophotometric or fluorometric procedures [4, 5]. Chlorophyll *a* values are also used to calculate phytoplankton carbon biomass, assuming a fixed carbon to the chlorophyll *a* ratio. A number of older reports in the literature, mostly based on studies of the laboratory phytoplankton cultures, have demonstrated upper and lower limits on what one might expect in nutrient/chlorophyll relationships [6]. Since the early work of [7], chlorophyll fluorescence has become increasingly important for assessment of phytoplankton biomass and primary productivity [8]. Very sensitive techniques have been developed to measure chlorophyll *a* content and to analyse basic parameters of photosynthetic activity in natural surface waters down to 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{Chl}^{-1}$ [9, 10]. The so far available instrumentation has been limited by the fact that it cannot distinguish between different groups of phytoplankton, like green algae, diatoms and blue-green algae. In principle, such distinction is possible on the basis of the specific fluorescence excitation properties of differently pigmented phytoplankton groups [11]. We are aware that the chlorophyll *a* content generally differs between pelagic and littoral zones in the lakes and that the shallow areas are more influenced by the benthic processes than the pelagic zones [12, 13].

The goal of this study was to define seasonal patterns of phytoplankton composition of two interconnected lakes under contrasting – mesotrophic and low trophic conditions and estimated hydrochemical factors regulating phytoplankton structure during vegetation season.

Materials and research methods. Lake Obsterno (55°37'31.9"N, 27°21'55.2"E) is a mesotrophic relatively shallow lake with surface area of 9.89 km², max depth 12 m, mean depth of 5.3 m. The lake has a wide macrophyte beds occupying most of the shallow water area in littoral zone. Interconnected low trophic state Lake Nobisto (55°37'55.9"N, 27°24'19.9"E) with 3.75 km² surface area is shallow, has a max and mean depths of 2.8 and 1.4 m respectively. Lake Nobisto has a right-side shoreline with a swamped territory and the wide and dense macrophyte beds grow all around this lake, common bladderwort (*Utricularia vulgaris* L. of Lentibulariaceae family, order Lamiales) cover all the lake's bottom.

A total of 48 samples from seven habitats of two lakes in different seasons (with three replications for each habitat) were analysed for phytoplankton taxonomy. The phytoplankton samples of mesotrophic Lake Obsterno were collected in late May to September 2016 to identify the taxa in four locations – pelagial (depth of 4.5–5 m), bare littoral – an open shallow area without macrophytes, rush beds *Schoenoplectus lacustris* (L.) and yellow water-lily zone *Nuphar lutea* (L.). In Lake Nobisto, samples were collected from three habitats – one of pelagial (depth of 2.3 m) and two sites in littoral – bare littoral location and bull rush beds *Phragmites australis* (Cav.) Trinex Steud. (approximate depths of 1.2 and 0.7 m respectively) in 2017. The samples were kept in 1 liter jars and fixed with 2 % formalin solution. Each season all samples were taken during a day field trip. Data from Lake Obsterno were divided between a warm, more productive period (spring) and the cool and less productive period of the year (autumn). Species identification and counting of algal number were carried out in the Fuchs-Rosenthal chamber using a light microscope with a magnification of $\times 360$.

Phyto-Pam phytoplankton analyser was applied to get a quick measurement of chlorophyll *a* concentration in phytoplankton samples ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) without using acetone on the basis of the specific fluorescence excitation properties of differently pigmented phytoplankton groups. For this technique, due to the storage condition, we selected May and September phytoplankton samples of Lake Obsterno in 2016 and only September samples of Lake Nobisto in 2017. We performed sampling two years in different lakes but two seasons did not differ crucially in weather conditions.

The Phyto-Pam (Phyto-PAM phytoplankton Analyzer, Heinz Walz GMBH, Effeltrich, Germany) employs light-emitting-diodes (LED) to excite chlorophyll *a* fluorescence alternately by 10 μ s light pulses at four different wave lengths (470, 535, 620 and 650 nm). The fluorescence pulses were detected by a photomultiplier and amplified under microprocessor-control, resulting in 4 separate continuous signals (4 channels).

Seston samples for carbon, nitrogen and phosphorus analysis were stored in (one liter) plastic bottles that were first washed and rinsed in distilled and deionized water. Particulate samples were collected onto precombusted (5 h in 400 °C) glass fiber filters (Microbio GF/F filters, 0.7 μ m porosity, 37 mm diameter) and after filtration dried at 60 °C for 72 h. Final volume of filtering water on GF/F for seston was 0.8–1.2 l. All samples were taken once a day at around 10:00–12:00 o'clock. Flash EA 1112 NC Soil/MAS 200, Thermo Quest, Italy, CHN analyzer was used for carbon (C) and nitrogen (N) measurement. Particulate matter was analyzed for phosphorus (P) content calorimetrically after persulfate oxidation via spectrophotometer [14].

Statistical analyses. All statistical analyses were conducted using Minitab 17. To test the significant differences among habitats with phytoplankton taxonomical composition, we used one-way ANOVA with Tukey post hoc test. Eigen analysis of the correlation matrix via Principal Component Analysis (PCA) was applied to determine correlation between total abundance of phytoplankton dominant groups with elements as well as water chemistry.

Results and its discussion. During this study, water temperature varied from 21.4 °C in May with maximum of 23.6 °C in littoral location to September 14.3 °C in Lake Obsterno. Among all physico-chemical and hydrochemical parameters, TDS (115–120 ppm) and pH didn't change in a significant way but dissolved nitrates, phosphates and ammonium were not balanced in the whole season (Tab. 1). The Secchi disc transparency in Lake Obsterno differed from spring to autumn shifted from 6.5 m maximum in May to 4.2 m minimum in September.

Table 1. Hydrochemical and physical parameters of Lake Obsterno (2016)

Parameter	Season, location			
	Pelagial	Littoral	Pelagial	Littoral
	May		September	
$T, ^\circ\text{C}$	21.4	22.43 \pm 0.5	14.4	14.3 \pm 0.1
pH	8.4	8.5 \pm 0.05	8.4	8.7 \pm 0.00
Secchi depth, m	6.5		4.2	
$\text{PO}_4, \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.39	0.37 \pm 0.08	3.1	1.32 \pm 0.51
$\text{NO}_3, \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.3	0.6 \pm 0.10	0.3	1.1 \pm 0.26
$\text{NH}_4, \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.15	0.27 \pm 0.01	0.03	0.21 \pm 0.08

Note. Data for littoral is represented means from all three locations (means \pm SD).

In Lake Nobisto during the autumn, temperature, pH, TDS (100–110 ppm) and nitrate (Tab. 2) did not change in a significant way among habitats while NH_4^+ and PO_4^{3-} were different in comparing with Lake Obsterno. The Secchi disc transparency in Lake Nobisto was high (2.9 m till the bottom).

Table 2. Hydrochemical parameters of Lake Nobisto (autumn 2017)

Parameter	Location		
	Pelagial	Bare littoral	Bull rush
$T, ^\circ\text{C}$	9.6	9.6	9.8
pH	8.6	8.5	8.6
Secchi depth, m	2.9		
$\text{PO}_4, \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	2	1.84	1.04
$\text{NO}_3, \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0	0	0.2
$\text{NH}_4, \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.77	0.93	1.56

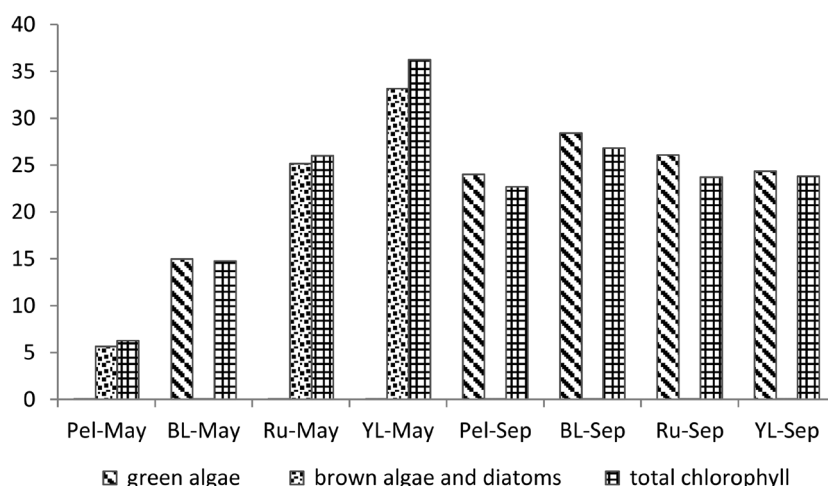


Fig. 1. Chlorophyll *a* concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) of phytoplankton samples in different habitats of Lake Obsterno. Sep – September, Pel – Pelagial, BL – Bare littoral, Ru – Rush beds, YL – Yellow lily beds

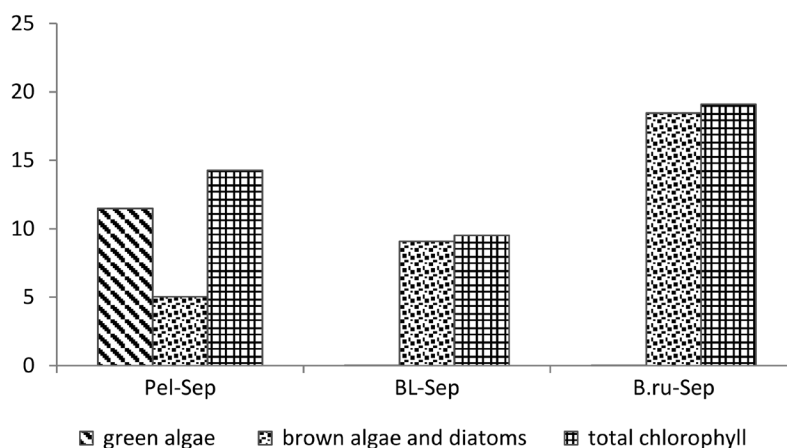


Fig. 2. Chlorophyll *a* concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) of phytoplankton samples in different habitats of Lake Nobisto. Sep – September, Pel – Pelagial, B. ru – Bull rush, BL – Bare littoral

During this study, total chlorophyll *a* concentrations ranged from 6.25 to 36.24 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in Obsterno and from 9.51 to 19.10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in Nobisto, averaging 22.84 ± 8.84 and 14.29 ± 4.79 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in Obsterno and Nobisto respectively (Fig. 1, 2). Peak concentrations occurred during late spring in yellow water-lily zone in Lake Obsterno. In general, chlorophyll *a* was lower in Nobisto than in Obsterno. The minimum chlorophyll *a* concentrations were typically observed at the pelagial zone of Lake Obsterno at the end of May where we noted “a clear water phase” as recorded in many studies [15]. Spring phytoplankton usually characterizes the “diatom bloom”, so brown pigments appeared in Lake Obsterno. The shallow location without macrophyte cover (bare littoral) is more turbid lake’s area where the pigments of green algae were identified properly in our phytoplankton samples of that location which is completely in agreement with Happey and Woods research in 1988 [16].

The chlorophyll *a* content revealed differences in pigments in accordance with dominant groups such as green algae and diatoms in autumn and late May in Obsterno as well as diatoms in Nobisto during autumn. The Secchi disc transparency in Obsterno from May to September decreased greatly (from 6.5 to 4.2 m) in combination the shift in dominant groups from diatoms to green algae. Taxonomical composition of phytoplankton has shown differences in lakes during season as well as in littoral and pelagial locations. In Lake Obsterno in May *Chrysophyta* and then *Bacillariophyta* were the most abundant algae groups in pelagial, bare littoral, rush beds and yellow water-lily zone respectively. In autumn, *Bacillariophyta* was the most widespread group in all habitats (Tab. 3). According to the phytoplankton community composition of Lake Nobisto, during autumn in pelagial *Chrysophyta* but in bare littoral and bulrush,

Bacillariophyta were the dominant groups (Tab. 4). *Cyanophyta* were absent in May in pelagial and bare littoral and had minimum values in rush beds and yellow water lily zone in Lake Obsterno. In lake Nobisto we identified minimum values of *Cyanophyta* in all habitats in autumn. Meanwhile during May and September within all habitats of both lakes, no chlorophyll content for *blue-green algae* (*Cyanophyta*) by using Phyto Pam technique was obtained. As noted by Moore in 1978 [17], numerous factors may be involved in the ecological success of blue-green algae. One proposed explanation for low dominance of blue-green algae is limited phosphorus since nitrogen-fixing species usually are those who dominate [18] which is in agreement with our data and low trophic state of both lakes.

Table 3. Taxonomical composition of phytoplankton community of Lake Obsterno: abundance (ind/l) and C:N, N:P ratios of seston within season (from May to September) 2016

Habitat	Phytoplankton group	Mean ± SD	C:N	N:P
Pelagial	<i>Bacillariophyta</i>	162 491 ± 115 054 ^{AB}	5.5–7.37	107.71–35.61
	<i>Chlorophyta</i>	25 004 ± 27 994 ^{BC}		
	<i>Chrysophyta</i>	63 969 ± 64 405 ^{BC}		
	<i>Cryptophyta</i>	20 304 ± 15 370 ^C		
	<i>Cyanophyta</i>	15 612 ± 17 451 ^C		
Bare littoral	<i>Bacillariophyta</i>	98 464 ± 29 471 ^B	5.75–7.56	106.29–11.75
	<i>Chlorophyta</i>	17 418 ± 24 188 ^{CD}		
	<i>Chrysophyta</i>	77 290 ± 66 710 ^{BC}		
	<i>Cryptophyta</i>	35 814 ± 14 255 ^{BCD}		
	<i>Cyanophyta</i>	4 345 ± 5 397 ^{CD}		
Rush beds	<i>Bacillariophyta</i>	295 566 ± 195 662 ^A	5.72–8.78	101.06–6.42
	<i>Chlorophyta</i>	415042 ± 789 308 ^A		
	<i>Chrysophyta</i>	28 040 ± 17 210 ^A		
	<i>Cryptophyta</i>	63 796 ± 56 275 ^A		
	<i>Cyanophyta</i>	29 714 ± 34 133 ^A		
Yellow water-lily zone	<i>Bacillariophyta</i>	76 995 ± 54 563 ^B	6.14–7.31	82.62–1.38
	<i>Chlorophyta</i>	16 439 ± 15 694 ^B		
	<i>Chrysophyta</i>	63 057 ± 48 209 ^B		
	<i>Cryptophyta</i>	56 198 ± 38 639 ^B		
	<i>Cyanophyta</i>	5 583 ± 4 598 ^B		

Note. Grouping information using Tukey test for the abundance of phytoplankton community, different labels (A, B, C, D) show significant differences of main phytoplankton groups among habitats at $p < 0.05$.

In Obsterno during May, we achieved a range of 6.47, 6.73, 6.68, 7.16 for C:N and 243.3, 239, 224 and 193.61 for N:P ratio respectively in pelagial, bare littoral, rush beds and yellow water lily zone. In September, C:N ratio of seston was greater than in May for pelagial, bare littoral, rush beds and yellow water lily zone followed by 9.39, 9.36, 8.65 and 8.47. In September N:P ratios were measured by an exceed range of above 1000 (8227, 2348, 2945 and 6392) respectively for pelagial, bare littoral, rush beds and yellow water lily zone which could be a reason of great phosphorus depletion and/or high nitrogen concentration. In May, phosphorus content of seston varied from 6.69 $\mu\text{g/l}$ in littoral and 6.59 $\mu\text{g/l}$ in pelagial but in September, it was recorded as 4.20 $\mu\text{g/l}$ in littoral and 0.80 $\mu\text{g/l}$ in pelagial locations.

Principal Component Analysis of C:N and N:P ratios with phytoplankton abundance expressed some positive but weak correlation in May and September which is followed as: C:N with *Dinophyta* (PC = 0.394), *Chrysophyta* (PC = 0.362), *Bacillariophyta* (PC = 0.305), *Chrysophyta* (PC = 0.362) and *Chlorophyta* (PC = 0.261); N:P with *Cyanophyta* (PC = 0.031), *Dinophyta* (PC = 0.281), *Cryptophyta* (PC = 0.598), *Chrysophyta* (PC = 0.015) and *Bacillariophyta* (PC = 0.409). Principal Component Analysis of phosphate and *Cryptophyta* abundance (PC = 0.640) showed a strong correlation but *Chrysophyta* (PC = 0.024), *Cyanophyta* (PC = 0.007) and *Dinophyta* (PC = 0.174) revealed a poor correlation in Lake Obsterno.

Analysis of variance with post hoc and Tukey test showed the significant differences among phytoplankton groups seasonally ($F = 6.09$, $p = 0.000$). Grouping information using Tukey method in Lake

Table 4. Taxonomical composition of phytoplankton community of Lake Nobisto: abundance (ind/l) and C:N, N:P ratios of seston in September 2017

Habitat	Phytoplankton group	Mean \pm SD	C:N	N:P
Pelagial	<i>Bacillariophyta</i>	128 151 \pm 64 114 ^{AB}	10.74	31.09
	<i>Chlorophyta</i>	35 182 \pm 25 732 ^{AB}		
	<i>Chrysophyta</i>	349 740 \pm 382 704 ^{AB}		
	<i>Cryptophyta</i>	24 583 \pm 22 678 ^{AB}		
	<i>Cyanophyta</i>	12 396 \pm 11 408 ^B		
	<i>Euglenophyta</i>	53 516 \pm 71 750 ^{AB}		
Bare littoral	<i>Bacillariophyta</i>	106 270 \pm 42 018 ^B	12.13	73.73
	<i>Chlorophyta</i>	31 329 \pm 6 917 ^B		
	<i>Chrysophyta</i>	129 959 \pm 110 072 ^B		
	<i>Cryptophyta</i>	24 392 \pm 20 845 ^B		
	<i>Cyanophyta</i>	8 655 \pm 8 352 ^B		
	<i>Euglenophyta</i>	20 122 \pm 19 254 ^B		
Bull rush	<i>Bacillariophyta</i>	104 453 \pm 80 017 ^B	11.61	15.28
	<i>Chlorophyta</i>	28 802 \pm 18 720 ^B		
	<i>Chrysophyta</i>	95 117 \pm 48 946 ^B		
	<i>Cryptophyta</i>	30 234 \pm 28 200 ^B		
	<i>Cyanophyta</i>	11 185 \pm 7 984 ^B		
	<i>Euglenophyta</i>	35 729 \pm 30 108 ^B		

Note. Grouping information using Tukey test for the abundance of phytoplankton community, different labels (A, B) show significant differences of main phytoplankton groups among habitats at $p < 0.05$.

Obsterno showed the abundance of *Bacillariophyta* is significantly different from the other groups in pelagial and bare littoral. As showed in the Tab. 3, mean abundance of *Bacillariophyta* is higher than others. Beside it, *Bacillariophyta* had a significant difference with rest of phytoplankton groups during seasons (Tab. 3).

In Lake Nobisto lake during September, C:N ratios were recorded in 10.47, 12.13 and 11.61 respectively for pelagial, bare littoral and bull rush and were higher than its values in Lake Obsterno. N:P showed a range of 31.09, 73.73 and 15.28 for mentioned habitats and were different from those in Lake Obsterno. PCA analysis didn't express an average or strong correlation between phytoplankton groups and CNP as well as water chemistry. *Chrysophyta* (349–740 ind/l) in May and *Bacillariophyta* (104–453 ind/l) in September were identified as the most abundant groups from spring to autumn. Grouping information using Tukey method in Lake Nobisto showed that abundance of *Bacillariophyta*, *Chlorophyta*, *Chrysophyta*, *Cryptophyta* and *Euglenophyta* in pelagial are significantly different from the abundance of other groups in bare littoral and bull rush during autumn (Tab. 4). Occurrence of *U. vulgaris* may indicate the lack of nitrate nitrogen in Lake Nobisto in autumn as well as low phosphates in comparison with pelagial of Lake Obsterno. Phosphorus content of seston in Lake Nobisto was measured as 7.43 $\mu\text{g/l}$ in pelagial, 3.43 $\mu\text{g/l}$ in bare littoral and 9.51 $\mu\text{g/l}$ in bull rush. In temperate lakes, in mesotrophic systems, most algal taxonomic groups are represented over the growing season, especially *Bacillariophyta*, *Chlorophyta* (green algae), *Cryptophyta* and *Dinophyta*, as well as *Cyanophyta* and *Chrysophyta* [19]. *Cryptophyta*, *Chrysophyta*, *Chlorophyta* and *Bacillariophyta* increase with phosphorus concentration. Some taxonomic groups increase significantly over a wide phosphorus range (*Cyanophyta*, *Bacillariophyta*), others exhibit decelerating rates of increase at low (*Chrysophyta*) or moderate P levels (*Cryptophyta*, *Dinophyta*) [20]. As it is shown in our survey, phosphate and *Cryptophyta* showed a strong correlation but a poor correlation with the rest of phytoplankton groups in Lake Obsterno. This result in marked shifts in average phytoplankton taxonomic composition across this intermediate phosphorus range. McQueen and Lean [21] claimed that *Chrysophyta* and *Dinophyta* show a decelerating rate in their growth when P is low or moderate, as they decreased in May and in early summer but then decelerated toward autumn in Lake Obsterno. High light, N:P and intermediate pH and temperatures may favour *Chlorophyta* [22]. *Chlorophyta* in Lake

Obsterno appeared more abundant in late summer and early autumn where temperature and light were higher than spring [16]. Both *Cryptophyta* and *Chrysophyta* exploit nutrient and light gradients [23] and conditions associated with enrichment (increased turbidity and organic materials) favour their growth which is in agreement with our obtained data with highest abundance of *Cryptophyta* and *Chrysophyta* in May for both lakes. On the other hand, most cryptophytes and many chrysophytes are small monads, and grazing regulation should significantly modify their response to nutrient enrichment [24]. *Chrysophyta* have been shown to be frequently phosphorus limited, but they respond unpredictably to enrichment [23]. The comparatively strong relationship between phosphate and *Cryptophyta* abundance ($PC = 0.640$) in our data suggests that this group is more influenced by phosphorus. On the other side a poor correlation between phosphate with *Chrysophyta*, *Cyanophyta* and *Dinophyta* suggest that they could be affected by pH and alkalinity [23] which is common among many of these taxa than phosphorus [25, 26]. According to the PEG-model of plankton seasonal succession toward the spring, nutrient availability and increased light permit unlimited growth of phytoplankton, especially in *Cryptophyta* and small diatoms. In the middle of warm season, by more soluble phosphorus, *Cryptophyta* become predominant as its clear in studied lakes. By seasonal changes and light limitation from spring to autumn, macrophytes and vegetation become important particularly in shallow lakes as it happened in both our studied lakes [27]. Macrophytes are known to affect nutrient cycling in lakes causing changes in phytoplankton biomass, growth and leading to competition among different taxa [28], but there is no effect on the presence or absence of macrophytes on the total biomass of diatoms [29] as its shown in our survey suggesting not only hydrochemical but other factors affect on phytoplankton dynamics.

Conclusion. A synthesis of patterns in average spring and autumnal abundance of major phytoplankton taxonomic groups in mesotrophic Lake Obsterno show that all groups increase in abundance with soluble phosphorus at different degrees, but only *Cryptophyta* showed a strong correlation over the season. However, neither abundance of dominant phytoplankton groups, nor chlorophyll *a* content didn't show any correlations of taxonomic composition with the range of nutrient levels observed. Contrary, in shallow low trophic Lake Nobisto mainly nutrient deficiency and competition with macrophytes leads to development and changing defined phytoplankton groups especially in pelagial. We also approve that Phyto-Pam has been limited by the fact that it cannot distinguish between different phytoplankton groups, like green algae, diatoms and *blue-green algae* and it's just a quick method for analysis of the main algal pigments.

Acknowledgements. This work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant no. B17-037. Field sampling in 2016 was performed in frame of the State Programme of Scientific Researches of Belarus (Nature management and Ecology, task 2.06, 2016-2018, no. 20160496). We also would like to acknowledge Belarus National Academy of Science for financial support and Prof. L. Senerpont Domis to provide the opportunity to visit the Institute of Ecology (NIOO-KNAW) in Wageningen, for the help and supervision working on Phyto Pam analyser.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант № B17-037). Сбор материала в 2016 г. был проведен при поддержке ГПНИ (Природопользование и экология, задание 2.06, № ГР 20160496). Выражаем благодарность НАН Беларуси за финансовую поддержку и профессору Лизетт Сенерпонт Домис из Института экологии (NIOO-KNAW, Вагенинген, Нидерланды) за помощь в освоении методики для работы на Phyto-Pam анализаторе.

References

1. Gerten D., Adrian R. Climate-driven changes in spring plankton dynamics and the sensitivity of shallow polymictic lakes to the North Atlantic Oscillation. *Limnology and Oceanography*, 2000, vol. 45, no. 5, pp. 1058–1066. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.5.1058>
2. Lampert W., Sommer U. *Limnoecology – the ecology of lakes and streams*. 1st ed. New York, Oxford University Press, 1997. 382 p.
3. Marker A. F. H., Nusch E. A., Rai H., Riemann B. The measurements of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Archiv für Hydrobiologie*, 1980, vol. 14, pp. 91–106.
4. Lorenzen C. J. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 1967, vol. 12, no. 2, pp. 343–346. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>
5. Jeffrey S. W. An improved thin-layer chromatographic technique for marine phytoplankton pigments. *Limnology and Oceanography*, 1981, vol. 26, no. 1, pp. 191–197. <https://doi.org/10.4319/lo.1981.26.1.0191>
6. Søndergaard M. Seasonal variations in the loosely sorbed phosphorus fraction of the sediment of a shallow and hypertrophic lake. *Environmental Geology and Water Sciences*, 1988, vol. 11, pp. 115–121. <https://doi.org/10.1007/BF02587770>

7. Lorenzen C. J. A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 1966, vol. 13, no. 2, pp. 223–227. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(66\)91102-8](https://doi.org/10.1016/0011-7471(66)91102-8)
8. Falkowski P. G., Kolber Z. Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1995, vol. 22, no. 2, pp. 341–355. <https://doi.org/10.1071/pp9950341>
9. Kolber Z., Falkowski P. G. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. *Limnology and Oceanography*, 1993, vol. 38, no. 8, pp. 1646–1665. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.8.1646>
10. Schreiber U., Bilger W. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *Progress in botany. Vol. 54*. Berlin, 1993, pp. 151–173.
11. Kolbowski J., Schreiber U. Computer-controlled phytoplankton analyser based on 4 wavelengths PAM chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Dordrecht, 1995, pp. 825–828.
12. Staehr P. A., Baastrup-Spohr L., Sandjensen K., Stedmon C. Lake metabolism scales with lake morphometry and catchment conditions. *Aquatic Sciences*, 2012, vol. 74, no. 1, pp. 155–169. <https://doi.org/10.1007/s00027-011-0207-6>
13. They N. H., Motta-Marques D., Souza R. S. Lower respiration in the littoral zone of a subtropical shallow lake. *Frontiers in Microbiology*, 2013, vol. 3, art. 434. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00434>
14. Murphy J., Riley J. P. A modified single-solution method for the determination of phosphorus in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 1962, vol. 27, pp. 31–36. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)88444-5)
15. Sommer U., Gliwicz Z. M., Lampert W., Duncan A. PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie*, 1986, vol. 106, no. 4, pp. 433–471.
16. Happy-Wood C. M. Ecology of freshwater planktonic green algae. *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge, 1988, pp. 103–133.
17. Moore J. W. Distribution and abundance of phytoplankton in 153 lakes, rivers, and pools in the Northwest Territories. *Canadian Journal of Botany*, 1978, vol. 56, no. 15, pp. 1765–1773. <https://doi.org/10.1139/b78-210>
18. Flett R. J., Schindler D. W., Hamilton R. E., Campbell N. E. R. Nitrogen fixation in the Precambrian Shield lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1980, vol. 37, no. 3, pp. 494–505. <https://doi.org/10.1139/f80-064>
19. Eloranta P. *Melosira distans* var. *tenella* and *Eunotia zasuminensis*, two poorly known planktonic diatoms in Finnish lakes. *Nordic Journal of Botany*, 1986, vol. 6, no. 1, pp. 99–103. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1986.tb00865.x>
20. Reynolds C. S. Phytoplankton periodicity: the inextrication of form, function and environmental variability. *Freshwater Biology*, 1984, vol. 44, no. 2, pp. 111–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1984.tb00027.x>
21. McQueen D. J., Lean D. R. S. Influence of water temperature and nitrogen to phosphorus ratios on the dominance of blue-green algae in lake St. George, Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1987, vol. 44, no. 3, pp. 598–604. <https://doi.org/10.1139/f87-073>
22. Tilman, D., Kiesling K., Sterner R., Kilham S. S., Johnson A. Green, blue-green and diatom algae: taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Archiv für Hydrobiologie*, 1986, vol. 106, pp. 473–485.
23. Sandgren C. D. The ecology of chrysophyte flagellates: their growth and perennation strategies as freshwater phytoplankton. *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge, 1988, pp. 9–104.
24. Watson S., McCauley E. Contrasting patterns of net and nanoplankton production and biomass among lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1988, vol. 45, no. 5, pp. 915–920. <https://doi.org/10.1139/f88-112>
25. Caron D. A., Dam H. G., Kremer P., Lessard E. J., Madin L. P., Malone T. C., Napp J. M., Peele E. R., Roman M. R., Youngbluth M. J. The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface waters of the Sargasso Sea near Bermuda. *Deep-Sea Research. Part I: Oceanographic Research Papers*, 1995, vol. 42, no. 6, pp. 943–972. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(95\)00027-4](https://doi.org/10.1016/0967-0637(95)00027-4)
26. Downing J. A., McCauley E. The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. *Limnology and Oceanography*, 1992, vol. 37, no. 5, pp. 936–945. <https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.5.0936>
27. Cox E. J. *Identification of Freshwater Diatoms from Live Material*. London, Chapman & Hall Publ., 1996. 158 p.
28. O'Dell K. M., Van Arman J., Welch B. H., Hill S. D. Changes in water chemistry in a macrophyte-dominated lake before and after herbicide treatment. *Lake and Reservoir Management*, 1995, vol. 11, no. 4, pp. 311–316. <https://doi.org/10.1080/07438149509354212>
29. Beklioglu M., Moss B. Mesocosm experiments on the interaction of sediment influence, fish predation and aquatic plants with the structure of phytoplankton and zooplankton communities. *Freshwater Biology*, 1996, vol. 36, no. 2, pp. 315–325. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1996.00092.x>

Information about the authors

Zhanna F. Buseva – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: buseva_j@mail.ru

Shabnam G. Farahani – Postgraduate student, 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: sh.farahani1986@gmail.com

Информация об авторах

Бусева Жанна Федоровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: buseva_j@mail.ru

Фарахани Шабнам Газерани – аспирант, мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sh.farahani1986@gmail.com

Elena A. Sysova – Ph. D. (Biol.), Senior 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: sysovaelena@mail.ru

Davis Ozolins – Researcher. Institute of Biology of the University of Latvia (3, Mier Str., LV-2169, Salaspils, Latvia). E-mail: davis.ozolins@lu.lv

Nadezhda N. Sushchik – D. Sc. (Biol.), Leading Researcher, Deputy Director. Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (50/50, Akademgorodok, 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation). E-mail: labehe@ibp.ru

Angelika A. Kolmakova – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (50/50, Akademgorodok, 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation). E-mail: angelika@inbox.ru

Yulia K. Veres – Ph. D. (Biol.), Deputy Director. Belarusian State University (Minsk Region, 220095, Naroch, Republic of Belarus). E-mail: veres.julia.naroch@gmail.com

Сысова Елена Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sysovaelena@mail.ru

Озолиньши Дэвис – науч. сотрудник. Институт биологии, Латвийский университет (ул. Миера, 3, LV-2169, г. Саласпилс, Латвия). E-mail: davis.ozolins@lu.lv

Сущик Надежда Николаевна – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, заместитель директора. Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук (Академгородок, 50/50, 660036, г. Красноярск, Российская Федерация). E-mail: labehe@ibp.ru

Колмакова Анжелика Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук (Академгородок, 50/50, 660036, г. Красноярск, Российская Федерация). E-mail: angelika@inbox.ru

Верес Юлия Константиновна – канд. биол. наук, заместитель директора. Белорусский государственный университет (220095, Нарочь, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: veres.julia.naroch@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.29
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-319-327>

Поступила в редакцию 06.04.2020
Received 06.04.2020

Е. В. Кулик, Ю. В. Селезнева, А. В. Качан, О. Б. Русь, А. Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

КЛОНИРОВАНИЕ кДНК ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *ASPERGILLUS AWAMORI* В ИНТЕГРАТИВНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ МЕТОДОМ КОЛЬЦЕВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ

Аннотация. С использованием метода кольцевой полимеразной реакции (circular polymerase extension cloning, CPEC) было проведено успешное клонирование кДНК гена глюкоамилазы *Aspergillus awamori* в интегративный вектор для мицелиальных грибов pH4Hyg. Вначале были проведены две полимеразные цепные реакции (ПЦР). В результате первой амплифицирована кДНК гена *glaA*, ранее клонированная в плазмиду на основе вектора pBluescript II SK(-), в результате второй – вектор pH4Hyg в линейной форме, содержащий промотор и терминатор целевого гена. Полученные ампликоны были очищены от компонентов смеси ПЦР. После 20 циклов реакции CPEC была синтезирована конечная генетическая конструкция pH4HygPTgla, которая может использоваться в создании штаммов мицелиальных грибов, секретирующих глюкоамилазу в стабильной конформации, обладающую биотехнологически значимыми свойствами.

Ключевые слова: клонирование методом кольцевой полимеразной реакции (CPEC), глюкоамилаза, *Aspergillus awamori*, интегративный вектор

Для цитирования: Клонирование кДНК глюкоамилазы *Aspergillus awamori* в интегративный вектор для мицелиальных грибов методом кольцевой полимеразной реакции / Е. В. Кулик [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 319–327. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-319-327>

Alena V. Kulik, Yuliya V. Selezneva, Alexandr V. Kachan, Olga B. Rus, Anatoliy N. Evtushenkov

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING OF cDNA GLUCOAMYLASE *ASPERGILLUS AWAMORI* INTO INTEGRATIVE VECTOR FOR FILAMENTOUS FUNGI

Abstract. This article describes successful insertion the cDNA glucoamylase from *Aspergillus awamori* into the integrative vector for filamentous fungi pH4Hyg using the CPEC (circular polymerase extension cloning) strategy. The prior step was the PCR amplification of the cDNA *glaA* gene cloned into a vector based on the plasmid pBluescript II SK(-) and the amplification of linear pH4Hyg vector with promotor and terminator of the *glaA* gene. The PCR products were purified and used for CPEC reaction. The CPEC product was formed after 20 cycles of the reaction. It is proposed to use the final plasmid pH4HygPTgla in engineering of filamentous fungi strains producing stable forms of glucoamylase with biotechnological interest.

Keywords: circular polymerase extension cloning (CPEC), glucoamylase, *Aspergillus awamori*, integrative vector

For citation: Kulik A. V., Selezneva Yu. V., Kachan A. V., Rus O. B., Evtushenkov A. N. Circular polymerase extension cloning of cDNA glucoamylase *Aspergillus awamori* into integrative vector for filamentous fungi. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 319–327 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-319-327>

Введение. В различных отраслях пищевой промышленности, таких как спиртовая, пивоваренная, крахмалопаточная и хлебопекарная, широко используются препараты глюкоамилазы для ферментативной обработки крахмалсодержащего сырья. Глюкоамилаза (α -1,4-глюкан-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.3) – это экзодеполимераза, относящаяся к семейству GH15 гликозидгидролаз [1, 2]. Она последовательно отщепляет остатки глюкозы от нередуцирующего конца молекул крахмала или мальтоолигосахаридов. Кроме α -1,4-гликозидных связей фермент медленно гидролизует α -1,6-гликозидные связи, расщепляя крахмалсодержащее сырье до β -D-глюкозы. При высокой концентрации глюкозы в реакционной среде глюкоамилазы могут катализировать реакцию транс-гликозилирования с образованием мальтозы, изомальтозы и других продуктов [3].

Основными продуцентами глюкоамилаз являются эукариотические организмы – плесневые грибы и дрожжи. Согласно современной классификации, выделяют 7 подсемейств глюкоамилаз,

в 4 из которых входят ферменты грибов [4, 5]. Среди плесневых грибов фермент синтезируют представители рода *Aspergillus* видов *awamori*, *niger*, *oryzae*, *terreus* и др., рода *Rhizopus* видов *oryzae*, *niveus*, *delemar*, а также родов *Neurospora*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др. [4]. В дрожжах глюкоамилаза обнаружена у таких видов, как *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, *Pichia subpelliculosa* и др.

Использование ферментных препаратов глюкоамилазы в промышленных масштабах обуславливает необходимость наличия ряда технологически значимых биохимических свойств, что будет способствовать повышению рентабельности производственного процесса и снижению стоимости конечного продукта. Например, использование термостабильной глюкоамилазы грибного происхождения на втором этапе процесса осахаривания крахмалсодержащего сырья в производстве этанола позволит снизить расход электроэнергии и воды на охлаждение промежуточного продукта.

С целью получения фермента с определенными характеристиками используют различные молекулярно-генетические стратегии, для реализации которых необходимы простые, эффективные, точные и экономичные методы. Молекулярное клонирование – это одна из значимых стадий в процессе создания белковых препаратов с заданными свойствами. Стандартный способ клонирования целевых генов в плазмидные векторы основан на использовании рестрицирующих эндонуклеаз и ДНК-лигазы. Однако этот подход имеет ряд ограничений: дополнительное применение наряду с рестриктазами и ДНК-лигазами других ферментных систем и реагентов; во избежание нарушения генетической целостности в процессе рестрикции следует учитывать особенности нуклеотидной последовательности объединяемых молекул. Кроме того, этот способ может быть неэффективным в случае клонирования фрагментов большого размера.

Альтернативой являются методы клонирования, применение которых не требует использования реакций рестрикции, а часто и лигирования. Одним из методов такого рода является так называемая сборка Гибсона (Gibson assembly) [6], успешно примененная сотрудниками Института Крейга Вентера для соединения синтезированных химическим способом полинуклеотидных последовательностей на одном из этапов создания синтетического генома *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 [7]. Условием успешного получения рекомбинантных молекул этим методом является то, что соединяемые концы линейных двунитевых ДНК должны иметь одинаковые последовательности длиной 20–40 п. н. С помощью обработки молекул ДНК 5'-3'-эксонуклеазой на концах фрагментов создаются протяженные одноцепочечные участки, способные к комплементарному взаимодействию. Образование ковалентных связей между комплементарно связанными молекулами осуществляется путем внесения в реакционную смесь ДНК-зависимой ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. Процедура позволяет за 1 ч реакции в одной пробирке соединить до 5 фрагментов ДНК в строго определенном порядке и ориентации.

Модификацией данного метода является технология LIC (ligation-independent cloning), которая позволяет получать с помощью экзонуклеазы однонитевые выступающие концы строго контролируемой длины [8]. Соединяемые фрагменты ДНК на 3'-концах, которые необходимо укоротить для получения выступающих 5'-концов, должны иметь одинаковые последовательности размером 20 п. н., состоящие лишь из трех видов нуклеотидов. Реакция проводится в присутствии ДНК-полимеразы фага T4 и четвертого вида дНТФ. При недостатке нуклеотидов ДНК-полимераза функционирует как 3'-5'-эксонуклеаза, укорачивая 3'-концы. Наличие в гидролизуемой последовательности добавленного в реакцию дНТФ подавляет экзонуклеазную активность, что позволяет получить 5'-выступающий конец строго определенной длины.

Для объединения фрагментов ДНК активно используются ферменты гомологичной и сайт-специфической рекомбинации. Метод рекомбинационной инженерии с использованием продуктов оперона Red бактериофага λ или белков RecET профага *gac* *E. coli* может быть использован не только для осуществления вставок в хромосомную ДНК бактерий [9], но и для встраивания продуктов ПЦР в векторную молекулу *in vivo* [10]. Вектором в линейном виде вместе с продуктами амплификации котрансформируют клетки бактерий. При наличии на концах продукта ПЦР 30-нуклеотидных последовательностей, гомологичных двум участкам в векторной молекуле, белки гомологичной рекомбинации обеспечивают встраивание целевого фрагмента в вектор.

Для высокоэффективного субклонирования участка ДНК из какой-либо донорной векторной молекулы в набор разнообразных векторов-мишеней может быть успешно применена система клонирования GATEWAY, разработанная Invitrogen life technologies [11]. Данная система использует белки сайт-специфической рекомбинации бактериофага λ . Для обеспечения взаимодействия рекомбиназ с ДНК и последующего формирования продуктов рекомбинации участка, фланкирующие клонируемый фрагмент, и места встраивания в молекулах-мишенях содержат сайты *attP* и *attB* или их модифицированные варианты.

Среди существующих методов клонирования без использования рестриктаз и ДНК-лигазы следует отметить метод СРЕС (circular polymerase extension cloning), разработанный J. Quan и J. Tian [12]. Это высокоэффективный одноэтапный метод клонирования, основанный на использовании кольцевой полимеразной реакции. Поскольку СРЕС, в отличие от ПЦР, не является амплификационным процессом, то в синтезируемом конечном продукте мутации не накапливаются. Для проведения реакции необходимы двухцепочечные линейные ДНК вектора и вставки, фланкированные на обоих концах перекрывающимися комплементарными гомологичными участками длиной 15–25 нуклеотидов, которые, аналогично праймерам при ПЦР, будут служить затравками для ДНК-полимеразы. Температура плавления таких перекрывающихся участков должна быть в диапазоне от 60 до 70 °С. Для проведения реакции используют ДНК-полимеразы с высокой точностью полимеризации и соответствующие наборы реактивов. В типичной реакции СРЕС линейные двухцепочечные ДНК вставки и вектора смешивают и денатурируют путем нагревания. При понижении температуры одноцепочечные молекулы ДНК отжигаются перекрывающимися участками с образованием кольцевых структур и далее в процессе полимеразной реакции достраиваются ДНК-полимеразой до рекомбинантной двухцепочечной кольцевой плазмиды. Обычно необходимо 15–18 циклов. В результате реакции образуются двухцепочечные кольцевые плазмиды с одним «ником» в каждой цепи, которые можно использовать для трансформации компетентных клеток бактерий. Разработчики метода СРЕС экспериментально подтвердили эффективность предложенного способа на примере клонирования как отдельного гена *lacZ α* в вектор pUC19, так и кодонных вариантов этого гена для создания генетической библиотеки.

Цель данной работы – используя метод кольцевой полимеразной реакции, провести субклонирование последовательности кДНК гена глюкоамилазы *Aspergillus awamori* из конструкции pBGLA-1, созданной на основе вектора pBluescript II SK(-), в интегративный вектор для мицелиальных грибов pH4Nug с образованием плазмиды, содержащей ген *glaA* под собственным промотором. С помощью такой генетической конструкции можно осуществлять встраивание целевого гена с различными модификациями в геномную ДНК гриба, что открывает перспективы для получения штаммов *A. awamori*, синтезирующих и секретирующих глюкоамилазу с определенными промышленно значимыми характеристиками.

Объекты и методы исследования. Для амплификации кДНК, находящейся в составе вектора pBGLA-1 (50–250 нг), использовали смесь ферментов Taq-Pfu High Fidelity и соответствующий буфер ОДО «Праймтех», 0,2 ммоль/л дНТФ, праймеры *glaF* и *glaR* в концентрации 0,5 мкмоль/л каждый. Режим амплификации: предварительная денатурация – при 96 °С 2 мин (30 циклов); денатурация – при 94 °С 10 с, отжиг праймеров – при 62 °С 30 с, элонгация – при 72 °С 2 мин; финальная элонгация – при 72 °С 7 мин. Синтезированный ПЦР-продукт выделяли из геля и очищали с помощью набора реактивов Agarose Gel Extraction Kit фирмы Jena Bioscience в соответствии с рекомендациями производителя.

Синтез интегративного вектора для мицелиальных грибов в виде линейной структуры, содержащей промотор и терминатор целевого гена глюкоамилазы без кодирующей последовательности, осуществляли с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pH4NugglaA (50–250 нг), праймеров *glaAbf* и *glaAbr* в концентрации 0,5 мкмоль/л каждый, 0,2 ммоль/л дНТФ, фермента Diamant Pfu DNA-Polymerase и соответствующей буферной системы. Режим амплификации: предварительная денатурация – при 98 °С 30 с (30 циклов); денатурация – при 98 °С 10 с, отжиг праймеров – при 70 °С 30 с, элонгация – при 72 °С 4 мин; финальная элонгация – при 72 °С 5 мин. Синтезированный линейный ампликон вектора очищали от компонентов реакционной смеси путем переосаждения с использованием полиэтиленгликоля. Для этого

в ПЦР-смесь вносили раствор 5 моль/л NaCl до конечной концентрации 0,1 моль/л и 2,2 объема охлажденного 96 %-ного этанола. Смесь выдерживали при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. ДНК осаждали путем центрифугирования при 12 000 об/мин, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 мин. Осадок растворяли в 32 мкл воды (milli-Q), добавляли 8 мкл раствора 5 моль/л NaCl, 40 мкл 22 %-ного водного раствора полиэтиленгликоля-6000 и перемешивали. После инкубации на ледяной бане в течение 20 мин проводили центрифугирование при 12 000 об/мин, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5–10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в 20 мкл раствора ацетата натрия (0,3 моль/л), добавляли 2,5 объема 96 %-ного этанола, перемешивали, выдерживали на ледяной бане 15 мин. После центрифугирования (12 000 об/мин 15 мин) и удаления супернатанта в пробирки вносили 250 мкл 70 %-ного этанола и центрифугировали при 12 000 об/мин 5 мин. Полученные осадки высушивали, затем ресуспендировали в 20 мкл деионизированной воды, хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Электрофоретическое разделение ампликонов проводили в 0,8 %-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере с добавлением бромистого этидия в камере для горизонтального электрофореза фирмы BioRad. Их визуализацию осуществляли с помощью трансиллюминатора.

Клонирование кДНК в синтезированный линейный интегративный вектор проводили с помощью кольцевой полимеразной реакции. Реакционная смесь объемом 60 мкл состояла из следующих компонентов: 24 мкл 2,5×буфера для Diamant Pfu полимеразы, 3 мкл 100 нг/мкл ПЦР-продукта кДНК, 3 мкл 100 нг/мкл ПЦР-продукта вектора, 0,6 мкл фермента Diamant Pfu полимеразы, 29,4 мкл дистиллированной воды. Температурный профиль реакции: предварительная денатурация – при $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 с (20 циклов): денатурация – при $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 с, отжиг – при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 с, элонгация – при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 мин; финальная элонгация – при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 мин.

Для введения созданной генетической конструкции в клетки *Escherichia coli* XL1-Blue использовали метод электропорации. Для этого ночную культуру бактерий разводили в соотношении 1:25 свежим LB-бульоном и выращивали в условиях аэрации (180 об/мин) при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до достижения оптической плотности (OP_{600}), равной 0,4–0,6. Суспензию бактерий переносили в центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане в течение 15 мин. Клетки осаждали путем центрифугирования при 6000 об/мин, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 мин. Осадок бактерий ресуспендировали в половине исходного объема дистиллированной воды, охлажденной до $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, клетки концентрировали с помощью центрифугирования при 6000 об/мин, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 мин. Процедуру отмывания клеток повторяли дважды, в каждом последующем случае вдвое уменьшая объем воды. Клетки ресуспендировали в примерно равном объеме осадка количеству охлажденного 15 %-ного раствора глицерина в воде, замораживали при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Электропорацию проводили с помощью прибора MicroPulser фирмы Bio-Rad. При работе использовали электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 1 или 2 мм. К суспензии компетентных клеток в объеме 20 мкл (при использовании кюветы 1 мм) или 40 мкл (при использовании кюветы 2 мм) добавляли реакционную смесь после проведения СРЕС, перемешивали и вносили в предварительно охлажденную кювету. Последнюю помещали в электропоратор и подавали импульс тока с соответствующим кювете напряжением. После подачи импульса кювету извлекали и добавляли к клеткам 1 мл LB-бульона, содержащего 0,2 % глюкозы. Клетки инкубировали в течение 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем высевали на LB-агар с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл среды.

Для препаративного ПЦР-анализа клонов использовали два типа ПЦР-реакций. При первом типе применяли пару праймеров – glaA1f и glaA1r, при втором – glaAf и glaAr. В обоих случаях реакционная смесь объемом 15 мкл включала следующие компоненты: 1×буфер АМ фирмы «Праймтех», 0,2 ммоль/л дНТФ, 0,5 мкмоль/л каждого из праймеров, 0,025 Ед/мкл Taq полимеразы. Режим амплификации: предварительная денатурация – при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 мин (30 циклов): денатурация – при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 с, отжиг праймеров – при $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 с, элонгация – при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 мин; финальная элонгация – при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 мин.

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех», их нуклеотидная последовательность представлена в таблице.

Результаты и их обсуждение. Глюкоамилаза является широко востребованным в промышленности ферментом, используемым для обработки крахмалсодержащего сырья. Применение мицелиальных грибов в качестве продуцентов глюкоамилазы с определенными свойствами

Нуклеотидная последовательность прямых (f) и обратных (r) праймеров
The nucleotide sequence of forward (f) and reverse (r) primers

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'–3'
glaf	GCGACCTTGATTCGTGGTTGAGCAACGAAGCG
glar	CTACCGCCAGGTGTCAGTCACCGTCGCG
glaAbf	CGCTTCGTTGCTCAACCACGAATCCAAGGTCGC
glaAbr	CGCGACGGTGA CTGACACCTGGCGGTAG
glaA1f	CCGGATCCGGAGAATCAGCAGGAGCCATT
glaA1r	CCGGATCCGAGCCGATCAGACCAGTAGGT
glaAf	CCCCTCGAGAAAAGAGCGACCTTGGATTTCGTGGTTGAG
glaAr	CCCGAATTCCTACCGCCAGGTGTCAGTCACC

открывает перспективы существенного повышения эффективности технологического процесса. Создание таких продуцентов, обладающих способностью стабильно наследовать модифицированный ген *glaA*, синтезировать и секретировать кодируемый им фермент, стало возможным благодаря современным молекулярно-генетическим стратегиям, основанным на использовании интегративных векторов, которые позволяют встроить в грибной геном целевой ген.

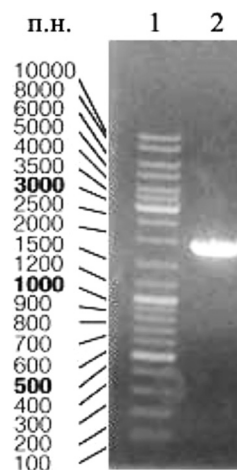
В данной работе для создания интегративного вектора для мицелиальных грибов с кДНК *A. awamori* в качестве исходных были использованы две ранее сконструированные плазмиды – pBGLA-1 и pH4HugglaA. Генетическая конструкция pBGLA-1, содержащая кДНК, была получена на основе вектора pBluescript II SK(-). Ее небольшой размер позволяет быстро проводить сайт-направленный мутагенез с целью введения точечных нуклеотидных замен, которые придадут ферменту определенные свойства. Плаزمида pH4HugglaA, сконструированная на основе вектора pH4Hug, имеет в составе полноразмерный ген *glaA* с промоторным и терминаторным участками. С целью замещения целевого гена на его кДНК вариант без использования рестриктаз и ДНК-лигазы среди различных методов был выбран высокоэффективный способ, основанный на применении кольцевой полимеразной реакции. Для реализации этой реакции необходимы ампликоны вставки и вектора, фланкированные на обоих концах перекрывающимися комплементарными участками. С целью получения таких ПЦР-продуктов были сконструированы две пары праймеров (glaf, glar и glaAbf, glaAbr), с помощью которых синтезировали фрагменты вставки и вектора, соответствующие указанным выше требованиям.

В результате реакции амплификации с использованием пары праймеров glaf, glar и в качестве матрицы плазмиды pBGLA-1 получен ампликон кДНК размером около 1800 п. н. (рис. 1). ПЦР-продукт был очищен от компонентов реакционной среды с помощью коммерческого набора реактивов Agarose Gel Extraction Kit фирмы Jena Bioscience согласно рекомендациям производителя.

Интегративный вектор для мицелиальных грибов с полноразмерным геном глюкоамилазы pH4HugglaA являлся матрицей в реакции амплификации, в результате которой синтезировался его линейный вариант с промотором и терминатором целевого гена без кодирующей последовательности. ПЦР осуществляли с использованием праймеров glaAbf и glaAbr, фермента Diamant Pfu DNA-Polymerase и соответствующей буферной системы. Поскольку эффективность реакции была низкой и количество синтезированного ампликона являлось недостаточным для осуществления последующего субклонирования, проводили тестирование градиента температуры отжига праймеров в пределах от 66 до 72 °С. В результате оптимизации условий ПЦР было установлено, что в данной реакционной системе наибольшее

Рис. 1. Электрофореграмма ампликона, полученного с использованием плазмидной ДНК pBGLA-1 и специфических праймеров к кДНК гена *glaA* *A. awamori*. 1 – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific), 2 – амплифицированная кДНК глюкоамилазы

Fig. 1. Agarose electrophoresis of PCR amplicon obtained by PCR with plasmid DNA pBGLA-1 and gene-specific primers for cDNA *glaA* gene from *A. awamori*. 1 – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific), 2 – amplified cDNA glucoamylase



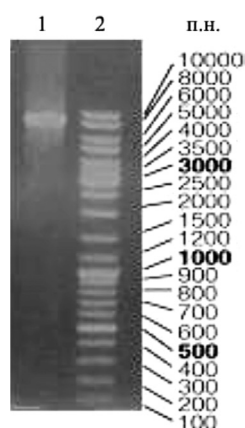


Рис. 2. Электрофореграмма ампликона вектора рН4Hyg в линейной форме с промотором и терминатором гена *glaA* *A. awamori*. Ампликон получен с использованием плазмиды рН4HygglaA, праймеров *gla6f* и *gla6r*. 1 – ПЦР-продукт, 2 – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

Fig. 2. Amplification of linear рН4Hyg vector with promoter and terminator of the *glaA* gene from *A. awamori*. Amplicon was obtained with the рН4HygglaA plasmid, *gla6f* and *gla6r* primers. 1 – PCR product, 2 – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

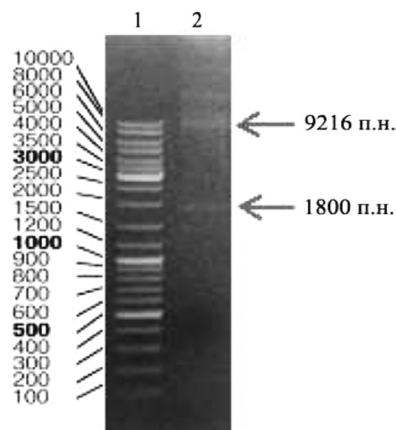
количество продукта синтезируется при температуре отжига праймеров 70 °С. С целью подтверждения образования ампликона ожидаемого размера 7400 п. н. было проведено электрофоретическое разделение ПЦР-продукта (рис. 2). Для выделения из геля и очистки ампликона вектора использовали полиэтиленгликоль.

Как показал обзор литературных данных, где представлены преимущества применения метода СРЕС, для получения конечной генетической конструкции в каждом конкретном случае требуется подбор условий реакции, таких как количество циклов реакции, молярное соотношение вектора и вставки, тип полимеразы, буферные системы и др. [12–14].

В данной работе в результате оптимизации реакции СРЕС линейные ПЦР-продукты вектора и кДНК были разбавлены до концентрации 100 нг/мкл. С помощью ферментной системы Diamant Pfu DNA-Polymerase после 20 циклов реакции удалось объединить молекулы вектора и вставки с образованием конечной генетической конструкции ожидаемого размера – 9216 п. н. (рис. 3).

Введение созданной плазмиды в клетки бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue осуществляли методом электропорации с использованием СРЕС-смеси после проведения объединяющей реакции. Трансформанты высевали на LB-агар с добавлением в качестве селективного агента ампициллина в концентрации 100 мкг/мл. Полученные клоны анализировали с помощью двух типов препаративной ПЦР, в которых матрицей являлись плазмидные ДНК колоний бактерий. В случае эффективного субклонирования в составе вектора рН4HygglaA в гене глюкоамилазы кодирующая последовательность полноразмерного гена с интронами была заменена на кДНК, при этом участки промотора и терминатора остались от исходного гена. Следует отметить, что среди трансформантов могли быть варианты с векторами рН4HygglaA и рBGLA-1, поскольку некоторое количество их ДНК остается в ПЦР-продуктах после очистки и попадает в реакционную смесь СРЕС. Однако при использовании праймеров к промотору и терминатору гена глюкоамилазы (*glaA1f* и *glaA1r*), а также в качестве матрицы конструкции рBGLA-1 ПЦР-продукт не синтезируется, поскольку эта плазида содержит только кДНК целевого гена. В случае использования вектора рН4HygglaA ампликон будет образовываться так же, как и при эффективно объединенной конструкции, однако размер его будет больше в связи с наличием интронов в гене.

В другом типе ПЦР с праймерами *glaAf* и *glaAr*, с помощью которых амплифицируется как полноразмерный ген *glaA*, так и кДНК, отличить конечную генетическую конструкцию рН4HygPTgla от исходного варианта рН4HygglaA можно по размеру ПЦР-продукта, который будет на 257 п. н. меньше, что соответствует интронной области гена.



В результате проведенных ПЦР с двумя типами пар праймеров, как продемонстрировано на электрофореграммах рис. 4, выявлена ожидаемая разница в размерах ампликонов, полученных с использованием исходного вектора рН4HygglaA, и конструкции,

Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов реакции СРЕС после 20 циклов. 1 – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific); 2 – размер плазмиды рН4HygPTgla, синтезированной в результате реакции, составил 9216 п. н., фрагмент размером 1800 п. н. соответствует не встроенному в вектор ампликону кДНК гена *glaA*

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis of the СРЕС reaction product after 20 cycles of the reaction. 1 – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific), 2 – the assembled full-length рН4HygPTgla plasmid is 9216 bp, the 1800 bp band is free PCR product of the cDNA *glaA* gene

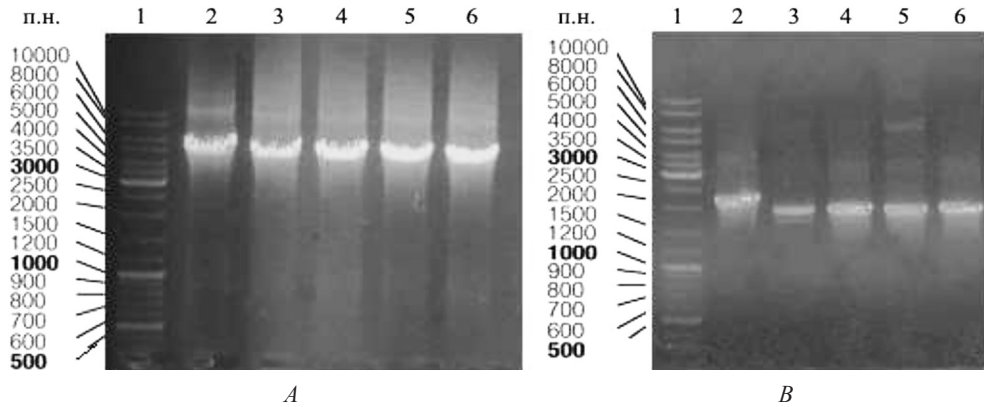


Рис. 4. Электрофоретический анализ ампликонов, полученных с использованием колоний трансформантов *E. coli* XL1-Blue, на присутствие в клетках сконструированной с помощью стратегии CPEC плазмиды pH4HygPTgla, содержащей кДНК гена *glaA*. ПЦР-продукты получены с использованием праймеров *glaA1f*, *glaA1r* (A), *glaAf*, *glaAr* (B), плазмиды pH4HygglA (2), колоний (3–6). 1 – ДНК-маркер (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

Fig. 4. Gel electrophoresis analysis of the cDNA *glaA* insert amplified from independent colonies *E. coli* XL1-Blue with the pH4HygPTgla plasmid constructed using the CPEC strategy. PCR amplicons were obtained with primers *glaA1f*, *glaA1r* (A), *glaAf*, *glaAr* (B), plasmid pH4HygglA (2), colonies (3–6). 1 – DNA marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

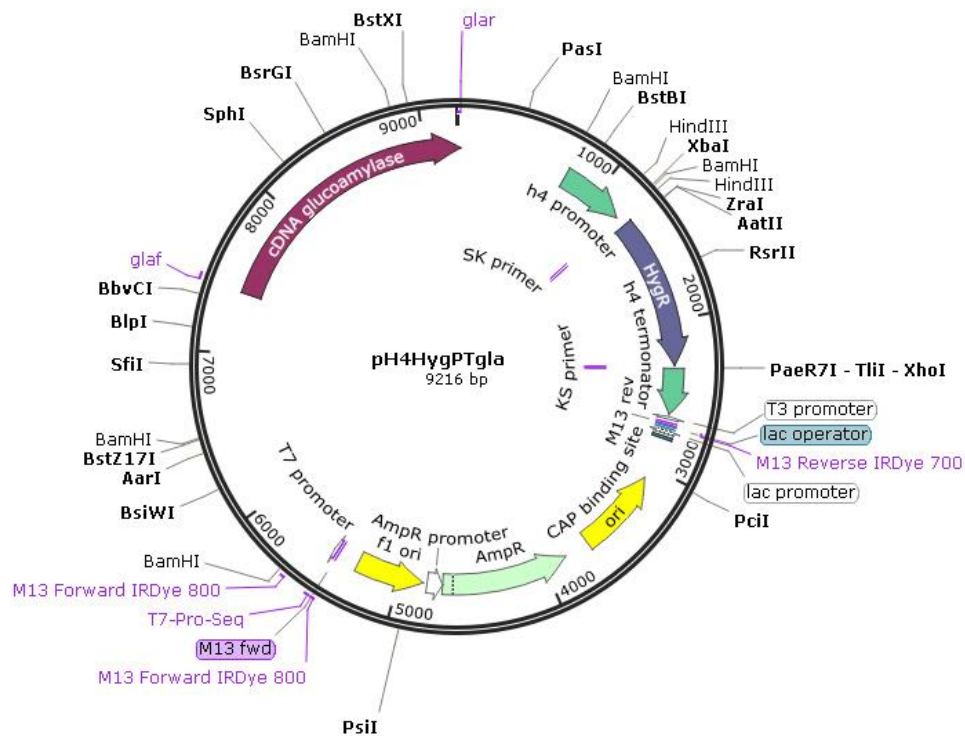


Рис. 5. Генетическая карта плазмиды pH4HygPTgla

Fig. 5. Genetic map of the pH4HygPTgla plasmid

объединенной в реакции CPEC, которая находилась в бактериальных клетках анализируемых клонов. Эти данные указывают на успешное клонирование кДНК в интегративный вектор. Впоследствии из клеток трансформантов, в которых подтверждено наличие сконструированной плазмиды, осуществляли выделение последней.

С помощью программы SnapGene была построена генетическая карта созданной плазмиды pH4HygPTgla (рис. 5).

Заключение. С использованием метода кольцевой полимеразной реакции создана генетическая конструкция pH4HygPTgla на основе интегративного вектора для мицелиальных грибов

pH4HygglA, в котором кодирующая последовательность полноразмерного гена глюкоамилазы *A. awamori* с интронами заменена на кДНК, при этом участки промотора и терминатора остались от исходного целевого гена. Полученная плазмидная ДНК может найти применение при создании штаммов *A. awamori*, синтезирующих и секретирующих глюкоамилазу с определенными промышленно значимыми характеристиками.

Список использованных источников

1. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering / J. Sauer [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Protein Str. Mol. Enzym.* – 2000. – Vol. 1543, N 2. – P. 275–293. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00232-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00232-6)
2. Marín-Navarro, J. Glucoamylases: structural and biotechnological aspects / J. Marín-Navarro, J. Polaina // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 89, N 5. – P. 1267–1273. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3034-0>
3. Грачева, И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – М. : Элевар, 2000. – 512 с.
4. Kumar, P. Microbial glucoamylases: characteristics and applications / P. Kumar, T. Satyanarayana // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 29, N 3. – P. 225–255. <https://doi.org/10.1080/07388550903136076>
5. Coutinho, P. M. Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships / P. M. Coutinho, P. J. Reilly // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* – 1997. – Vol. 29, N 3. – P. 334–347. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(199711\)29:3<334::aid-prot7>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(199711)29:3<334::aid-prot7>3.0.co;2-a)
6. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases / D. G. Gibson [et al.] // *Nat. Meth.* – 2009. – Vol. 6, N 5. – P. 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
7. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome / D. G. Gibson [et al.] // *Science.* – 2010. – Vol. 329, N 5987. – P. 52–56. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>
8. Rapid hierarchical assembly of medium-size DNA cassettes / J. L. Schmid-Burgk [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2012. – Vol. 40, N 12. – P. e92. <https://doi.org/10.1093/nar/gks236>
9. Datsenko, K. A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K. A. Datsenko, B. L. Wanner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, N 12. – P. 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
10. Watson, J. F. *In vivo* DNA assembly using common laboratory bacteria: a re-emerging tool to simplify molecular cloning / J. F. Watson, J. García-Nafria // *J. Biol. Chem.* – 2019. – Vol. 294, N 42. – P. 15271–15281. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.009109>
11. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFs / A. J. M. Walhout [et al.] // *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins – Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics* / ed. : J. Thorner, S. D. Emr, J. N. Abelson. – New York ; London, 2000. – P. 575–592. – (Methods in Enzymology ; Vol. 328).
12. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PloS ONE.* – 2009. – Vol. 4, N 7. – P. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
13. Bryksin, A. V. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids / A. V. Bryksin, I. Matsumura // *Biotechniques.* – 2010. – Vol. 48, N 6. – P. 463–465. <https://doi.org/10.2144/000113418>
14. Zuo, P. One-step DNA fragment assembly and circularization for gene cloning / P. Zuo, A. B. M. Rabie // *Curr. Iss. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 12, N 1. – P. 11–16.

References

1. Sauer J., Sigurskjold B. W., Christensen U., Frandsen T. P., Mirgorodskaya E., Harrison M., Roepstorff P., Svensson B. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, vol. 1543, no. 2, pp. 275–293. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00232-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00232-6)
2. Marín-Navarro J., Polaina J. Glucoamylases: structural and biotechnological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 89, no. 5, pp. 1267–1273. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3034-0>
3. Gratcheva I. M., Krivova A. Yu. *Enzyme technology*. Moscow, Elevar Publ., 2000. 512 p. (in Russian).
4. Kumar P., Satyanarayana T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2009, vol. 29, no. 3, pp. 225–255. <https://doi.org/10.1080/07388550903136076>
5. Coutinho P. M., Reilly P. J. Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1997, vol. 29, no. 3, pp. 334–347. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(199711\)29:3<334::aid-prot7>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(199711)29:3<334::aid-prot7>3.0.co;2-a)
6. Gibson D. G., Young L., Chuang R.-Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 2009, vol. 6, no. 5, pp. 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
7. Gibson D. G., Glass J. I., Lartigue C., Noskov V. N., Chuang R. Y., Algire M. A. [et al.]. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, vol. 329, no. 5987, pp. 52–56. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>
8. Schmid-Burgk J. L., Xie Z., Frank S., Winter S. V., Mitschka S., Kolanus W., Murray A., Benenson Y. Rapid hierarchical assembly of medium-size DNA cassettes. *Nucleic Acids Research*, 2012, vol. 40, no. 12, p. e92. <https://doi.org/10.1093/nar/gks236>
9. Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

10. Watson J. F., García-Nafría J. *In vivo* DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, vol. 294, no. 42, pp. 15271–15281. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.009109>
11. Walhout A. J. M., Temple G. F., Brasch M. A., Hartley J. L., Lorson M. A., van den Heuvel S., Vidal M. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology. Vol. 328. Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins – Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics*. New York, London, 2000, pp. 575–592. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)28419-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)28419-x)
12. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 7, p. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
13. Bryksin A. V., Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 2010, vol. 48, no. 6, pp. 463–465. <https://doi.org/10.2144/000113418>
14. Zuo P., Rabie A. B. M. One-step DNA fragment assembly and circularization for gene cloning. *Current Issues in Molecular Biology*, 2009, vol. 12, no. 1, pp. 11–16.

Информация об авторах

Кулик Елена Вячеславовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alena.kulik31@gmail.com

Селезнева Юлия Валерьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mamalanka@mail.ru

Качан Александр Вячеславович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: av.kachan@mail.ru

Русь Ольга Борисовна – канд. хим. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zrbio@mail.ru

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

Information about the authors

Alena V. Kulik – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alena.kulik31@gmail.com

Yuliya V. Selezneva – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mamalanka@mail.ru

Alexandr V. Kachan – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: av.kachan@mail.ru

Olga B. Rus – Ph. D. (Chem.), Assistant Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zrbio@mail.ru

Anatoliy N. Evtushenkov – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: evtushenkov@bsu.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.212.3:616-053.32

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-328-341>

Поступила в редакцию 21.02.2020

Received 21.02.2020

О. М. Малышева¹, Е. П. Михаленко¹, А. П. Сухарева²,
М. В. Артюшевская³, Н. Г. Ситник², Г. В. Кулакова²,
И. В. Жевнеронок³, А. В. Кильчевский¹, Г. А. Шишко³

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Клинический родильный дом Минской области, Минск, Республика Беларусь

³Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ИНВАЛИДИЗИРУЮЩИХ ПОСЛЕДСТВИЙ У НЕДОНОШЕННОГО НОВОРОЖДЕННОГО

Аннотация. Представлен клинический случай проявления первичной врожденной глаукомы, синдрома дыхательных расстройств, бронхолегочной дисплазии, ретинопатии и перивентрикулярной лейкомаляции у недоношенного новорожденного. Для поиска патогенных вариантов использован метод высокопроизводительного полноэкзомного секвенирования. Учитывая данные о многофакторной этиологии исследуемых осложнений, проанализированы гены белков сурфактанта и гены, ассоциированные с ангиогенезом, ренин-ангиотензиновой и антиоксидантной системами. Выявлены молекулярно-генетические факторы риска развития врожденной глаукомы у недоношенного новорожденного: р.Е229К *CYP11B1* и р.Р76К *MYOC*, а также полиморфные варианты в генах белков сурфактанта *SFTPB* (rs1130866, VNTR интрона 4) и *SFTPC* (rs4715, rs1124), фактора роста эндотелия сосудов *VEGFA* (rs2010963), синтазы оксида азота 3 *NOS3* (rs1799983), белка связывания инсулиноподобного фактора роста 3 *IGFBP3* (rs2854746), каталазы *CAT* (rs7943316), ассоциированных с развитием исследуемых инвалидизирующих осложнений.

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, синдром дыхательных расстройств, бронхолегочная дисплазия, ретинопатия, глаукома, секвенирование

Для цитирования: Роль генетических нарушений в формировании инвалидизирующих последствий у недоношенного новорожденного / О. М. Малышева [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 328–341. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-328-341>

Volha M. Malyshava¹, Alena P. Mikhalenka¹, Anastasiya P. Suharava²,
Maryna V. Artsiusheuskaya³, Nadzeya G. Sitnik², Galina V. Kulakova², Iryna V. Ghevneronak³,
Aleksandr V. Kilchevsky¹, Georgiy A. Shyshko³

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Clinical Maternity Hospital of Minsk Region, Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

THE ROLE OF GENETIC DISORDERS IN THE FORMATION OF DISABLING EFFECTS IN THE PREMATURE NEWBORN

Abstract. A clinical case of primary congenital glaucoma, respiratory distress syndrome, bronchopulmonary dysplasia, retinopathy and periventricular leukomalacia in a premature newborn is presented. The search for pathogenic variants by the method of new generation whole exome sequencing was performed. The genes of surfactant proteins, genes associated with angiogenesis, renin-angiotensin and antioxidant systems were analyzed, considering the data on the multifactorial etiology of the studied complications. The molecular genetic factors for congenital glaucoma development in the premature newborn were revealed: p.E229K *CYP11B1* and p.R76K *MYOC*, as well as polymorphisms in the genes of surfactant proteins *SFTPB* (rs1130866, VNTR intron 4) and *SFTPC* (rs4715, rs1124), vascular endothelial growth factor *VEGFA* (rs2010963), nitric oxide synthase 3 *NOS3* (rs1799983), insulin growth factor binding protein 3 *IGFBP3* (rs2854746), catalase *CAT* (rs7943316), associated with the development of the studied disabling complications in the premature newborn.

Keywords: prematurity, respiratory distress syndrome, bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, glaucoma, sequencing

For citation: Malyshava V. M., Mikhalenka A. P., Suharava A. P., Artsiusheuskaya M. V., Sitnik N. G., Kulakova G. V., Ghevneronak I. V., Kilchevsky A. V., Shyshko G. A. The role of genetic disorders in the formation of disabling effects in the premature newborn. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 328–341 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-328-341>

Введение. За последние годы уровень младенческой смертности в Республике Беларусь заметно снизился. Однако заболеваемость новорожденных остается стабильно высокой, что вносит значительный вклад в структуру ранней детской инвалидизации. У каждого пятого недоношенного ребенка развивается осложнение в виде бронхолегочной дисплазии (БЛД), ретинопатии недоношенных (РН) и перивентрикулярной лейкомаляции (ПВЛ), прогрессирование которых приводит к ухудшению качества жизни и возможной инвалидизации. Прогрессирование ретинопатии может вызвать отслойку сетчатки, развитие близорукости, вторичной глаукомы, слепоты. К последствиям БЛД относятся хроническая дыхательная недостаточность, бронхиальная астма, альвеолиты, ателектазы; к ПВЛ – эпилепсия, детский церебральный паралич, судороги, нарушение интеллектуального развития, снижение остроты зрения и слуха.

С точки зрения генетики БЛД, РН и ПВЛ являются мультифакторными заболеваниями, развитие которых обусловлено сложным взаимодействием множества генов и факторов внешней среды. При исследовании взаимодействия между БЛД, РН и ПВЛ обнаружена тесная связь БЛД с РН и ПВЛ. Эти заболевания имеют как уникальные, так и общие факторы риска. Экстремально низкая масса тела при рождении, мужской пол и длительная искусственная вентиляция легких (ИВЛ) с кислородотерапией вносят вклад в развитие БЛД и РН, а хориоамнионит (воспаление плодных оболочек во время беременности и родов), синдром дыхательных расстройств тяжелой степени, длительная ИВЛ и воспаление являются общими факторами риска развития БЛД и ПВЛ [1].

Первичная врожденная глаукома (ПВГ) является причиной детской слепоты в 5 % случаев [2]. В большинстве случаев врожденная глаукома – явление спорадическое, с рецессивным наследованием и почти полной пенетрантностью в популяциях с высоким уровнем кровного родства. Снижение пенетрантности (до 40 % в некоторых популяциях) и наличие различных фенотипических форм может свидетельствовать о полигенной наследственности или многофакторной этиологии [3].

Цель настоящей работы – поиск молекулярно-генетических детерминант инвалидирующих последствий у недоношенного новорожденного.

Объекты и методы исследования. Проведен анализ результатов клинического обследования недоношенного новорожденного весом 1080 г в сроке гестации 29 недель с синдромом дыхательных расстройств тяжелой степени тяжести.

Выполнено молекулярно-генетическое обследование ребенка и родителей. Материалом для генетического обследования ребенка послужила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов пуповинной крови методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К [4]; для генетического обследования родителей – геномная ДНК, выделенная из буккального эпителия с помощью коммерческого набора ExtractDNA Blood («Евроген», Россия).

Для поиска у ребенка патогенных вариантов, ассоциированных с БЛД, РН и врожденной глаукомой, применяли метод высокопроизводительного секвенирования, используя панель Nextera DNA Exome (Illumina), на секвенаторе NextSeq 550 (Illumina). Последующую обработку полученных данных (fastq-файлы) осуществляли с помощью алгоритма Dragen Basespace (Illumina). Для аннотирования результатов (vcf-файл) использовали онлайн-ресурс wANNOVAR [5]. Фильтрацию вариантов при поиске патогенных проводили в следующем порядке: 1) некодирующие (интронные) варианты без изменения сайтов сплайсинга удаляли; 2) синонимичные варианты без изменения сайтов сплайсинга удаляли; 3) полиморфизмы с незначительной частотой встречаемости аллелей (MAF) 1 % и более в базах данных 1000Genome, ExAc, GnomadGenome, GnomadExome исключали; 4) миссенс-варианты, которые, согласно программам предсказания PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) и Mutation Taster (<http://mutationtaster.org/>), одинаково благоприятны для функции белка, удаляли; 5) обнаруженные варианты в генах, влияющих на функциональную активность белков, участвующих в патогенезе перинатальных осложнений, отбирали для дальнейших проверки и анализа.

При поиске полиморфных вариантов, ассоциированных с развитием осложнений перинатального периода, алгоритм поиска в выборке осуществляли в следующем порядке: 1) удаляли варианты с частотой встречаемости меньше 5 % и больше 95 %; 2) оставляли гены *SFTPB*, *SFTPC*, *VEGFA*, *KDR*, *FLT1*, *NOS3*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP3*, *HIF1*, *AGT*, *ACE*, *AGTR1*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *CAT*,

GPXI, полиморфные варианты которых могут вносить определенный вклад в развитие БЛД, РН и ПВЛ.

Для подтверждения обнаруженных у ребенка изменений, а также наличия или отсутствия их у родителей проводили прямое и обратное секвенирование по Сэнгеру.

Для амплификации фрагмента 2-го экзона гена *CYP11B1* и фрагмента 1-го экзона гена *MYOC* были использованы следующие пары олигонуклеотидных праймеров (последовательность 5'→3'): прямой – CAT TTC TCC AGA GAG TCA GC и обратный – GCT TGC AAA CTC AGC ATA TTC [6]; прямой – CCA AAC AGA CTT CTG GAA GG и обратный – TAG CAG GTC ACT ACG AGC C [2] соответственно. Общие условия ПЦР для обеих пар праймеров подобраны экспериментально: 1 мин денатурации при температуре 95 °С, далее 35 циклов: 30 с при 95 °С, 30 с при 56 °С, 60 с при 72 °С, завершающий шаг – 5 мин при 72 °С. Нуклеотидную последовательность определяли методом прямого и обратного секвенирования на автоматическом анализаторе Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. Полученные последовательности ДНК анализировали в программе SequenceScanner v1.0.

В ходе работы были соблюдены принципы добровольности и конфиденциальности в соответствии с международными нормами [7]. Получено разрешение комитета по этике БелМАПО на проведение исследования.

Результаты и их обсуждение. Недоношенная девочка родилась в сроке гестации 29 недель от второй беременности (первая беременность трубная) первых преждевременных родов путем экстренного кесарева сечения по показаниям плода.

Данные акушерского анамнеза: возраст матери на момент родов 28 лет; экстрагенитальная патология – хронический гастрит в стадии ремиссии. Из особенностей течения беременности: угроза выкидыша в 5–6 недель, острая респираторная инфекция без повышения температуры тела в 12 и 16 недель, угроза преждевременных родов, истмико-цервикальная недостаточность в 28–29 недель.

Объективные данные и данные инструментальных исследований в первые сутки жизни: состояние ребенка с рождения тяжелое, обусловленное синдромом дыхательных расстройств, недоношенностью. В родильном зале эндотрахеально введен препарат сурфактанта «Куросурф». На искусственной вентиляции легких в условиях транспортного кувеза ребенок переведен в отделение анестезиологии и реанимации (для новорожденных детей). Диагноз при рождении: синдром дыхательных расстройств, дыхательная недостаточность III степени, недоношенность (29 недель).

На первые сутки жизни проведена рентгенография органов грудной клетки. Выявлены болезнь гиалиновых мембран II степени, гиперплазия тимуса и декстрокардия.

Для верификации рентгенологических данных выполнена ЭХО-КТ, в результате которой подтверждена декстрокардия, обнаружены открытый артериальный проток и открытое овальное окно.

По данным нейросонографии, в первые сутки жизни у младенца имелись признаки недоношенности и крайней незрелости головного мозга.

До 36-х суток жизни ребенок выхаживался и получал лечение в отделении реанимации.

До 19-х суток ребенок находился на искусственной вентиляции легких в режимах CMV (continuous mandatory ventilation), SIMV (synchronized intermittent mandatory ventilation) (рис. 1).

На 19-е сутки жизни ребенок П. переведен на неинвазивную вентиляцию (nCPAP), с 23-х суток – на самостоятельном дыхании. Кислородозависимость сохранялась до 64-х суток жизни на фоне перорального приема микродоз дексаметазона с последующим переходом на ингаляционные глюкокортикостероиды (рис. 2).

Наблюдалась относительно стабильная гемодинамика на фоне проводимой волемической и кардиотонической терапии (дофамин – 1–2 раза в сутки, норадреналин – со 2-х по 5-е сутки).

Энтеральное трофическое питание ребенок получал с рождения, а к концу раннего неонатального периода он усваивал его энтерально в полном объеме.

Анемический синдром, развившийся на 9-е сутки жизни (эритроциты $3,32 \cdot 10^9$, гемоглобин 112 г/л), был купирован путем переливания отмытых эритроцитов (эритроциты $4,97 \cdot 10^9$, гемоглобин 160 г/л).

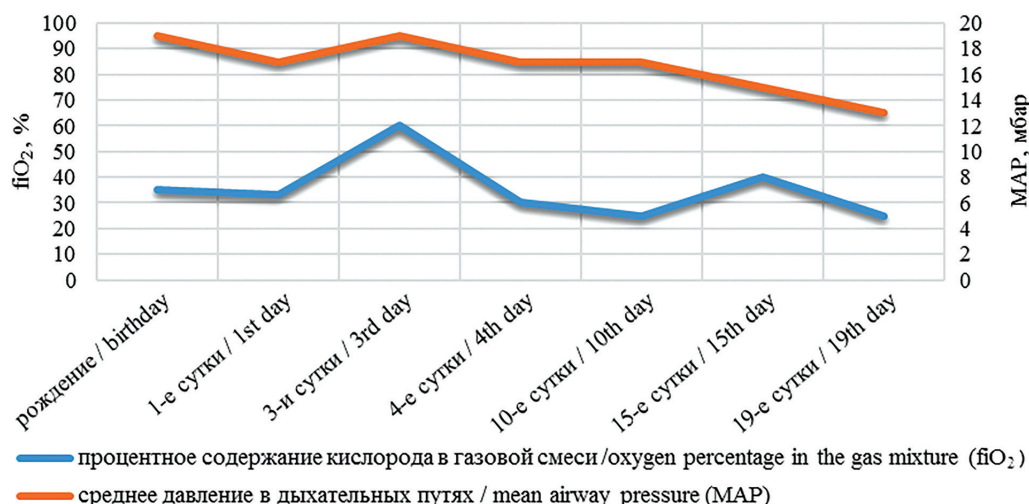


Рис. 1. Динамика основных параметров искусственной вентиляции легких ребенка П.: содержания кислорода в газовой смеси (fIO₂) и среднего давления в дыхательных путях (MAP)

Fig. 1. The dynamics of the main parameters of mechanical ventilation of the child P.: oxygen content in the gas mixture (fIO₂) and mean airway pressure (MAP)

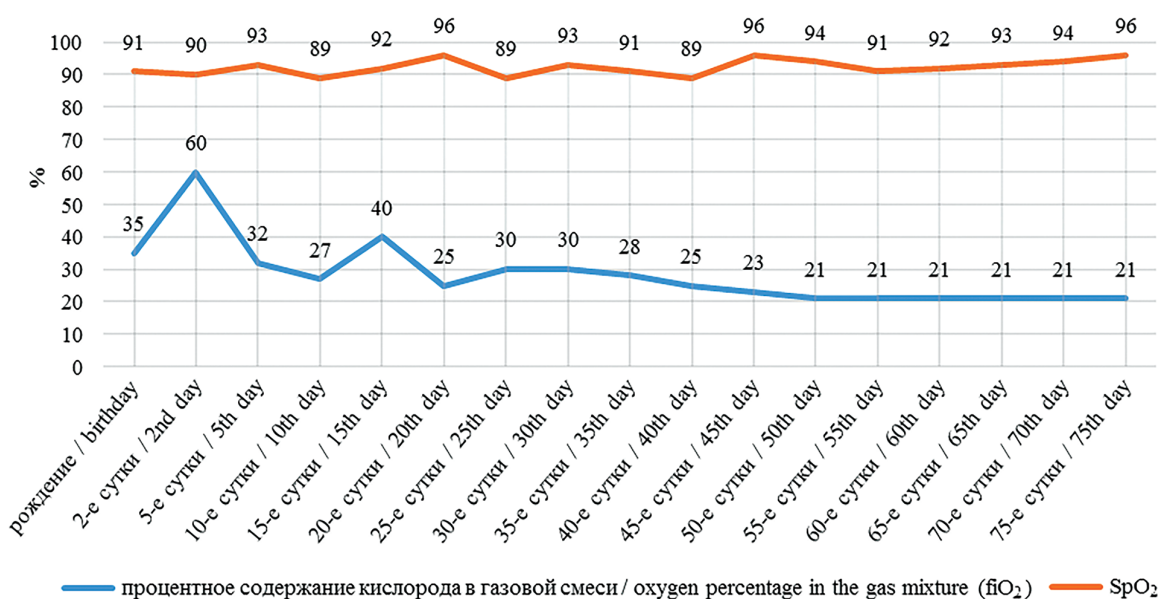


Рис. 2. Динамика кислородозависимости и сатурации (SpO₂) ребенка П.

Fig. 2 Dynamics of oxygen dependence and saturation (SpO₂) of the child P.

Выполненная на 2-е сутки жизни рентгенограмма органов грудной клетки показала врожденную пневмонию, болезнь гиалиновых мембран, гиперплазию тимуса, декстрокардию. Рентгенограмма органов грудной клетки на 23-и сутки жизни выявила декстрокардию, врожденную пневмонию (период реконвалесценции), бронхолегочную дисплазию, гиперплазию тимуса.

По результатам ультразвукового исследования головного мозга у ребенка П. на 16-е сутки жизни отмечались: гипоксически-ишемическое поражение головного мозга в лобных областях, над затылочными рогами в бассейне средней мозговой артерии с обеих сторон, кистозная дегенерация, венрикуломегалия боковых желудочков мозга, признаки недоношенности и незрелости.

При осмотре окулистом в 35 недель у ребенка диагностирована ретинопатия II степени обоих глаз (активная фаза).

Ребенок выписан из стационара на 79-е сутки жизни с диагнозом бронхолегочная дисплазия, дыхательная недостаточность 0–I степени, энцефалопатия недоношенного, перивентрикулярная

лейкомаляция, анемия недоношенного, декстрокардия, функционирующее овальное окно, ретинопатия II степени обоих глаз, недоношенность (29 недель), очень низкая масса тела при рождении.

В последующем ребенку диагностирована врожденная глаукома, проведена операция по имплантации клапанного дренажного устройства.

Обследование неврологом в 8 мес. показало выраженную задержку преимущественно моторного развития с формирующимся спастическим тетрапарезом, провоцируемым миоклониями, вентрикуломегалией (субатрофической) вследствие тяжелого перинатального поражения центральной нервной системы и недоношенности.

Осмотр в 11 мес. показал, что пациент П. плохо видит, не переворачивается, не садится, не ползает. Физическое развитие дисгармоничное: вес 6900 г (ниже 3 центиля), рост 73 см (50 центиль). Признаков дыхательной и сердечной недостаточности нет. При обследовании узкими специалистами выданы следующие заключения и рекомендации: врожденная глаукома, оперированная, РН II степени, II и III зоны, рекомендована очковая коррекция (окулист); бронхолегочная дисплазия средней степени тяжести в ремиссии, дыхательная недостаточность 0-й степени, декстрокардия (пульмонолог); праворасположенное, неопределенно сформированное сердце, открытый артериальный проток, недостаточность кровообращения 0-й степени, рекомендовано: прием препарата «Алмиба», контроль частоты сердечных сокращений, частоты дыхания, размеров печени, наблюдение у кардиолога, плановая консультация кардиохирурга (кардиолог); задержка в развитии ориентировочно-познавательных и звуковых реакций в доречевом периоде (дефектолог); множественные пороки развития: декстрокардия, глаукома врожденная, спастический тетрапарез с выраженными двигательными нарушениями и задержкой психоречевого развития, судорожным синдромом (фармакологическая ремиссия) на фоне маляции белого вещества головного мозга и внутренней компенсированной гидроцефалии (невролог).

По данным магнитно-резонансной томографии головного мозга, имеются признаки неокклюзионной гидроцефалии, наблюдается минимальное расширение наружного субарахноидального пространства. При этом отмечается не истинная гидроцефалия, а гидроцефалия как результат массивной лейкомаляции и слияния полостей по мере лизиса белого вещества с желудочковой системой.

Проведенный анализ на кариотип не выявил нарушений.

В ходе проведенного исследования по выявлению патогенных вариантов, ассоциированных с врожденной глаукомой, у пробанда обнаружены несинонимичная гетерозиготная замена во 2-м экзоне гена *CYP11B1* p.E229K и несинонимичная гетерозиготная замена в 1-м экзоне гена *MYOC* p.R76K. Отец пробанда являлся гетерозиготным носителем обоих выявленных вариантов, мать – носителем только гетерозиготного варианта гена *MYOC* (рис. 3).

Мутации в гене *CYP11B1* были первыми выявленными мутациями у пациентов с ПВГ [8], в настоящее время известно около 150 патогенных вариантов в этом гене, вызывающих ПВГ [9].

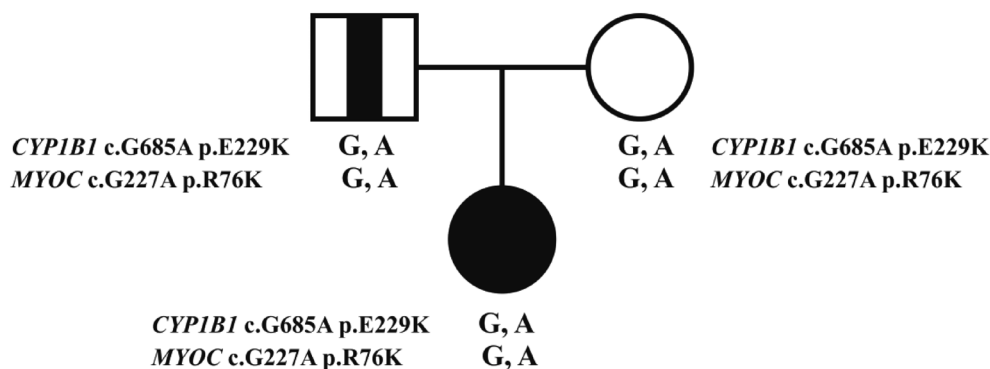


Рис. 3. Родословная семьи недоношенного новорожденного с врожденной глаукомой с указанием аллелей *MYOC* и *CYP11B1*: пораженный пробанд выделен черным цветом, отец (носитель патологического варианта на доклинической стадии) – неполным закрашиванием

Fig. 3. Pedigree showing the *MYOC* и *CYP11B1* sequence variants in primary congenital glaucoma family: the affected child is highlighted in black; the father (carrier of the pathological variant at the preclinical stage) is incomplete fill

Наследование происходит по аутосомно-рецессивному типу и характеризуется вариабельной пенетрантностью. Ген *CYP1B1* расположен на 2-й хромосоме в локусе p22–p21 и состоит из трех экзонов, 2 из которых (2 и 3) являются кодирующими. Белок цитохром P4501B1, кодируемый геном *CYP1B1*, состоит из 543 аминокислот и экспрессируется в различных тканях, в том числе в тканях глаза [10]. Цитохром P4501B1 катализирует некоторые окислительные реакции, продуцируя необходимые гормоны и соединения промежуточного метаболизма большинства живых организмов, включая ксенобиотики, витамины и стероиды. Фермент участвует также в метаболизме витамина А до образования трансретинальной и трансретиноевой кислот. Последняя является мощным морфогеном, регулирующим во время внутриутробного развития рост и дифференцировку тканей. Белок P4501B1 также вовлечен в метаболизм эндогенных и экзогенных субстратов, которые участвуют в ранней дифференцировке тканей глаза [10].

Несинонимичный вариант p.E229K (rs57865060) в гене *CYP1B1* заключается в замене гуанина (G) на аденин (A) в положении с.685, в результате чего глутаминовая кислота (Glu, E) замещается на лизин (Lys, K) в положении 229 зрелого белка. В структуре глутаминовой кислоты имеется отрицательно заряженный остаток, в структуре лизина – положительно заряженная боковая цепь, аминокислотная замена p.E229K влияет на локальное распределение заряда в белке, в результате чего теряется взаимодействие между аргинином в положении 194 белка и глутаминовой кислотой, что может дестабилизировать другие ионные взаимодействия в цитохроме и влиять на его трехмерную структуру [10]. Ферментативная активность цитохрома P4501B1 с лизином в положении 229 на 26–40 % выше, чем в белке дикого типа [11]. По последним данным, эту замену относят к аллелю риска, который может привести к развитию глаукомы в присутствии модификаторов или под влиянием окружающей среды [12]. К таким модификаторам у данного ребенка можно отнести недоношенность (незрелость органов и систем), наличие ретинопатии и фонового гаплотипа гена *CYP1B1*: полиморфизмы p.V432L (rs1056836), p.A119S (rs1056827), p.R48G (rs10012) и –12T>C (rs2617266) в гетерозиготном состоянии, которые, как предполагается, приводят к снижению ферментативной активности и субстратной специфичности цитохрома [13].

Одним из генов, который также связывают с развитием глаукомы, является ген *MYOC*, кодирующий белок миоцилин. Ген расположен на 1-й хромосоме в локусе q24.3–q25.2, состоит из 3 экзонов. Промоторная область гена содержит более 10 гормонорегуляторных элементов, в том числе для глюкокортикостероидов, эстрогенов, прогестерона и тиреоидных гормонов [14]. Миоцилин с патогенными вариантами может изменять трабекулярную сеть и архитектуру цилиарного тела, препятствуя оттоку жидкости и увеличивая внутриглазное давление [2].

Ген *MYOC* кодирует протеин, состоящий из 504 аминокислотных остатков, в состав которого входят два домена, один из которых гомологичен ольфактомеду – белку экстрацеллюлярного матрикса обонятельного эпителия, другой – мышечному миозину [14]. Большинство известных патогенных вариантов обнаружены в ольфактомединовом домене [9].

Миоцилин в организме представлен тремя изоформами, одна из которых является секреторной. В процессе олигомеризации он может образовывать достаточно большие комплексы, а при наличии в белке измененных аминокислот миоцилин может связываться с другими соединениями. Мутации в гене *MYOC* приводят к синтезу белка измененной структуры, в результате чего миоцилин не секретруется и откладывается в зоне трабекулы, создавая механическое препятствие для циркуляции внутриглазной жидкости [15]. Накопление таких форм миоцилина может привести к запуску процесса апоптоза. Мутантный миоцилин, экспрессируемый в ганглиозных клетках сетчатки, а также в астроцитах в области решетчатой пластинки, может оказывать прямое цитотоксическое действие на эти структуры. Клетки трабекулярной ткани при экспрессии в них мутантного миоцилина становятся более чувствительными к оксидативному стрессу за счет снижения экспрессии ряда ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту, и нарушения функционирования митохондрий [14].

Несинонимичный вариант p.R76K (rs2234926) в гене *MYOC* заключается в замене гуанина (G) на аденин (A) в положении с.227, в результате чего аргинин (Arg, R) замещается на лизин (Lys, K) в положении 76 зрелого белка. По данным ExAc (Exome Aggregation Consortium), этот вариант

встречается у 14 % населения европейских стран и в настоящее время рассматривается как генетический полиморфизм.

Гены *CYP1B1* и *MYOC* экспрессируются в радужной оболочке, трабекулярной сети и ресничном теле глаза [3]. Известно, что цитохром P4501B1 катализирует метаболизм ретиноевой кислоты и 17- β эстрадиола, и оба этих эндогенных соединения участвуют в патогенезе глаукомы [12]. Цитохром P4501B1 принимает участие в активации транскрипции гена *MYOC*, регулируя уровень 17- β эстрадиола (субстрата фермента), присутствующего в клетках трабекулярной сети и пигментных эпителиальных клетках сетчатки, путем его гидроксилирования. Комплекс эстрадиола и эстрогенового рецептора связывается с промоторной областью гена, кодирующего миоцилин, и вызывает его сверхэкспрессию. При отсутствии мутаций в гене *CYP1B1* 17- β эстрадиол превращается в 4-гидроксиэстрадиол, который не участвует в активации экспрессии гена *MYOC* (рис. 4) [11]. Сочетание мутаций в гетерозиготном состоянии в двух этих генах приводит к возникновению глаукомы с более злокачественным течением и ранним манифестированием [15].

Учитывая данные о многофакторной этиологии врожденной глаукомы и влиянии различных сопутствующих состояний, осуществлен поиск дополнительных генетических факторов, способствующих ранней манифестации данного заболевания у недоношенного новорожденного.

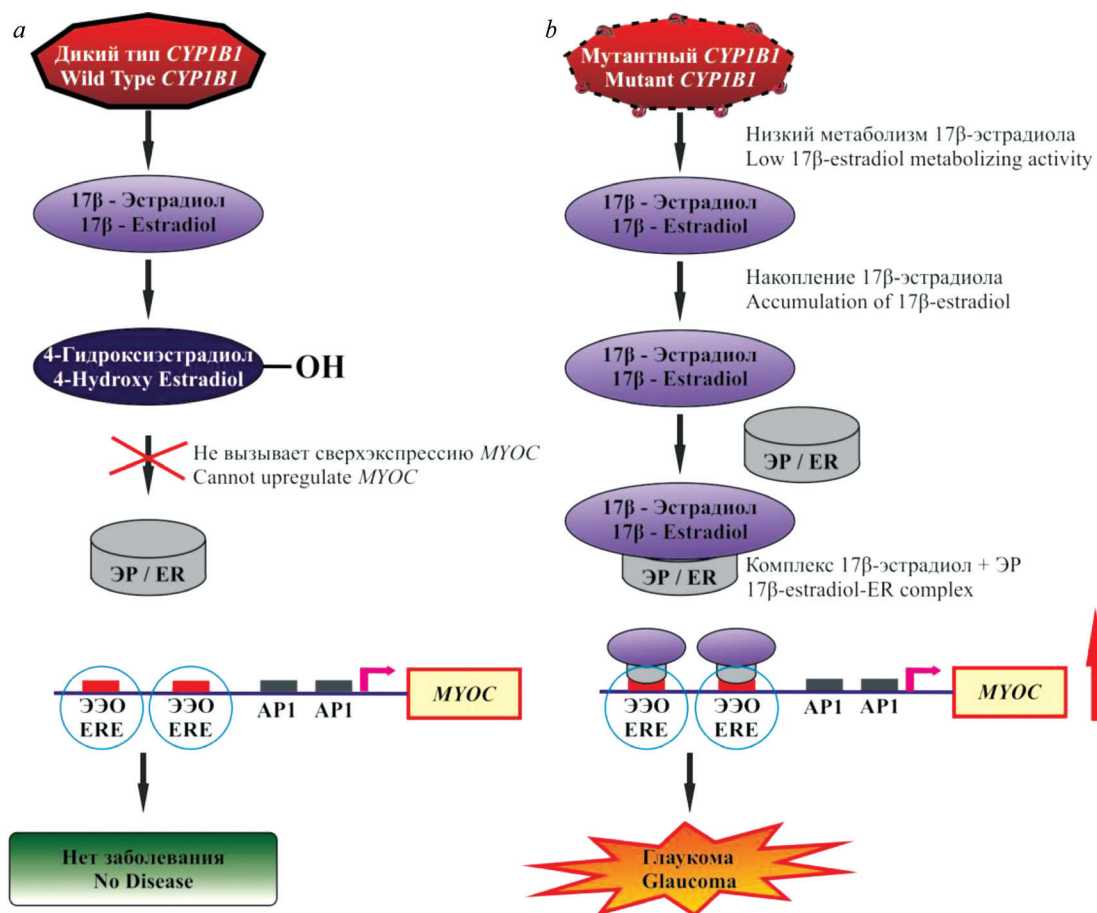


Рис. 4. Диаграмма потенциального влияния мутантных форм *CYP1B1* на экспрессию гена *MYOC* (*a* – полностью функциональный *CYP1B1* превращает 17 β -эстрадиол в 4-гидроксиэстрадиол, тем самым препятствуя образованию комплекса гормон – эстрогеновый рецептор (ЭР); *b* – сниженная ферментативная активность *CYP1B1* приводит к накоплению 17 β -эстрадиола и формированию комплекса гормон – рецептор, который связывается с элементами эстрогенового ответа в промоторной области гена *MYOC* и вызывает его повышенную экспрессию [11])

Fig. 4. Schematic diagram showing potential influence of *CYP1B1* mutants on *MYOC* expression (*a* – fully functional wild type *CYP1B1* metabolizes 17 β -estradiol to 4-hydroxy estradiol; thus, limiting the steroid to form the hormone – estrogen receptor complex (17 β -estradiol-ER); *b* – restricted *CYP1B1* enzymatic activity results in accumulation of the steroid and formation of 17 β -estradiol-ER complex, which binds with estrogen response elements (EREs) in *MYOC* promoter and leads to *MYOC* upregulation [11])

Проанализированы гены белков сурфактанта и гены, ассоциированные с ангиогенезом, ренин-ангиотензиновой и антиоксидантной системами. После проведенной фильтрации результатов экзомного секвенирования и анализа оставшихся в выборке вариантов выявлены полиморфизмы, влияющие на тяжесть диагноза новорожденного ребенка. В таблице представлены 23 полиморфных варианта, оказывающих как положительное, так и негативное воздействие.

Полиморфизмы rs1130866 и инсерционно-делеционный гена *SFTPB* (генотип СТ и гетерозиготная делеция соответственно), rs4715 и rs1124 гена *SFTPC* (генотипы СА и ГА соответственно), оказывающие влияние на степень тяжести синдрома дыхательных расстройств (СДР) и возможность развития БЛД, указаны в таблице. В гене, кодирующем фактор роста эндотелия сосудов, выявлено три полиморфизма: rs2010963 (генотип СС), rs3025039 (генотип СТ) и rs699947 (генотип АС). В гене, кодирующем белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста третьего типа (*IGFBP3*), и в гене, кодирующем рецептор инсулиноподобного фактора роста первого типа (*IGF1R*), обнаружено по одному полиморфизму: rs2854746 (генотип СG) и rs2229765 (генотип ГА) соответственно. Полиморфные и патогенные варианты в генах *IGF1*, *HIF1* в исследуемом образце не обнаружены. В гене, кодирующем эндотелиальную синтазу оксида азота, обнаружен один значимый полиморфизм – rs1799983 (генотип ТG). Выявлено 6 полиморфизмов в генах ренин-ангиотензиновой системы: rs699 (генотип ТТ), rs4762 (генотип СС) в гене *AGT*, кодирующем ангиотензиноген, rs4341 (генотип GС), rs4343 (генотип ГА) и rs4362 (генотип ТС) в гене *ACE*, кодирующем ангиотензинпревращающий фермент, rs5182 (генотип ТТ) в гене *AGTR1*, кодирующем рецептор ангиотензина 1. У недоношенного ребенка выявлены гомозиготные генотипы АА (rs2536512) 3-го экзона гена *SOD3*, АА (rs2234694) 3-го интрона гена *SOD1*, приводящие к повышенной экспрессии гена, увеличению активности фермента, снижению риска развития перинатальных осложнений недоношенного ребенка. Генотип ТС 2-го экзона гена *SOD2* (rs4880), ТТ промоторной области гена *CAT* (rs7943316), генотип СТ (rs1050450) 2-го экзона и СТ (rs1800668) 5'-UTR области гена *GPX1* могут привести к снижению активности ферментов и увеличению окислительных повреждений в клетках, способствуя развитию перинатальных осложнений. Патогенные мутации среди исследуемых генов не обнаружены.

Описание полиморфных вариантов, выявленных в данном исследовании

Description of the polymorphisms included in this study

Ген	Название продукта	Генотип	Полиморфизм	Локализация	ID полиморфизма	Действие
<i>SFTPB</i>	Белок сурфактанта SP-B	СТ	c.C428T, p.Thr143Ile	5-й экзон	rs1130866	Риск развития СДР повышен [16]
		510/del	vntr	4-й интрон		Снижение уровня функционального белка, риск развития СДР, БЛД [16]
<i>SFTPC</i>	Белок С сурфактанта SP-C	СА	c.C413A, p.Thr138Asn	4-й экзон	rs4715	Риск развития СДР повышен [16]
		ГА	c.G557A, p.Ser186Asn	5-й экзон	rs1124	Риск развития СДР повышен [16]
<i>VEGFA</i>	Фактор роста эндотелия сосудов	СС	c.-634C>G	5'-UTR	rs2010963	Риск развития БЛД, РН [17]
		СТ	+936C>T	3'-UTR	rs3025039	Тенденция к снижению продукции фактора роста [18, 19]
		АС	-2578 A>C/A>T	Интрон	rs699947	Тенденция к увеличению продукции фактора роста [18, 19]
<i>IGFBP3</i>	Белок-3, связывающий инсулиноподобный фактор роста	СG	c.C95G, p.Ala32Gly	1-й экзон	rs2854746	Увеличение концентрации циркулирующего белка [20]
<i>IGF1R</i>	Рецептор-1 инсулиноподобного фактора роста	ГА	c.G3126A, p.Glu1042Glu	16-й экзон	rs2229765	Тенденция к снижению IGF-1 в плазме [21]
<i>NOS3</i>	Эндотелиальная синтаза оксида азота	ТG	c.T894G, p.Asp298Glu	8-й экзон	rs1799983	Риск развития СДР, БЛД [22]

Окончание таблицы

Ген	Название продукта	Генотип	Полиморфизм	Локализация	ID полиморфизма	Действие
<i>AGT</i>	Ангиотензиноген	ТТ	с.803Т>С, р.Met268Thr	2-й экзон	rs699	Норма [19]
		СС	с.620С>Т, р.Thr207Met	2-й экзон	rs4762	
<i>ACE</i>	Ангиотензинпревращающий фермент	GC	с.584-19G>C	Интрон	rs4341	Промежуточный уровень фермента [19]
		GA	с.G2328A, р.Thr776Thr	16-й экзон	rs4343	
		TC	с.T3387C, р.Phe1129 Phe	23-й экзон	rs4362	
<i>AGTR1</i>	Рецептор ангиотензина 1	ТТ	с.C678Т, р.Leu226Leu	4-й экзон	rs5182	Норма [19]
<i>SOD3</i>	Супероксиддисмутаза 3	AA	с.G172A, р.Ala58Thr	3-й экзон	rs2536512	Тенденция к снижению риска развития БЛД
		СС	с. C691G, р.Arg231Gly	3-й экзон	rs1799895	Повышен риск развития заболеваний легких [23]
<i>SOD2</i>	Супероксиддисмутаза 2	TC	с.T47C, р.Val16Ala	2-й экзон	rs4880	Тенденция к снижению активности фермента [24]
<i>SOD1</i>	Супероксиддисмутаза 1	AA	с.+35A>C	Интрон	rs2234694	Повышенная активность фермента [25]
<i>CAT</i>	Каталаза	ТТ	с.–89A>T	5'-UTR	rs7943316	Снижение активности фермента [26]
<i>GPXI</i>	Глутатионпероксидаза 1	CT	с. C599T, р.Pro-200Leu	2-й экзон	rs1050450	Тенденция к снижению активности фермента [24]
		CT	с.–46C>T	5'-UTR	rs1800668	Тенденция к снижению активности фермента [24]

Гены белков сурфактанта. Тяжесть состояния недоношенного новорожденного во многом определяется его возможностью самостоятельно дышать. Степень незрелости легких и уровень синтеза сурфактанта зависят от срока гестации новорожденного, а также от течения беременности. Легочный сурфактант представляет собой смесь липидов и специфических белков, необходимых для уменьшения поверхностного натяжения на границе взаимодействия сред воздух–жидкость (внутренняя стенка альвеолы) и предотвращения слипания альвеол в конце выдоха. Отсутствие сурфактанта из-за незрелости легких является основной причиной развития синдрома дыхательных расстройств, наблюдаемого у детей, рожденных преждевременно. На уровень синтезируемых белков сурфактанта влияет не только срок гестации плода, но и генетические предпосылки. Гомозиготные мутации в гене *SFTPB* вызывают наследственную недостаточность белка SP-B, что может привести к летальному исходу. Мутации в гене *SFTPC*, влекущие за собой дефицит белка SP-C, связаны с интерстициальными заболеваниями легких.

Обнаруженные у пациента полиморфные варианты в генах белков сурфактанта SP-B и SP-C относятся к вариантам повышенного риска развития СДР [16]. Ген *SFTPB* расположен на коротком плече 2-й хромосомы человека в области p12–p11.2, содержит 12 экзонов, первый и последний из которых нетранслируемы. Замена треонина (Thr) на изолейцин (Ile) в положении 143 аминокислотной последовательности предшественника SP-B (rs1130866) обусловлена наличием либо цитозина (C), либо тимина (T) в 4-м экзоне в положении 428 нуклеотидной последовательности, что приводит к исчезновению второго N-связанного сайта гликозилирования и к синтезу измененного по структуре белка. В 4-м интроне гена описан инсерционно-делеционный полиморфизм, обусловленный вариативностью числа tandemных повторов. Показано, что с делеционных вариантов образуется в большей степени мРНК с неполным сплайсингом, что приводит к снижению уровня синтеза функционального белка [16]. Ген *SFTPC* локализован на коротком плече 8-й хромосомы, в положении 8p23.1. В 5-м экзоне гена расположен полиморфный вариант rs1124, который приводит к замене аминокислоты серина на аспарагин (с.557G>A, р.S186N), в 4-м экзоне находится полиморфный вариант rs4715, который приводит к замене аминокислоты

треонина на аспарагин (с.413C>A, р. T138N). Механизм, с помощью которого эти полиморфные варианты могут влиять на риск развития СДР, до сих пор не ясен. Однако установлено, что полиморфные варианты расположены в соответствующей С-концевой части молекулы предшественника зрелого SP-C и имеют решающее значение в его процессинге [16].

Гены, ассоциированные с ангиогенезом. Фактор роста эндотелия сосудов А (VEGFA) важен для физиологического роста сосудов различных органов, участвует в пролиферации эндотелиальных клеток, подавляет апоптоз, увеличивает проницаемость сосудов, играет важную роль в нейрогенезе. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что VEGF, принимая участие в васкулогенезе и ангиогенезе сосудов сетчатки, может играть ключевую роль в развитии РН. Увеличение VEGF в аваскулярной сетчатке стимулирует ее патологическую неоваскуляризацию, что может привести к осложнениям, ведущим к слепоте (тракционная отслойка сетчатки). Кроме того, применение анти-VEGF терапии эффективно при тяжелых формах РН. Также VEGFA регулирует процессы поддержания структуры и репарации сосудов легких у взрослого человека, а его отсутствие в период эмбрионального развития приводит к нарушению микрососудистого сплетения легких плода. Поэтому предполагают наличие соответствующей связи между активностью VEGFA и развитием БЛД у недоношенных детей [18, 19]. Регуляция ангиогенеза происходит за счет связывания VEGFA с тирозинкиназными рецепторами VEGFR1 (Flt1) и VEGFR2 (KDR/Flk1) [27].

Ген *VEGFA* расположен на 6-й хромосоме и имеет кодирующую область размером 14 т. п. н. с 8 экзонами и 7 интронами. Полиморфизм rs2010963 (известный также как –634G>C и +405G>C) локализован в 5'-нетранслируемой области гена *VEGF* и, предположительно, находится в пределах потенциального сайта связывания транскрипционного фактора миелоидного цинкового пальца 1 (MZF1), в результате чего может изменяться специфичность связывания этого мотива. Выявленный у пациента генотип CC полиморфного варианта –634G>C характеризуется повышенной продукцией фактора роста эндотелия сосудов и увеличивает риск развития БЛД и РН [17].

Увеличение содержания мРНК VEGF может регулироваться инсулиноподобным фактором роста 1 (IGF-1), обладающим митогенным и антиапоптотическим действием. Плод получает IGF-1 через плаценту и амниотическую жидкость. Недоношенные новорожденные имеют недостаточные уровни IGF-1 для нормального роста, развития и дифференцировки тканей. Низкие уровни IGF-1 способствуют развитию РН и БЛД, однако уже при прогрессировании заболеваний эти уровни достигают более высоких значений. Уровень и биодоступность IGF-1 регулируются в том числе IGFBP-3 и IGF1R. Мутации в гене *IGFR1* связаны с нарушениями, характеризующимися задержкой внутриутробного развития, плохим постнатальным ростом и повышенным уровнем IGF-1 в плазме [21]. В нашем исследовании не выявлено мутаций в гене *IGFR1*.

Ген *IGFBP3* локализован на хромосоме 7p12.3, состоит из 5 экзонов, 4 из которых являются кодирующими. Полиморфный вариант rs2854746 расположен в 1-м экзоне в положении 95 нуклеотидной последовательности и заключается в замене цитозина на гуанин, что соответствует замене аминокислоты аланина на глицин в положении 32 аминокислотной последовательности белка (р.Аla32Gly). Этот полиморфизм влияет на концентрацию свободно циркулирующего белка-3, связывающего инсулиноподобный фактор роста. Выявленный у пациента генотип CC с.С95G *IGFBP3* связан с низкими концентрациями циркулирующего IGFBP-3, что делает фактор роста IGF-1 более эффективным и ускоряет рост клеток [20].

Снижение уровня VEGF, происходящее при гипероксигенации, приводит к сниженной активации рецептора KDR, стимулирующего выработку эндотелиальной синтазы оксида азота в клетках эндотелия, что в свою очередь влечет за собой уменьшение концентрации оксида азота (NO) в клетках. Оксид азота имеет несколько сосудистых действий, которые могут способствовать росту и защите сосудов у недоношенных детей. NO является нейротрансмиттером для неадренергических, нехолинергических нейронов, снижающих тонус сосудов и бронхов, что приводит к вазодилатации и увеличению кровотока, а также облегчает координированное биение респираторных ресничек. Оксид азота опосредованно участвует в регуляции дифференцировки эндотелиальных клеток-предшественниц и процессов апоптоза. NO синтезируется путем окисления L-аргинина в L-цитруллин синтазой оксида азота (NOS). У людей выделены три изофермента NOS: нейрональный (nNOS), эндотелиальный (eNOS) и индуцибельный (iNOS). eNOS преобла-

дает в эндотелии легких [22]. Предполагают, что существует связь между активностью гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и риском развития СДР, БЛД и ВЖК [18].

Ген *NOS3* расположен на хромосоме 7q35-36 и состоит из 26 экзонов. Обнаружено большое количество полиморфных вариантов в гене *NOS3*, но немногие из них являются функциональными. Несинонимичный полиморфизм в положении 894 нуклеотидной последовательности 8-го экзона заключается в замене гуанина на тимин и глутамата на аспарат в положении 298 аминокислотной последовательности белка (rs1799983). Полиморфный вариант Glu298Asp может быть вовлечен в патофизиологию СДР и БЛД и может влиять на тяжесть и исход заболевания. Генотип ТТ и аллель Т связаны со сниженной функцией фермента и сниженной продукцией NO эндотелиальными клетками по сравнению с гомозиготными носителями GG и способствуют развитию БЛД вследствие негативного влияния на сосуды легких и рост альвеол [18, 22].

Гены ренин-ангиотензиновой системы. Ренин-ангиотензиновая система (RAS) – сигнальный путь, который играет важную роль в гомеостазе кровообращения. Компоненты RAS присутствуют в плацентарных капиллярах, эндотелиальных и эпителиальных клетках II типа легких младенца, а также связаны с развитием сосудов сетчатки и патологическим ангиогенезом [28]. Блокада RAS ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента и инактивация антагонистов рецепторов ангиотензина улучшает ретинопатию у мышей, вызванную избыточным кислородом. Предполагается, что ингибирование RAS может иметь положительный эффект при РН [19]. Активация легочной RAS может влиять на патогенез повреждения легких через ряд клеточных воздействий, таких как изменение проницаемости сосудов посредством модуляции уровней эндотелиальных внутриклеточных ионов кальция; изменение тонуса сосудов за счет притока кальция и сокращение гладких мышц сосудов и активности фибробластов [28]. Предполагается, что полиморфизмы генов, кодирующих ангиотензинпревращающий фермент (ACE), рецептор ангиотензина II первого типа (AGTR1) и ангиотензиноген (AGT) могут влиять на развитие перинатальных осложнений у недоношенных детей [19].

Все обнаруженные в нашем исследовании полиморфные замены в генах ренин-ангиотензиновой системы являются вариантами нормы.

Гены антиоксидантной защиты. Новорожденные дети, особенно недоношенные, подвержены высокому риску окислительного стресса из-за недостатка антиоксидантов. Усугубляют действие окислительного стресса незрелость легких, что требует применения кислородной терапии; повышенная подверженность инфекциям и воспалениям; наличие в системе кровообращения недоношенного ребенка свободного железа, которое служит катализатором реакций активных форм кислорода. Окислительный стресс участвует в развитии многих осложнений перинатального периода у недоношенных новорожденных, включая СДР, БЛД, внутрижелудочковое кровоизлияние, РН, что вызвано несовершенством антиоксидантной системы у недоношенных новорожденных [25].

Основными ферментами защиты клеток от окислительного стресса являются супероксиддисмутаза (SOD), превращающие супероксидный радикал в перекись водорода и кислород, каталаза (CAT) и глутатионпероксидаза (GPx), превращающие пероксид водорода в воду и кислород. В гене *GPX1* обнаружены полиморфные варианты СТ rs1050450 и СТ rs1800668, связанные со снижением ферментативной активности глутатионпероксидазы [24].

При анализе молекулярных нарушений в генах, кодирующих супероксиддисмутаза, выявлены значимые в развитии СДР, РН и других заболеваний легких полиморфные варианты ТС rs4880 митохондриальной супероксиддисмутаза (ген *SOD2*), связанные со снижением активности фермента [25] и СС rs1799895 внеклеточной супероксиддисмутаза (ген *SOD3*), которая повышает аффинность связывания фермента с матриксом [23].

Ген каталазы *CAT* расположен на хромосоме 11p13 и содержит 13 экзонов. Замена аденина на тимин в положении –89 промоторной области гена *CAT* (rs7943316) влияет на аффинность связывания транскрипционных факторов. У пациента выявлен генотип ТТ, приводящий к снижению активности фермента. Из-за наличия мутантного аллеля Т с промотором связываются неподходящие факторы транскрипции, что может привести к изменению его активности, экспрессии гена, снижению каталитической активности фермента и увеличению восприимчивости к окислительному стрессу [26].

Заклучение. Проведенное полноэкзомное секвенирование позволило выявить аллели риска развития врожденной глаукомы у недоношенного новорожденного: p.E229K *CYP1B1* и p.R76K *MYOC*, а также полиморфные варианты в генах *SFTPB*, *SFTPC*, *VEGFA*, *NOS3*, *IGFBP3*, *CAT*, ассоциированные с развитием неонатальных осложнений, таких как БЛД, РН и ПВЛ. Полученные результаты обследования пробанда и родителей необходимо учитывать при медико-генетическом консультировании семьи при планировании последующей беременности.

Список использованных источников

1. Identifying risk factors shared by bronchopulmonary dysplasia, severe retinopathy, and cystic periventricular leukomalacia in very preterm infants for targeted intervention / L.-W. Wang [et al.] // *Neonatology*. – 2018. – Vol. 114. – P. 17–24. <https://doi.org/10.1159/000487505>
2. *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States / S.-H. Lim [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 155, N 3. – P. 508–517.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2012.09.012>
3. Giuffre, I. Molecular analysis of Italian patients with congenital glaucoma / I. Giuffre // *Glaucoma – current clinical and research aspects* / ed. P. Gunvant. – Rijeka, 2011. – P. 71–82.
4. Sambrook, J. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // *Molecular cloning: a laboratory manual*. – 2nd ed. – New York, 1989. – P. 9.14–9.23.
5. Chang, X. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web / X. Chang, K. Wang // *J. Med. Gen.* – 2012. – Vol. 49, N 7. – P. 433–436. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100918>
6. Sequence analysis of *MYOC* and *CYP1B1* in a Chinese pedigree of primary open-angle glaucoma / J. Chen [et al.] // *Mol. Vis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1431–1435.
7. World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects / World Med. Assoc. // *JAMA*. – 2013. – Vol. 310, N 20. – P. 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
8. Occurrence of *CYP1B1* mutations in juvenile open-angle glaucoma with advanced visual field loss / E. Souzeau [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 133, N 7. – P. 826–833. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.0980>
9. Shah, B. R. Cytochrome P450 1B1: role in health and disease and effect of nutrition on its expression / B. R. Shah, W. Xu, J. Mraz // *RSC Adv.* – 2019. – Vol. 9, N 36. – P. 21050–21062. <https://doi.org/10.1039/C9RA03674A>
10. Identification of four novel cytochrome P4501B1 mutations (p.I94X, p.H279D, p.Q340H, and p.K433K) in primary congenital glaucoma patients / M. Tanwar [et al.] // *Mol. Vis.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2926–2937.
11. Molecular basis for involvement of *CYP1B1* in *MYOC* upregulation and its potential implication in glaucoma pathogenesis / S. Mookherjee [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – Art. e45077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045077>
12. Role of *CYP1B1* p.E229K and p.R368H mutations among 120 families with sporadic juvenile onset open-angle glaucoma / V. Gupta [et al.] // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 256, N 2. – P. 355–362. <https://doi.org/10.1007/s00417-017-3853-0>
13. Somarajan BI2, Walia GK3, Kaur J4, Kumar S4, Gupta S2, Chaurasia AK2, Gupta D5, Kaushik A5, Mehta A2, Gupta V6, Sharma A7. *CYP1B1* variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians / J. Beuten [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2008. – Vol. 29. – P. 1751–1757. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm300>
14. Астахов, Ю. С. Наследственность и глаукома / Ю. С. Астахов, В. В. Рахманов // *Офтальмол. ведомости*. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 51–57.
15. Старикова, Д. И. Генетические исследования при первичной открытоугольной глаукоме / Д. И. Старикова, М. И. Чурносов // *PMЖ. Клин. офтальмология*. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 49–52.
16. Population-based frequency of surfactant dysfunction mutations in a native Chinese cohort Population / Y.-J. Chen [et al.] // *World J. Pediatr.* – 2015. – Vol. 12, N 2. – P. 190–195. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0047-x>
17. Association of a vascular endothelial growth factor polymorphism with the development of bronchopulmonary dysplasia in Japanese premature newborns / K. Fujioka [et al.] // *Sci. Reports*. – 2015. – Vol. 4. – Art. 4459. <https://doi.org/10.1038/srep04459>
18. Genetic contributions to the development of complications in preterm newborns / C. Poggi [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, N 7. – Art. e0131741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131741>
19. The genetics of retinopathy of prematurity: a model for neovascular retinal disease / R. Swan [et al.] // *Ophthalmol. Retina*. – 2018. – Vol. 2, N 9. – P. 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2018.01.016>
20. Association of *IGF-1* CA(n) and *IGFBP3* rs2854746 polymorphisms with endometrial polyp risk / P. Leopoldo [et al.] // *BioMed Res. Int.* – 2018. – Vol. 2018. – Art. 8704346. <https://doi.org/10.1155/2018/8704346>
21. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases / A. Stark [et al.] // *Front. Pediatr.* – 2018. – Vol. 6. – Art. 125. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00125>
22. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism in preterm neonates with respiratory distress syndrome / M. A.-W. Albeshery [et al.] // *Int. J. Res. Med. Sci.* – 2016. – Vol. 4, N 12. – P. 5382–5386. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20164214>
23. Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function / K. Ganguly [et al.] // *Physiol. Genom.* – 2009. – Vol. 37, N 3. – P. 260–267. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90363.2008>
24. Association of rs1800668 polymorphism in glutathione peroxidase-1 gene and risk of rheumatoid arthritis in Pakistani population / S. Irfan [et al.] // *Pak. J. Med. Sci.* – 2016. – Vol. 32, N 5. – P. 1204–1207. <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.325.10325>

25. Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes as risk factors for oxidative stress-associated complications in preterm infants / B. Giusti [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2012. – Vol. 46, N 9. – P. 1130–1139. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.692787>
26. Association of catalase polymorphisms with primary open-angle glaucoma in a Chinese population / B. Gong [et al.] // *Ophthalmic Genetics.* – 2017. – Vol. 39, N 1. – P. 35–40. <http://dx.doi.org/10.1080/13816810.2017.1342132>
27. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза / В. П. Чехонин [и др.] // *Вестн. Рос. акад. мед. наук.* – 2012. – Т. 67, № 2. – С. 23–34.
28. *ACE* gene deletion/deletion polymorphism may be a protective factor for respiratory distress in preterm infants / E. Sivasli [et al.] // *Turk. J. Pediatr.* – 2007. – Vol. 49, N 1. – P. 69–74.

References

1. Wang L.-W., Lin Y.-C., Wang S.-T., Huang C.-C. Identifying risk factors shared by bronchopulmonary dysplasia, severe retinopathy, and cystic periventricular leukomalacia in very preterm infants for targeted intervention. *Neonatology*, 2018, vol. 114, no. 1, pp. 17–24. <https://doi.org/10.1159/000487505>
2. Lim S.-H., Tran-Viet K. N., Yanovitch T. L., Freedman S. F., Klemm T., Call W., Powell C., Ravichandran A., Metlapally R., Nading E. B., Rozen S., Young T. L. *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *American Journal of Ophthalmology*, 2013, vol. 155, no. 3, pp. 508–517.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2012.09.012>
3. Giuffre I. Molecular analysis of Italian patients with congenital glaucoma. *Glaucoma – current clinical and research aspects*. Rijeka, 2011, pp. 71–82.
4. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York, 1989, pp. 9.14–9.23.
5. Chang X., Wang K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web. *Journal of Medical Genetics*, 2012, vol. 49, no. 7, pp. 433–436. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100918>
6. Chen J., Cai S. P., Yu W., Yan N., Tang L., Chen X., Liu X. Sequence analysis of *MYOC* and *CYP1B1* in a Chinese pedigree of primary open-angle glaucoma. *Molecular Vision*, 2011, vol. 17, pp. 1431–1435.
7. World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 2013, vol. 310, no. 20, pp. 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
8. Souzeau E., Hayes M., Zhou T., Siggs O. M., Ridge B., Awadalla M. S. [et al.]. Occurrence of *CYP1B1* mutations in juvenile open-angle glaucoma with advanced visual field loss. *JAMA Ophthalmology*, 2015, vol. 133, no. 7, pp. 826–833. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.0980>
9. Shah B. R., Xu W., Mraz J. Cytochrome P450 1B1: role in health and disease and effect of nutrition on its expression. *RSC Advances*, 2019, vol. 9, no. 36, pp. 21050–21062. <https://doi.org/10.1039/C9RA03674A>
10. Tanwar M., Dada T., Sihota R., Dada R. Identification of four novel cytochrome P4501B1 mutations (p.I94X, p.H279D, p.Q340H, and p.K433K) in primary congenital glaucoma patients. *Molecular Vision*, 2009, vol. 15, pp. 2926–2937.
11. Mookherjee S., Acharya M., Banerjee D., Bhattacharjee A., Ray K. Molecular basis for involvement of *CYP1B1* in *MYOC* upregulation and its potential implication in glaucoma pathogenesis. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 9, art. e45077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045077>
12. Gupta V., Somarajan B. I., Walia G. K., Kaur J., Kumar S., Gupta S. [et al.]. Role of *CYP1B1* p.E229K and p.R368H mutations among 120 families with sporadic juvenile onset open-angle glaucoma. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2017, vol. 256, no. 2, pp. 355–362. <https://doi.org/10.1007/s00417-017-3853-0>
13. Beuten J., Gelfond J. A., Byrne J. J., Balic I., Crandall A. C., Johnson-Pais T. L., Thompson I. M., Price D. K., Leach R. J. *CYP1B1* variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians. *Carcinogenesis*, 2008, vol. 29, no. 9, pp. 1751–1757. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm300>
14. Astakhov Yu. S., Rakhmanov V. V. Heredity and glaucoma. *Oftal'mologicheskie vedomosti* [Ophthalmology journal], 2012, vol. 5, no. 4, pp. 51–57 (in Russian).
15. Starikova D. I., Churnosov M. I. Genetic studies in primary open-angle glaucoma. *RMZh. Klinicheskaya oftal'mologiya = Russian Journal of Clinical Ophthalmology*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 49–52 (in Russian).
16. Chen Y.-J., Wambach J. A., Pass K., Wegner D. J., Chen S.-K., Zhang Q.-Y., Heins H., Cole F. S., Hamvas A. Population-based frequency of surfactant dysfunction mutations in a native Chinese cohort population. *World Journal of Pediatrics*, 2015, vol. 12, no. 2, pp. 190–195. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0047-x>
17. Fujioka K., Shibata A., Yokota T., Koda T., Nagasaka M., Yagi M., Takeshima Y., Yamada H., Iijima K., Morioka I. Association of a vascular endothelial growth factor polymorphism with the development of bronchopulmonary dysplasia in Japanese premature newborns. *Scientific Reports*, 2015, vol. 4, art. 4459. <https://doi.org/10.1038/srep04459>
18. Poggi C., Giusti B., Gozzini E., Sereni A., Romagnuolo I., Kura A., Pasquini E., Abbate R., Dani C. Genetic contributions to the development of complications in preterm newborns. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 7, art. e0131741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131741>
19. Swan R., Kim S. J., Campbell J. P., Chan R. V. P., Sonmez K., Taylor K. D. [et al.]. The genetics of retinopathy of prematurity: a model for neovascular retinal disease. *Ophthalmology Retina*, 2018, vol. 2, no. 9, pp. 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2018.01.016>
20. Leopoldo P., Doria S., Moscovitz T., Tcherniakovsky M., Fernandes C. E., Pompei L. M., Wajman M., Nimwegen A., Haimovich S. Association of *IGF-1* CA(n) and *IGFBP3* rs2854746 polymorphisms with endometrial polyp risk. *BioMed Research International*, 2018, vol. 2018, art. 8704346. <https://doi.org/10.1155/2018/8704346>

21. Stark A., Dammann C., Nielsen H. C., Volpe M. V. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases. *Frontiers in Pediatrics*, 2018, vol. 6, art. 125. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00125>
22. Albeshery M. A.-W., Abdel-Haie O. M., Ramadan N. S., Mohammed S. A. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism in preterm neonates with respiratory distress syndrome. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 2016, vol. 4, no. 12, pp. 5382–5386. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20164214>
23. Ganguly K., Depner M., Fattman C., Bein K., Oury T. D., Wesselkamper S. C. [et al.]. Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function. *Physiological Genomics*, 2009, vol. 37, no. 3, pp. 260–267. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90363.2008>
24. Irfan S., Rani A., Sameem M., Nawaz S. K., Liaqat I., Arshad M. Association of rs1800668 polymorphism in glutathione peroxidase-1 gene and risk of rheumatoid arthritis in Pakistani population. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2016, vol. 32, no. 5, pp. 1204–1207. <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.325.10325>
25. Giusti B., Vestri A., Poggi C., Magi A., Pasquini E., Abbate R., Dani C. Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes as risk factors for oxidative stress-associated complications in preterm infants. *Free Radical Research*, 2012, vol. 46, no. 9, pp. 1130–1139. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.692787>
26. Gong B., Shi Y., Qu C., Ye Z., Yin Y., Tan C., Shuai P., Li J., Guo X., Cheng Y., Yang Z., Lin Y., Liu X. Association of catalase polymorphisms with primary open-angle glaucoma in a Chinese population. *Ophthalmic Genetics*, 2017, vol. 39, no. 1, pp. 35–40. <http://dx.doi.org/10.1080/13816810.2017.1342132>
27. Chekhonin V. P., Shein S. A., Korzhagina A. A., Gurina O. I. The role of VEGF in the development of neoplastic angiogenesis. *Vestnik Rossijskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian academy of medical sciences*, 2012, vol. 67, no. 2, pp. 23–34 (in Russian).
28. Sivasli E., Yurdakök M., Babaoğlu E., Karabulut H., Yiğit S., Babaoğlu M., Tekinalp G., Tükün A. ACE gene deletion/deletion polymorphism may be a protective factor for respiratory distress in preterm infants. *Turkish Journal of Pediatrics*, 2007, vol. 49, no. 1, pp. 69–74.

Информация об авторах

Малышева Ольга Михайловна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Malysheva@igc.by

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

Сухарева Анастасия Павловна – аспирант, врач-неонатолог. Клинический родильный дом Минской области (ул. Ф. Скорины, 16, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nstbor@tut.by

Артошевская Марина Владимировна – канд. мед. наук, ассистент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 6579542@bk.ru

Ситник Надежда Геннадьевна – аспирант, врач-реаниматолог. Клинический родильный дом Минской области (ул. Ф. Скорины, 16, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: n.g.sitnik@gmail.com

Кулакова Галина Валерьевна – врач анестезиолог-реаниматолог. Клинический родильный дом Минской области (ул. Ф. Скорины, 16, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dockulakova@gmail.com

Жевнеронок Ирина Владимировна – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ira_jevner@tut.by

Кильчевский Александр Владимирович – академик, д-р биол. наук, профессор. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by

Шिशко Георгий Александрович – д-р мед. наук, профессор. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: georg_shishko@mail.ru

Information about the authors

Volha M. Malysheva – Postgraduate student, Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Malysheva@igc.by

Alena P. Michalenka – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Michalenko@igc.by

Anastasiya P. Suharava – Postgraduate student, Neonatologist. Clinical Maternity Hospital of Minsk Region (16, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nstbor@tut.by

Maryna V. Artsiusheuskaya – Ph. D. (Med.), Assistant. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 6579542@bk.ru

Nadzeya G. Sitnik – Postgraduate student, Resuscitator. Clinical Maternity Hospital of Minsk Region (16, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: n.g.sitnik@gmail.com

Galina V. Kulakova – Resuscitation anesthetist. Clinical Maternity Hospital of Minsk Region (16, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dockulakova@gmail.com

Iryna V. Jevneronak – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ira_jevner@tut.by

Aleksandr V. Kilchevsky – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by

Georgiy A. Shyshko – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: georg_shishko@mail.ru

Elena G. Tulkova¹, Lyudmila F. Kabashnikova²

¹Belarusian 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

PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS CONTENT IN THE URBAN HABITAT HERBACEOUS PLANTS LEAVES UNDER THE VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS EFFECT

Abstract. It is necessary to find and develop new methods for evaluating open air pollution by volatile organic compounds due to the current changes in the structure of industrial production. While applying these methods, plants can be used quite efficiently. Therefore, the purpose of the article was to study the nature and conditions of change of chlorophylls *a*, *b* and carotenoids content in the urban habitat herbaceous plants leaves at different doses of volatile organic compounds and their mixtures effect under the specified experimental conditions.

The results of the experiment show that our hypothesis has been confirmed. It is the following: there are features and conditions of formation in reed fescue plants photosynthetic pigments of different levels under the effect of different amounts of pollutants having various volatility at different stages after their appending. Groups of substances which have the equal effect on pigment content have also been identified: pentane and hexane (have a strong effect) at early stages after treatment; benzene, benz(a)pyrene and *o*-xylol (have a weaker effect); butylacetate has practically no inhibitory effect; later: benz(a)pyrene, *o*-xylol and pentane (have a strong effect); butylacetate, hexane and benzene (have a weaker effect).

The results of the studies can be used to develop a method for evaluating open air pollution by volatile organic compounds using herbaceous plants pigments. They contribute to the study of the toxic effects of volatile organic compounds on the change in photosynthetic pigments content.

Keywords: photosynthetic pigments, reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb., volatile organic compounds

For citation: Tulkova E. G., Kabashnikova L. F. Photosynthetic pigments content in the urban habitat herbaceous plants leaves under the volatile organic compounds effect. *Vesti Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 342–351. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-342-351>

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

СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Аннотация. В связи с происходящими в настоящее время изменениями в структуре промышленного производства необходимы поиск и разработка новых методов оценки загрязнения атмосферного воздуха летучими органическими соединениями. Для достижения этой цели достаточно эффективно могут быть использованы растения.

Изучены характер и закономерности изменения содержания хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в листьях травянистых растений городской среды при разных дозах воздействия летучих органических соединений и их смесей в заданных условиях.

Результаты эксперимента подтвердили гипотезу о наличии особенностей и закономерностей формирования различных уровней пигментов фотосинтеза растений овсяницы тростниковой при действии неодинаковых по степени летучести загрязнителей через 1 и 3 сут после их введения. Также выявлены группы одинаково действующих на содержание пигментов веществ: на ранних этапах после обработки – пентана, гексана (сильнодействующие), бензола, бенз(а)пирена, *o*-ксилола (действуют слабее), бутилацетата (практически не проявляет ингибирующий эффект); на более поздних сроках – бенз(а)пирена, *o*-ксилола, пентана (сильнодействующие вещества), бутилацетата, гексана, бензола (действуют слабее).

Результаты проведенных исследований вносят вклад в изучение токсического действия летучих органических соединений на изменение содержания пигментов фотосинтеза и могут быть использованы для разработки методов

оценки загрязнения атмосферного воздуха летучими органическими соединениями с использованием пигментов травянистых растений.

Ключевые слова: фотосинтетические пигменты, овсяница тростниковая *Festuca arundinacea* Schreb., летучие органические соединения

Для цитирования: Тюлькова, Е. Г. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях травянистых растений городской среды в условиях воздействия летучих органических соединений / Е. Г. Тюлькова, Л. Ф. Кабашникова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 342–351 (in English). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-342-351>

Introduction. Modern industrial production dramatically expands the range of sources of effect and the volume of the environmental impact. The sources of volatile organic compounds are industrial enterprises of thermal power engineering, fuel, chemical and petrochemical industry, mechanical engineering and non-ferrous industry. Their emissions can now be of a significant amount due to changes in technological processes. As a result, alkanes, cycloalkanes, non-organic and aromatic hydrocarbons, alcohols and esters reach environment. All these toxicants are very dangerous in terms of their effects on living organisms. Depending on the dose of effect they can cause allergic reactions in humans and animals, hypoxia, reduction of blood capillary tone, neurotoxic action and suppress soil biota. The study of volatile organic compounds effect on the activity intensity of the plants photosynthetic apparatus, on the one hand, is little studied when compared to the effect of oxides of nitrogen, carbon, sulphur, ammonia, particulate, heavy metals and microplastics [1–11], on the other hand, it is relevant in order to compare their toxicity level to the parameters of plants life activity [12–17]. It is necessary to find and develop new methods for evaluating open air pollution by volatile organic compounds due to the current changes in the structure of industrial production. While applying these methods, plants can be used quite efficiently.

For this purpose it is necessary to obtain data on change of photosynthetic pigments content in leaves of the most common herbaceous plants of urban habitat at different doses of volatile organic compounds and their mixtures effect. The purpose of the article was to study the nature and conditions of change of chlorophylls *a*, *b* and carotenoids content in the urban habitat herbaceous plants leaves at different doses of volatile organic compounds and their mixtures effect under the specified experimental conditions.

Materials and research methods. The plants of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. were the study object because it is one of the most common herbaceous plants in the urban habitat. When setting up an experiment on treating reed fescue plants with saturated, aromatic hydrocarbons and ester, the main scientific idea was to establish the nature of changes in the photosynthetic pigments content while setting artificially certain levels of hydrocarbon intake by leaf blades. Based on this, a comparative analysis of the photosynthetic pigments content in reed fescue leaves treated with various doses of hydrocarbons (pentane, hexane, benzene, o-xylene, benz(a)pyrene, butylacetate and their mixtures) was made after certain periods of time after the effect (one day later and three days later after treatment).

For the experiment, reed fescue plants were grown for a month in plastic containers with soil at an illumination intensity of $120 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a temperature of $22 \text{ }^\circ\text{C}$, a light mode of 14 h. Leaves of the same size were selected for treatment with solutions of volatile organic compounds, visually controlling the absence of damage and the degree of formation of the pigment apparatus.

Leaf blades of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. were treated with aqueous hydrocarbon solutions. The hydrocarbon doses used were calculated on the basis of the maximum permissible concentrations (MPC) of pollutants set for open air [18]. According to standards, the maximum permissible concentrations of pentane in open air is $100,000.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$; hexane – $60,000.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$; benzene – $100.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$; xylols – $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$; butylacetate – $100.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$; benz(a)pyrene – $5.0 \text{ ng}/\text{m}^3$. A maximum single permissible concentration value was used for all compounds except for benz(a)pyrene; average daily permissible concentration value was used for benz(a)pyrene [18]. Untreated plants of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb were used as the control ones. The plants selected for the experiment were treated with aqueous solutions of the studied compounds in the following concentrations: 0.0001–0.03 mg/ml pentane; 0.00006–0.018 mg/ml hexane; 0.0001–0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ benzene; 0.0002–0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o-xylol, 0.000005–0.0015 ng/ml benz(a)pyrene, 0.0001–0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ butylacetate (acetic acid butyl ester). The leaf blades were treated by aqueous solutions spraying (50 ml of aqueous solution of injected compound each dose). The mixtures of the following concentrations 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ butylacetate + 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o-xylol; 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ butylacetate +

0.04 µg/ml o-xylol; 0.01 µg/ml benzene + 0.02 µg/ml o-xylol; 0.02 µg/ml benzene + 0.04 µg/ml o-xylol; 0.01 mg/ml pentane + 0.006 mg/ml hexane; 0.02 mg/ml pentane + 0.012 mg/ml hexane; 0.01 mg/ml pentane + 0.006 mg/ml hexane + 0.0005 ng/ml benz(a)pyrene; 0.02 mg/ml pentane + 0.012 mg/ml hexane + 0.001 ng/ml benz(a)pyrene were used to detect the combined effects of the studied compounds.

Shimadzu UV-2401 PC spectrophotometer (Shimadzu, Japan) was used to determine the chlorophylls *a*, *b* and carotenoids content in the leaf blades of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. The photosynthetic pigments content was determined one day later and three days later after treatment. The leaves with a wet weight of 30–40 mg were used for the extraction of photosynthetic pigments. Chlorophylls and carotenoids were extracted by 99.5 % acetone in 3 biological replications. The pigment content of the extracts was calculated by the extinction coefficients given in work [19] for the corresponding solvent according to formulas

$$C_a = 9.784D_{662} - 0.99D_{644},$$

$$C_b = 21.426D_{644} - 4.650D_{662},$$

$$C_a + C_b = 5.134D_{662} + 20.436D_{644},$$

$$C_k = 4.695D_{440.5} - 0.268C_{a+b},$$

where C_a , C_b , C_k – the average concentration of chlorophylls *a*, *b* and carotenoids in the leaves extract of the study objects (µg/ml); $D_{440.5}$, D_{644} , D_{662} – optical density at wavelengths of 440.5, 644 and 662 nm.

A weight of wet leaves and a volume of the obtained pigment filtrate were used to convert the photosynthetic pigments content to the wet weight. The pigments content is given in mg/g of wet weight. The validity of the difference between the pigment content in the experimental and control samples was evaluated by a single factor dispersion analysis. Mathematic processing of the digital material was made using *M. Excel* and *Statistica* software applications.

Results and its discussion. The alkanes effect on plants is dangerous because they have a sufficiently high resistance and low chemical activity, since high temperature or ultraviolet radiation are necessary for reactions involving alkanes. This does not contribute to reducing their toxicity when interacting with other compounds. Complete destruction of alkanes occurs only with the participation of carbon-assimilating microorganisms (mainly bacteria and yeast), which live in water and soil [20].

When pentane was effected reed fescue plants in our studies, there was a decrease in the content of all photosynthetic pigments at both the early and later stages of the experiment. At the same time all the doses used in the experiment caused an inhibitory effect. Under the effect of the maximum pentane dose a decrease in the content of all studied pigments was observed by 1.51–1.97 times one day later and by 2.0–2.18 times three days later as compared with the control samples (Tab. 1).

This may be a consequence of pentane oxidation to acid and a negative effect on chlorophyll formation. However, a clear correlation of chlorophylls *a*, *b* and carotenoids content reduction and pentane solution concentration increase was observed only at the last two maximum doses (0.02–0.03 mg/ml) one day after treatment and the last three doses (0.01–0.03 mg/ml) three days after treatment.

Lower pentane concentrations effect caused a different quantitative hopping impact. It was possibly due to the existence of some threshold level to which the plant's protective mechanisms act. At the same time higher dose levels have had a pronounced toxic effect that can be effectively tested with the help of reed fescue plants if they are in the air.

When compared to pentane, leaf blades spraying with hexane solutions having a longer carbon chain caused a less, but natural, decrease in pigment content at all post-treatment stages (Tab. 2).

This trend was particularly characteristic of chlorophyll *a*. At maximum hexane concentrations (0.012–0.018 mg/ml) there was a slight increase in chlorophyll *b* and carotenoids acting as additional light-harvesting and protective components. The hexane solution effect of a minimum concentration (0.00006 mg/ml) at late stages of the experiment did not cause a decrease in the content of all the pigments studied. In general, the maximum dose of hexane resulted in a reduction of the pigment content by 1.21–1.79 times after one day as compared to the control one and by 1.39–2.03 three days after treatment. At this stage the maximum hexane concentration effect was almost as twice as the minimum dose effect.

Table 1. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with pentane

Concentration of pentane solution, mg/ml	Pigment content, mg/g wet weight			chl <i>a</i> /chl <i>b</i>	chl (<i>a</i> + <i>b</i>)/car
	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	car		
<i>1 day later</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.0001	0.71 ± 0.03*	0.28 ± 0.01*	0.45 ± 0.02*	2.55	2.19
0.005	0.88 ± 0.02*	0.31 ± 0.02*	0.55 ± 0.03*	2.89	2.17
0.01	0.69 ± 0.02*	0.27 ± 0.01*	0.44 ± 0.02*	2.54	2.19
0.02	0.80 ± 0.03*	0.30 ± 0.01*	0.53 ± 0.03*	3.13	2.08
0.03	0.63 ± 0.02*	0.26 ± 0.01*	0.39 ± 0.02*	2.44	2.27
<i>3 days later</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.0001	0.94 ± 0.04*	0.35 ± 0.02*	0.57 ± 0.03*	2.69	2.27
0.005	1.09 ± 0.04*	0.33 ± 0.02*	0.60 ± 0.03*	3.43	2.40
0.01	1.03 ± 0.04*	0.37 ± 0.02*	0.62 ± 0.03*	2.93	2.27
0.02	0.76 ± 0.04*	0.31 ± 0.02*	0.47 ± 0.01*	2.46	2.29
0.03	0.65 ± 0.03*	0.26 ± 0.01*	0.40 ± 0.02*	2.50	2.28

Note. Here and in Tab. 2–8 * – values of photosynthetic pigments content are given as authentically other than the control one at $p \leq 0.05$; chl *a* – chlorophyll *a*; chl *b* – chlorophyll *b*; car – carotenoids.

Table 2. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with hexane

Concentration of hexane solution, mg/ml	Pigment content, mg/g wet weight			chl <i>a</i> /chl <i>b</i>	chl (<i>a</i> + <i>b</i>)/car
	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	car		
<i>1 day later</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.00006	0.94 ± 0.04*	0.31 ± 0.02*	0.56 ± 0.02*	3.05	2.21
0.003	0.90 ± 0.05*	0.28 ± 0.01*	0.53 ± 0.02*	3.28	2.22
0.006	0.80 ± 0.03*	0.24 ± 0.01*	0.48 ± 0.01*	3.34	2.20
0.012	0.72 ± 0.03*	0.27 ± 0.01*	0.45 ± 0.01*	2.71	2.18
0.018	0.69 ± 0.02*	0.29 ± 0.01*	0.61 ± 0.02*	2.41	1.61
<i>3 days later</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.00006	1.43 ± 0.06	0.75 ± 0.03*	0.95 ± 0.04*	2.79	2.27
0.003	0.99 ± 0.04*	0.41 ± 0.02*	0.57 ± 0.02*	2.43	2.46
0.006	0.97 ± 0.04*	0.27 ± 0.01*	0.56 ± 0.02*	3.64	2.21
0.012	0.78 ± 0.03*	0.30 ± 0.02*	0.45 ± 0.01*	2.69	2.41
0.018	0.70 ± 0.04*	0.31 ± 0.01*	0.61 ± 0.02*	2.28	1.66

In general, among the alkanes that were used, the hexane effect at all stages is more susceptible to chlorophyll *a* due to the sharpest decrease in the content as compared to the control one, and pentane – to chlorophyll *a* at early stages and to chlorophyll *a* and carotenoids – three days after treatment.

A feature of benzene behavior in the environment is that the increase in its concentration in the air can be wave-like at a maximum level in the first 30 minutes and further after 4 h [20]. In addition, benzene is characterized by poor oxidation in the external environment. Xylols are able to inhibit algae growth, and their activity can be enhanced in the presence of solid particles. Benz(a)pyrene, like some other polyarenes, is highly toxic, capable of transboundary transfer, biological transformation, accumulation in natural objects and has a mutagenic property [12, 13, 20].

The results of the determination of the pigment content in the benzene test show a correlation between their amount and the benzene concentration, both one day and three days after treatment of the leaf blades. This indicates to the active benzene effect within all the doses used (Tab. 3).

Table 3. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with benzene

Concentration of benzene solution, µg/ml	Pigment content, mg/g wet weight			chl <i>a</i> /chl <i>b</i>	chl (<i>a</i> + <i>b</i>)/car
	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	car		
<i>1 day later</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.0001	1.05 ± 0.04*	0.36 ± 0.02*	0.41 ± 0.02*	3.0	2.30
0.005	1.02 ± 0.04*	0.32 ± 0.01*	0.61 ± 0.02*	3.21	2.20
0.01	0.92 ± 0.03*	0.29 ± 0.01*	0.57 ± 0.02*	3.14	2.12
0.02	0.91 ± 0.04*	0.29 ± 0.01*	0.57 ± 0.03*	3.16	2.09
0.03	0.84 ± 0.03*	0.27 ± 0.01*	0.51 ± 0.02*	3.16	2.14
<i>3 days later</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.0001	1.40 ± 0.06	0.43 ± 0.02*	0.83 ± 0.03	3.28	2.20
0.005	1.16 ± 0.05*	0.39 ± 0.01*	0.70 ± 0.02*	3.0	2.24
0.01	0.92 ± 0.04*	0.36 ± 0.02*	0.56 ± 0.02*	2.57	2.29
0.02	0.90 ± 0.04*	0.29 ± 0.01*	0.55 ± 0.03*	3.12	2.18
0.03	0.82 ± 0.03*	0.25 ± 0.01*	0.49 ± 0.02*	3.26	2.18

At the same time its maximum concentration effect resulted in reduction of chlorophylls *a*, *b* and carotenoids content by 1.44–1.48 times one day and by 1.71–2.07 times three days after treatment of leaf blades. However, the benzene increased doses effect (0.01 and 0.02 µg/ml) resulted in substantially the same content of all the pigments studied at both early and late stages of the experiment, whereas the minimum doses (0.0001 and 0.005 µg/ml) had the strongest effect on the reduction of the amount of pigments one day after injection. Thus, it is possible to detect the duration of low levels of benzene effect with the help of reed fescue plants. The minimum dose treatment (0.0001 µg/ml) caused a decrease in the amount of pigments in comparison with the control one by 1.09–1.20 times one day later and by 1.20 times three days later, that is, the maximum dose effect was about as twice as the minimum concentration effect.

When compared to benzene, a stronger inhibitory effect on pigments is observed for maximum concentrations of *o*-xylol. It is possibly associated with more active oxidation processes of *o*-xylol in the side chain (Tab. 4).

Table 4. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with *o*-xylol

Concentration of <i>o</i> -xylol solution, µg/ml	Pigment content, mg/g wet weight			chl <i>a</i> /chl <i>b</i>	chl (<i>a</i> + <i>b</i>)/car
	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	car		
<i>1 day later</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.0002	1.09 ± 0.04*	0.46 ± 0.02*	0.68 ± 0.02*	2.37	2.29
0.01	1.07 ± 0.04*	0.45 ± 0.02*	0.66 ± 0.03*	2.40	2.32
0.02	1.01 ± 0.04*	0.42 ± 0.01	0.62 ± 0.03*	2.38	2.31
0.04	0.84 ± 0.03*	0.28 ± 0.01*	0.55 ± 0.02*	3.16	2.04
0.06	0.60 ± 0.03*	0.25 ± 0.01*	0.40 ± 0.02*	2.33	2.14
<i>3 days later</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.0002	1.43 ± 0.06	0.52 ± 0.02	0.88 ± 0.03	2.74	2.22
0.01	0.91 ± 0.04*	0.39 ± 0.01*	0.55 ± 0.03*	2.33	2.37
0.02	0.59 ± 0.03*	0.26 ± 0.01*	0.37 ± 0.02*	2.29	2.30
0.04	0.51 ± 0.02*	0.23 ± 0.02*	0.31 ± 0.02*	2.17	2.36
0.06	0.48 ± 0.02*	0.22 ± 0.01*	0.31 ± 0.01*	2.19	2.25

O-xylol effect, as benzene, resulted in a uniform reduction of photosynthesis pigments content, except for a minimum dose (0.0002 µg/ml) three days later. At the same time, minimal doses of o-xylol (0.0002 and 0.01 µg/ml) caused approximately the same pigments content one day after treatment, and maximum concentrations (0.04 and 0.06 µg/ml) had the same effect three days later. Thus, minimum doses of o-xylol at early stages and maximum doses of o-xylol at late stages are able to effect equally on pigment levels in the leaves of reed fescue plants. In general, o-xylol had a more negative effect on photosynthetic pigments than alkanes and benzene, especially three days after injection. There was a reduction of photosynthetic pigments by 1.57–2.07 times one day later and by 2.35–2.93 times three days later at its maximum concentration. In addition, the maximum dose of o-xylol had such an effect on the amount of pigments by 2–3 times more than the minimum concentration effect.

Despite the evidence of severe toxic effects on living organisms, benz(a)pyrene did not show the most intense negative effect on the photosynthetic pigments content during the experiment (Tab. 5).

Table 5. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with benz(a)pyrene

Concentration of benz(a)pyrene solution, ng/ml	Pigment content, mg/g wet weight			chl a/chl b	chl (a + b)/car
	chl a	chl b	car		
<i>1 day later</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.000005	1.25 ± 0.04	0.41 ± 0.01	0.71 ± 0.02	3.07	2.32
0.00025	0.99 ± 0.04*	0.34 ± 0.02*	0.44 ± 0.02*	2.94	3.0
0.0005	0.97 ± 0.05*	0.32 ± 0.01*	0.51 ± 0.03*	3.0	2.50
0.001	0.94 ± 0.04*	0.36 ± 0.02*	0.59 ± 0.02*	2.72	2.16
0.0015	0.61 ± 0.02*	0.25 ± 0.01*	0.37 ± 0.02*	2.43	2.33
<i>3 days later</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.000005	1.10 ± 0.05*	0.38 ± 0.02*	0.63 ± 0.02*	2.93	2.34
0.00025	0.86 ± 0.03*	0.30 ± 0.01*	0.50 ± 0.02*	2.85	2.31
0.0005	0.82 ± 0.03*	0.31 ± 0.01*	0.52 ± 0.02*	2.65	2.17
0.001	0.69 ± 0.02*	0.29 ± 0.01*	0.43 ± 0.02*	2.34	2.31
0.0015	0.59 ± 0.02*	0.24 ± 0.01*	0.36 ± 0.02*	2.52	2.30

This may have caused a decrease in the solutions toxicity due to their air contact and oxidation of the benz(a)pyrene, resulting in the formation of quinones and further carboxylic acids. As hexane, benz(a)pyrene was characterized by a natural decrease in chlorophyll *a*, which was most clearly observed three days after treatment.

In general, chlorophyll *a* is the most sensitive pigment to the aromatic hydrocarbon effect at early stages, and in case of benz(a)pyrene – chlorophyll *a* and carotenoids. Over time, benzene most actively affects the change in chlorophyll *b*, o-xylol – in chlorophyll *a* and carotenoids.

Butylacetate is the most common solvent during the preparation and use of paint-and-lacquer materials. Butylacetate dissolves cellulose esters, oils, fats, chlorine rubbers, vinyl polymers, carbiol resins, etc. Butylacetate is widely used in the pharmaceutical industry to separate primary substances in antibiotic production.

A natural decrease in photosynthetic pigment content as compared to the control one was observed at early stages only at maximum doses (0.02 and 0.03 µg/ml) in the butylacetate experiment, and at late stages – all doses except the minimum dose (0.0001 µg/ml) (Tab. 6). Chlorophyll *a* is most susceptible to the butylacetate effect at late stages.

It should be noted that industrial emissions are characterized not by a single element or compound, but by a whole spectrum, sometimes quite measurable. As a consequence, pollutants can affect plants as different mixtures. Taking into account that there are certain protective mechanisms in living organisms to neutralize the toxic substances effects, it is possible to mutually influence these mechanisms by different compounds with their combined effects.

Table 6. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with butylacetate

Concentration of butylacetate solution, µg/ml	Pigment content, mg/g wet weight			chl a/chl b	chl (a + b)/car
	chl a	chl b	car		
<i>1 day later</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.0001	1.62 ± 0.07*	0.53 ± 0.03*	1.08 ± 0.04*	3.07	1.99
0.005	1.29 ± 0.05*	0.41 ± 0.02	0.76 ± 0.04	3.18	2.22
0.01	1.28 ± 0.05*	0.49 ± 0.02*	0.84 ± 0.03*	2.63	2.13
0.02	1.11 ± 0.06*	0.37 ± 0.01	0.71 ± 0.03	2.99	2.10
0.03	0.98 ± 0.04*	0.35 ± 0.01*	0.67 ± 0.02*	2.78	2.0
<i>3 days later</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.0001	1.25 ± 0.05*	0.78 ± 0.04*	0.89 ± 0.03*	2.32	2.21
0.005	1.03 ± 0.04*	0.35 ± 0.01*	0.60 ± 0.02*	2.97	2.30
0.01	0.90 ± 0.03*	0.33 ± 0.02*	0.55 ± 0.02*	2.73	2.23
0.02	0.80 ± 0.03*	0.30 ± 0.01*	0.50 ± 0.01*	2.69	2.21
0.03	0.77 ± 0.04*	0.28 ± 0.01*	0.50 ± 0.02*	2.82	2.09

Table 7. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with butylacetate + o-xylol; benzene + o-xylol mixtures

Experiment option	Pigment content, mg/g wet weight			chl a/chl b	chl (a + b)/car
	chl a	chl b	car		
<i>1 day later (butylacetate + o-xylol mix)</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.01 + 0.02 µg/ml	1.33 ± 0.05*	0.46 ± 0.01*	0.88 ± 0.03*	2.93	2.02
0.02 + 0.04 µg/ml	0.98 ± 0.04*	0.35 ± 0.01*	0.68 ± 0.02*	2.78	1.96
<i>3 days later (butylacetate + o-xylol mix)</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.01 + 0.02 µg/ml	0.80 ± 0.03*	0.32 ± 0.02*	0.51 ± 0.02*	2.54	2.19
0.02 + 0.04 µg/ml	0.62 ± 0.02*	0.26 ± 0.01*	0.39 ± 0.01*	2.38	2.22
<i>1 day later (benzene + o-xylol mix)</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.01 + 0.02 µg/ml	1.27 ± 0.05*	0.51 ± 0.02*	0.81 ± 0.03*	2.51	2.20
0.02 + 0.04 µg/ml	1.09 ± 0.04*	0.44 ± 0.01*	0.71 ± 0.03*	2.50	2.16
<i>3 days later (benzene + o-xylol mix)</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.01 + 0.02 µg/ml	0.94 ± 0.04*	0.35 ± 0.01*	0.62 ± 0.05*	2.65	2.10
0.02 + 0.04 µg/ml	0.62 ± 0.02*	0.27 ± 0.01*	0.39 ± 0.03*	2.30	2.29

The results of the performed analysis showed the butylacetate ability to reduce toxic effect of xylol, and xylol – to strengthen toxic effect of butylacetate on the photosynthetic pigments content (Tab. 7).

Treatment of the leaf blades of reed fescue with a benzene and o-xylol mixture resulted in a reduction of the effect of these compounds separately on the amount of pigments in the reed fescue (Tab. 7). Mixtures of pentane with hexane, as well as pentane with hexane and benz(a)pyrene, on the contrary, increased the negative effect of these compounds as compared to their single effect on the pigment apparatus of reed fescue plants (Tab. 8).

The results of the dispersion analysis show the significant differences between the samples of control and experimental pigment values when treated leaf blades of reed fescue with single compounds ($F_{act}(1, 6) = 6,44-227,95$; $F_{crit}(1, 6) = 5,99$ at $p \leq 0,05$). The exception was as follows: one day later, while treated with 0.02 µg/ml o-xylol solution (chlorophyll b); 0.000005 ng/ml benz(a)pyrene (all pigments);

Table 8. Photosynthetic pigments content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. after treatment with mixtures of pentane + hexane; pentane + hexane + benz(a)pyrene

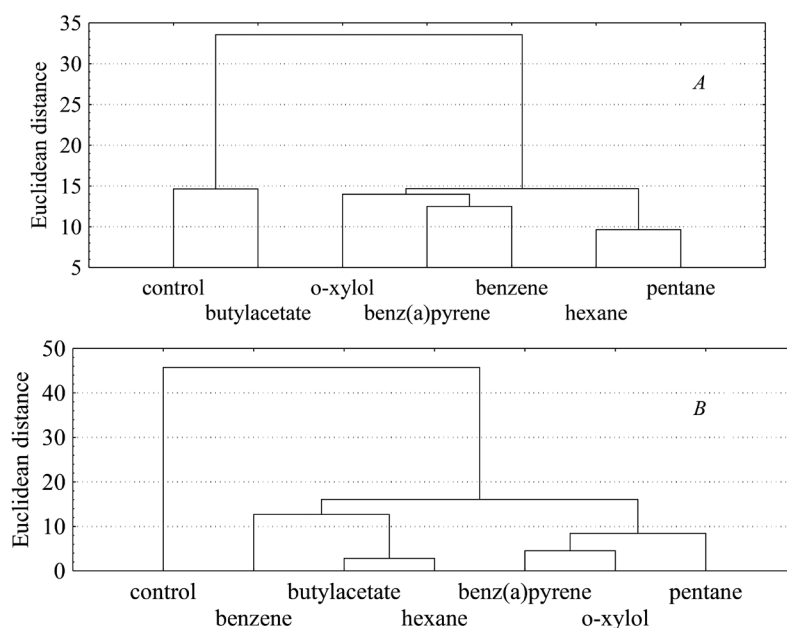
Experience options	Pigment content, mg/g wet weight			chl a/chl b	chl (a + b)/car
	chl a	chl b	car		
<i>1 day later (mix pentane + hexane)</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.01 + 0.006 mg/ml	0.66 ± 0.02*	0.31 ± 0.01*	0.41 ± 0.03*	2.13	2.38
0.02 + 0.012 mg/ml	0.63 ± 0.01*	0.31 ± 0.02*	0.39 ± 0.04*	2.01	2.40
<i>3 days later (mix pentane + hexane)</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.01 + 0.006 mg/ml	1.03 ± 0.04*	0.42 ± 0.01*	0.63 ± 0.05*	2.45	2.29
0.02 + 0.012 mg/ml	0.50 ± 0.01*	0.25 ± 0.01*	0.30 ± 0.03*	2.01	2.49
<i>1 day later (mix pentane + hexane + benz(a)pyrene)</i>					
Control	1.24 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.74 ± 0.04	3.21	2.21
0.01 mg/ml + 0.006 mg/ml + 0.0005 ng/ml	0.67 ± 0.02*	0.30 ± 0.01*	0.42 ± 0.02*	2.22	2.34
0.02 mg/ml + 0.012 mg/ml + 0.001 ng/ml	0.58 ± 0.02*	0.21 ± 0.01*	0.35 ± 0.02*	2.88	2.26
<i>3 days later (mix pentane + hexane + benz(a)pyrene)</i>					
Control	1.42 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.84 ± 0.03	2.74	2.29
0.01 mg/ml + 0.006 mg/ml + 0.0005 ng/ml	0.63 ± 0.02*	0.31 ± 0.01*	0.35 ± 0.02*	2.01	2.73
0.02 mg/ml + 0.012 mg/ml + 0.001 ng/ml	0.62 ± 0.02*	0.23 ± 0.01*	0.38 ± 0.02*	3.85	2.19

0.005 µg/ml and 0.02 µg/ml butylacetate (chlorophyll *b* and carotenoids). Three days later incorrect differences were observed in the following cases: while treated with 0.00006 mg/ml hexane (chlorophyll *a*); 0.0001 µg/ml benzene (chlorophyll *a* and carotenoids); 0.0002 µg/ml *o*-xylol (all pigments). Thus, the number of unreliable differences between experimental and control samples was 7.8 % of variants compared to the control ones. In addition, most unreliable differences in most of experiment variants were observed after treatment with single compounds one day later as compared to the differences obtained three days later, and they were typical of samples treated with butylacetate. No false differences were observed for mixture treatment.

The results of the cluster analysis of photosynthetic pigments content in reed fescue leaves show that taking into account the similarity of their effects in the range of all doses at early stages after treatment the used compounds can be grouped as pentane and hexane (have a strong effect), benzene, benz(a)pyrene and *o*-xylol (have a weaker effect), that is alkanes and aromatic hydrocarbons were strictly distributed into different clusters (see Figure, *A*). Butylacetate did not cause significant changes in pigment content at early stages of effect as compared to the control one. Perhaps this effect is due to the fact that pentane and hexane have maximum volatility (the volumetric relative volatility of pentane and hexane on the filter paper is 12.3 and 7.43 at 25 °C, respectively), which may be the cause of stronger effect of these compounds at early stage after injection. Benzene belongs to the group of semi-volatile compounds (dimensional relative volatility on filter paper is 3.77 at 25 °C); *o*-xylol, butylacetate and benz(a)pyrene are small compounds (dimensional relative volatility of *o*-xylol and butylacetate on the filter paper is 0.565 and 1.0 at 25 °C, respectively). Perhaps that's why their effect is not evident at once, but after a while.

At late stages the hexane effect was weakened and the remaining compounds were reduced; there has been a redistribution of alkanes and aromatic hydrocarbons, and benz(a)pyrene, *o*-xylol and pentane (have a strong effect); butylacetate, hexane and benzene (have a weaker effect) had an approximately equal effect (see Figure, *B*).

Conclusion. Our hypothesis has been confirmed. It is the following: there are features and conditions of formation in reed fescue plants photosynthetic pigments of different levels under the effect of different amounts of pollutants having various volatility at different stages after their appending. It has been found that there is a clear correlation of reduction in the amount of pigments only with increased doses of pentane (0.02–0.03 mg/ml). When compared to pentane all hexane solutions concentrations (0.00006–0.018 mg/ml) caused less severe but a more natural decrease in pigment content, especially chlorophyll *a*; a slight



Dendrogramma of chlorophylls *a*, *b* and carotenoids content in leaves of reed fescue *Festuca arundinacea* Schreb. one day after treatment (*A*) and three days after treatment (*B*)

increase in chlorophyll *b* and carotenoids is possible at increased doses of hexane (0.012–0.018 mg/ml). When there are increased benzene concentrations (0.01–0.02 µg/ml), pigment levels are almost the same. The *o*-xylol solutions of the minimum dose (0.0002 and 0.01 µg/ml) effect on the pigments equally at early stages and at late stages – in the maximum amount (0.04 and 0.06 µg/ml). Benz(a)pyrene as one of the most dangerous modern toxicants within doses 0.000005–0.0015 ng/ml does not have the most intense negative effect on pigment content; it is characterized by a natural decrease in the level of pigments within all doses three days after injection. Butylacetate whose emissions currently reach significant volumes only of maximum doses (0.02 and 0.03 µg/ml) causes a natural decrease in pigment content at early stages and at late stages – within all doses except the minimum dose (0.0001 µg/ml).

The most sensitive pigments to volatile organic compounds effect are: chlorophyll *a* for hexane; chlorophyll *a* at the early stages for pentane; chlorophyll *a* at the late stages for butylacetate; chlorophyll *a* for all aromatic hydrocarbons at the early stages, and chlorophyll *a* and carotenoids for benz(a)pyrene; at the late stages, benzene most actively effects the change in chlorophyll *b*, *o*-xylol – in chlorophyll *a* and carotenoids.

When effecting the pigment content together, butylacetate reduces the toxic effect of *o*-xylol, and *o*-xylol increases the toxic effect of butylacetate. Benzene and *o*-xylol in the mixture reduce each other's negative effects; mixtures of pentane and hexane, as well as pentane, hexane and benz(a)pyrene, in contrast, increase each other's negative effects.

The following groups of substances which have the equal effect were obtained: pentane and hexane (have a strong effect) at the early stages after treatment; benzene, benz(a)pyrene and *o*-xylol (have a weaker effect); butylacetate has practically no inhibitory effect; later: benz(a)pyrene, *o*-xylol and pentane (have a strong effect); butylacetate, hexane and benzene (have a weaker effect).

References

1. Duan J., Fu B., Kang H., Song Z., Jia M., Cao D., Wei A. Response of gas-exchange characteristics and chlorophyll fluorescence to acute sulfur dioxide exposure in landscape plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, vol. 171, pp. 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.064>
2. Popek R., Przybysz A., Gawrońska H., Klamkowski K., Gawroński S. Impact of particulate matter accumulation on the photosynthetic apparatus of roadside woody plants growing in the urban conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, vol. 163, pp. 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.051>
3. De Carvalho R. M., Szlafsztein C. F. Urban vegetation loss and ecosystem services: the influence on climate regulation and noise and air pollution. *Environment Pollution*, 2019, vol. 245, pp. 844–852. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.114>

4. Chen H., Wang B., Xia D.-S., Fan Y.-J., Liu H., Tang Z.-R., Ma S. The influence of roadside trees on the diffusion of road traffic pollutants and their magnetic characteristics in a typical semi-arid urban area of Northwest China. *Environment Pollution*, 2019, vol. 252, pp. 1170–1179. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.023>
5. Mingorance M. D., Valdés B., Rossini Oliva S. *Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions*. *Environment International*, 2007, vol. 33, no. 4, pp. 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.01.005>
6. Jiang X., Chen H., Liao Y., Ye Z., Li M., Klobučar G. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environment Pollution*, 2019, vol. 250, pp. 831–838. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.055>
7. Krzesłowska M., Timmers A. C. J., Mleczek M., Niedzielski P., Rabęda I., Woźny A., Goliński P. Alterations of root architecture and cell wall modifications in *Tilia cordata* Miller (Linden) growing on mining sludge. *Environment Pollution*, 2019, vol. 248, pp. 247–259. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.019>
8. Douglas A. N. J., Irga P. J., Torpy F. R. Determining broad scale associations between air pollutants and urban forestry: a novel multifaceted methodological approach. *Environment Pollution*, 2019, vol. 247, pp. 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.099>
9. Haroni N., Bادهian Z., Zarafshar M., Bazot S. The effect of oil sludge contamination on morphological and physiological characteristics of some tree species. *Ecotoxicology*, 2019, vol. 28, no. 5, pp. 507–519. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02034-0>
10. Bell J. N., Honour S. L., Power S. A. Effects of vehicle exhaust emissions on urban wild plant species. *Environment Pollution*, 2011, vol. 159, no. 8–9, pp. 1984–1990. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.006>
11. Honour S. L., Bell J. B., Ashenden T. W., Cape J. N., Sally A. P. Responses of herbaceous plants to urban air pollution: effects on growth, phenology and leaf surface characteristics. *Environment Pollution*, 2009, vol. 157, pp. 1279–1286. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.049>
12. Niu L., Xu C., Zhou Y., Liu W. Tree bark as a biomonitor for assessing the atmospheric pollution and associated human inhalation exposure risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in rural China. *Environment Pollution*, 2019, vol. 246, pp. 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.019>
13. Wang X. T., Zhou Y., Hu B. P., Fu R., Cheng H. X. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons and synthetic musk compounds with *Masson pine* (*Pinus massoniana* L.) needles in Shanghai, China. *Environment Pollution*, 2019, vol. 252, pp. 1819–1827. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.002>
14. Wu X., Zhu L., Zhu L. Prediction of organic contaminant uptake by plants: modified partition-limited model based on a sequential ultrasonic extraction procedure. *Environment Pollution*, 2019, vol. 246, pp. 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.066>
15. Cape J. N. Effects of airborne volatile organic compounds on plants. *Environment Pollution*, 2003, vol. 122, pp. 145–157. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00273-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00273-7)
16. Sriprapat W., Suksabye P., Areephak S., Klantup P., Waraha A., Sawattan A., Thiravetyan P. Uptake of toluene and ethylbenzene by plants: removal of volatile indoor air contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, vol. 102, pp. 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.032>
17. Maslenko E. A. *Effects of benzene derivatives (xylool and aromatic acids) and 2-methyl-1,3-dioxolane on algae and higher plants*. Abstract of Ph. D. diss. Boroc, 2006. 22 p. (in Russian).
18. 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).
19. Kabashnikova L. F. *Photosynthetic apparatus and productivity potential of cereals*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 327 p. (in Russian).
20. Filov V. A. (ed.). *Harmful chemicals. Inorganic compounds of elements of groups I–IV*. Leningrad, Khimiya (Leningradskoe otdelenie) Publ., 1988. 512 p. (in Russian).

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

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

Кабашикова 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

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 635.9:582.477:631.526.32: 581.522.4:581.165

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-352-357>

Поступила в редакцию 04.05.2020

Received 04.05.2020

В. И. Торчик

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ИНТРОДУКЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CHAMAECYPARIS* SPACH. В БЕЛАРУСИ

Аннотация. В статье приведены результаты исследований и проведен анализ опыта интродукции и использования представителей рода *Chamaecyparis* Spach. в условиях Беларуси. К перспективным для культивирования на всей территории республики отнесены декоративные формы кипарисовика горохоплодного. Декоративные формы кипарисовика Лавсона и кипарисовика нутканского рекомендуется использовать преимущественно в западных и юго-западных районах, в центральной части и северных областях их следует высаживать в защищенных от сквозных ветров местах или укрывать на зиму. Из декоративных форм кипарисовика туполистного в укрывной культуре можно использовать карликовые формы, не превышающие 0,5 м. Представители рода *Chamaecyparis* Spach. обладают достаточно высокой регенерационной способностью стеблевых черенков. Их укореняемость колеблется у большинства изученных декоративных форм от 60 до 100 %, что позволяет организовать выращивание посадочного материала в местных условиях.

Ключевые слова: *Chamaecyparis* Spach., интродукция, декоративная форма, озеленение, регенерационная способность, укореняемость

Для цитирования: Торчик, В. И. Интродукция и использование представителей рода *Chamaecyparis* Spach. в Беларуси / В. И. Торчик // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 352–357. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-352-357>

Uladzimir I. Torchik

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

INTRODUCTION AND THE USING OF REPRESENTATIVES OF THE GENUS *CHAMAECYPARIS* SPACH. IN BELARUS

Abstract. The article presents the results of research and analysis of the experience of introduction and using of representatives of the genus *Chamaecyparis* Spach. in Belarus. Cultivars of Sawara Cypress are promising for cultivation throughout the republic. Cultivars of Lawson Cypress and Nootka Cypress are recommended to be used mainly in the western and southwestern regions, in the central part and northern regions, plants should be planted in places protected from winds or use covering for the winter. From among the cultivars of Hinoki Cypress in the covering culture, dwarf forms that do not exceed 0.5 m in height can be used. Representatives of the genus *Chamaecyparis* Spach. have a sufficiently high regenerative ability of stem cuttings. Their rooting ranges in most studied cultivars from 60 to 100 %, which allows to organize the cultivation of planting material in local conditions.

Keywords: *Chamaecyparis* Spach., introduction, cultivar, landscaping, regenerative ability, rooting

For citation: Torchik U. I. Introduction and the using of representatives of the genus *Chamaecyparis* Spach. in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 352–357 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-352-357>

Введение. Виды рода *Chamaecyparis* Spach. – вечнозеленые однодомные деревья с плотной конусовидной кроной, двурядно разветвляющимися плоскими побегами со свисающими концами и чешуевидной хвоей, которая у молодых растений бывает игловидной. Кипарисовики отличаются равномерным ветвлением, большинство из них покрыты густыми ветвями до основания ствола. В местах естественного произрастания они достигают высоты 30–40 м и выше. Генеративные почки располагаются на концах боковых побегов, мужские – удлинено-яйцевидные, желтые, женские – почти шаровидные с 6–8, реже с 4 или 10–12 супротивными чешуями. Шишки маленькие, шаровидные, жесткие, созревающие в первый год (у нутканского – на второй).

Семенные чешуи шишководные, заостренные или округлые, с налегающими друг на друга краями. При созревании шишки растрескиваются. Семена (в количестве 2, реже – 5 штук) двукрылые, эллиптические или округлые, с двумя семядолями [1, 2]. Известно 7 видов кипарисовика:

1. *Chamaecyparis formosensis* Matsum. – эндем о. Тайвань.
2. *Ch. funebris* (Endl.) Franco. – Китай, долина Янцзы.
3. *Ch. lawsoniana* (Andr.) Parl. – Северная Америка, от юго-запада Орегона до северо-запада Калифорнии.
4. *Ch. nootkatensis* (Lamb.) Spach. – Северная Америка, бухта Нутка, Аляска, Британская Колумбия.
5. *Ch. obtusa* Sieb. et Zucc. – Япония, о. Тайвань.
6. *Ch. pisifera* Sieb. et Zucc. – Япония, о. Хондо.
7. *Ch. thyoides* (L.) В. P. S. and Sarg. – США, болота Флориды.

Некоторые виды склонны к мутациям, что обусловило широкое разнообразие культурных форм – колонновидных, низкорослых, шарообразных, кустовидных, пестролистных и др.

В настоящее время у *Chamaecyparis lawsoniana* их более 250, у *Chamaecyparis obtusa* – более 120, у *Chamaecyparis pisifera* – 80, у *Chamaecyparis thyoides* – около 20, у *Chamaecyparis nootkatensis* – 15 [3, 4].

Следует отметить, что в Европе декоративные формы кипарисовиков стали популярными почти одновременно с основными видами. Об этом можно судить по *Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc. и его первым известным декоративным формам. Например, такие декоративные формы, как ‘*Squarrosa*’ (1843 г.), ‘*Plumosa*’, ‘*Aurea*’, ‘*Argentea*’ (1861), были завезены в Европу в 1861 г. одновременно с основным видом.

Представители рода *Chamaecyparis* Spach. используются в качестве декоративных растений в аллеиных, групповых и одиночных посадках, а их древесина находит применение в строительстве, при изготовлении шпал, возведении гидротехнических сооружений и др.

Объекты и методы исследования. Объектами исследований служили *Ch. pisifera*, *Ch. lawsoniana*, *Ch. obtusa* и декоративные формы *Ch. p.* ‘*Plumosa Aurea*’, *Ch. p.* ‘*Filifera*’, *Ch. p.* ‘*Squarrosa*’, длительное время изучавшиеся на территории Беларуси, и интродуцированные перспективные декоративные формы *Ch. pisifera* ‘*Filifera Nana*’, ‘*Nana*’, ‘*Snow*’, ‘*Squarrosa Intermedia*’, ‘*Sungold*’, *Ch. nootkatensis* ‘*Aurea*’, ‘*Glauca*’, ‘*Tatra*’, *Ch. obtusa* ‘*Lycopodioides*’.

Фенологические наблюдения проводили по методике Совета ботанических садов СССР [5]. Зимостойкость надземной части растений оценивали в баллах по шкале, предложенной П. И. Лапиным и С. В. Сидневой [6]. Регенерационную способность стеблевых черенков изучали по общепринятым методикам [7]. Укоренение проводили в условиях искусственного тумана в субстрате из крупнозернистого песка и верхового торфа в соотношении 1:1 (v/v). Видовой состав болезней и вредителей определяли по Л. Ю. Трейвас [8].

Результаты и их обсуждение. Опыт интродукции представителей рода *Chamaecyparis* Spach. показал, что на территории республики в разные годы испытание проходили *Chamaecyparis pisifera*, *Chamaecyparis lawsoniana*, *Chamaecyparis nootkatensis* и *Chamaecyparis obtusa* [9, 10].

Кипарисовик горохоплодный (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.) в Беларусь интродуцирован в начале прошлого века. Благодаря своей высокой устойчивости, в первую очередь зимостойкости, вид успешно произрастает на всей территории республики. Однако в культуре он встречается редко и растет в виде небольшого деревца, достигающего максимальной высоты чуть более 15 м. Наибольшее распространение в Беларуси получили такие его декоративные формы, как ‘*Squarrosa*’, ‘*Squarrosa Dumosa*’, ‘*Squarrosa sulphurea*’, ‘*Plumosa*’, ‘*Plumosa Aurea*’, которые отмечены в посадках (преимущественно в западной части республики) почти одновременно с основным видом [9, 10]. В начале 1980-х годов в Центральный ботанический сад (ЦБС) НАН Беларуси были привлечены декоративные формы ‘*Aureovariegata*’, ‘*Filifera Aurea*’ и ‘*Boulevard*’. В 2000–2002 гг. коллекция ЦБС пополнилась еще несколькими декоративными формами: ‘*Filifera Nana*’, ‘*Sungold*’, ‘*Nana*’, ‘*Snow*’ и ‘*Squarrosa Intermedia*’.

‘*Filifera Nana*’. Карликовая медленнорастущая плотная форма со свисающими нитевидными веточками. В возрасте 20 лет достигает высоты 130 см и 100 см ширины. Хвоя чешуевидная

и шиловидная, темно-зеленая. Хорошо растет на кислой или щелочной почве как на солнечных, так и на затененных местах, предпочитает влажные местообитания. Зимостойка, дымо- и газоустойчива. В культуре известна с 1897 г., в коллекции ЦБС – с 2001 г.

'*Sungold*'. Плоско-шаровидная или шаровидная медленнорастущая карликовая форма с нитевидными свисающими веточками, до 1 м в высоту и ширину. Хвоя чешуевидная, желто-золотистая, не изменяющая окраску зимой. От обычной формы '*Filifera Aurea*' отличается более грубыми ветвями и хорошей устойчивостью к солнечным ожогам там, где другие желтые формы подгорают. Чрезвычайно морозостойка. Предпочитает плодородные влажные почвы. Происходит предположительно из Дании. Получена в 2001 г. из Боскопа саженцем.

'*Nana*'. Карликовая медленнорастущая плотная форма – от шаровидной до подушковидной. В возрасте 20 лет достигает 0,6 м высоты и 1,5 м ширины. Ветви отстоящие, веерообразные, очень плотные, край с нижней стороны загнут, верхушка слегка кудрявая. Хвоя очень маленькая, сверху темно-зеленая, снизу голубовато-зеленая. Известна с 1891 г. В питомниках ее часто путают с *Chamaecyparis pisifera* '*Compacta*'. Получена в 2001 г. из Боскопа саженцем.

'*Snow*'. Карликовая плоско-шаровидная форма из группы '*Plumosa*'. Хвоя моховидная, плотная, голубовато-зеленая, с белыми верхушками побегов, очень чувствительными к сильному солнечному свету и морозу. Очень декоративная форма. Зимует без повреждений. Годичный прирост 6–10 см. Весной белые верхушки побегов обгорают под первыми лучами весеннего солнца. К концу мая новые растущие побеги опять придают растению белоснежную окраску, сохраняющуюся до конца вегетационного периода. В более затененных местах повреждения хвои меньше. Выделена в Японии в 1971 г. [38]. Получена в 2001 г. из Боскопа саженцем.

'*Squarrosa Intermedia*'. Своеобразная рыхлая кустовидная прямостоячая форма с игольчатой и чешуйчатой хвоей. В культуре молодые растения шаровидно подстригают, после чего они имеют только голубую игольчатую хвою. Позже на растении появляются тонкие длинные прямые побеги с отстоящими маленькими темно-зелеными чешуйками. Довольно распространенная форма неизвестного происхождения, в культуре с 1923 г. Стриженные в виде шариков растения иногда называют '*Blue Dwarf*'. Молодые растущие побеги в мае–июне на ярком солнце подсыхают. Рост возобновляется во второй половине вегетации. К осени растение опять приобретает декоративность. Получена в 2001 г. из Боскопа саженцем.

Кипарисовик Лавсона. Впервые интродуцирован в Беларусь (г. Кобрин) семенами Н. И. Кириком из Копенгагена в 1939 г. Первые годы саженцы зимовали под укрытием, но в суровые зимы часть из них погибла, сохранилось 8 экземпляров, которые оказались относительно зимостойкими и даже вступили в период семяношения [9]. В ЦБС кипарисовик Лавсона интродуцирован в 1961 г. из Бельгии и Франции. Ввиду частого обмерзания до уровня снега в 17 лет растения имели кустообразный габитус и высоту около 3 м [9]. В середине 1980-х годов в ЦБС были привлечены его декоративные формы: '*Alumii*' и '*Elwoodii*'. Однако при снижении температуры до –25...–30 °С они оказались недостаточно зимостойкими, что не позволяло рекомендовать их для массового использования в зеленом строительстве. Наблюдения в годы с более мягкими зимами показали, что декоративные формы кипарисовика Лавсона могут использоваться при благоустройстве внутренних дворов и объектов, защищенных от северных ветров и сквозняков. Достаточно успешно они растут в населенных пунктах в западных и юго-западных районах республики.

Согласно данным работы [10], в середине 1970-х годов первичное испытание в ЦБС проходили кипарисовик нутканский и кипарисовик туполистный. Отмечается, что растения зимовали под защитой снега и морозом не повреждались. Кроме того, кипарисовик туполистный в возрасте 13 лет достигал высоты 2,9 м и диаметра стволика 3,0 см. Зимостойкость его по 7-балльной шкале оценивалась в 1 балл [9]. Однако по невыясненным причинам оба вида погибли.

В связи с более мягкими в последние десятилетие погодно-климатическими условиями в Беларуси и отсутствием значительного снижения температуры в зимний период для изучения были привлечены три декоративные формы кипарисовика нутканского: '*Aurea*', '*Glauca*' и '*Tatra*'.

'*Aurea*'. Прямостоячее дерево с равномерной узкоконусовидной кроной. Достигает высоты нескольких метров. Ветви мощные, направлены вверх, иногда распростерты. Верхушки побегов и боковых веточек слегка свисающие, быстрорастущие.

В Центральной Европе сорт полностью зимостоек. Сильно свисающие побеги способны переносить обильные снегопады. Из-за поверхностной корневой системы возможно вымерзание молодых растений на очень сухих местах. Форма выведена в Англии в 1891 г., известна также под названием '*Lutea*'.

В ЦБС растения получены в 2001 г. Плоды сине-фиолетового цвета, с шипами, диаметром 0,8 см, созревают к концу сентября. Масса 1000 шт. семян 3 г., полнозернистость 20 %. В первые годы наблюдалось засыхание ветвей в нижней части кроны. В возрасте 25 лет высота растений превышает 2 м. Зиму переносят без повреждений.

'*Glauca*'. Дерево с конусовидной кроной, достигающее высоты 15–20 м и диаметра кроны 5–7 м. Ветви мощные, от прямостоячих до распростертых, плотные. Побеги и веточки толще, чем у других форм, сильно свисающие. Хвоя чешуевидная, от прилегающей до отстоящей, голубовато-зеленая. Многочисленные шишечки свисающие, шаровидные, до 1 см в диаметре, бурые. Семена в основном невсхожие. Растение светолюбиво, однако может выносить небольшое затенение. Растение не переносит сухих и известковых почв. Дымо- и газоустойчиво. Очень зимостойкое.

Известна с 1858 г. Часто встречается в культуре. Образует многочисленные плоды диаметром до 1,0 см сине-фиолетового цвета, которые созревают к концу сентября. Годичный прирост до 12 см. Высота растения около 150 см. Поражается паутинным клещом. Наблюдается засыхание ветвей в нижней части кроны, однако растение выглядит достаточно декоративно. Зимует без повреждений. Получена в 2001 г. из г. Курника (Польша) саженцем.

'*Tatra*'. Крона ширококоническая, густая, плотная, с многочисленными ветвями. Хвоя голубовато-зеленая, особенно летом; более голубая, чем у '*Glauca*', но мягче на ощупь и красивее.

Плоды фиолетового оттенка, с шипами, диаметром до 1,0 см, созревают к концу сентября. Растения выглядят здоровыми, хотя иногда наблюдается засыхание единичных ветвей в нижней части кроны. Растение достигает 1,9 м в высоту, годичный прирост до 10,0 см. Зиму переносит без повреждений. Выделена в 1975 г. в Чехии. Получена в 2001 г. из г. Курника саженцем.

Одновременно с декоративными формами кипарисовика нутканского была привлечена декоративная форма кипарисовика туполистного '*Lycopodioides*'. Имеет карликовую кустовидную или более или менее рыхлую шаровидную форму до 2,5 м высоты и 2 м ширины; ветви слегка приподнимающиеся, расположены неравномерно. Побеги толстые, на концах с гребешковидными густыми веточками, напоминающими плаун. Хвоя разного вида, плотная, темно-зеленая с голубоватым оттенком. Высота около 50 см, годичный прирост 5–6 см. Зимует без повреждений. Наблюдаемое весной подсыхание хвои в нижней части кроны обусловлено, вероятно, подгоранием от ярких весенних солнечных лучей. Декоративность к лету несколько восстанавливается, но остается достаточно низкой, что не позволяет рекомендовать ее для массовой культуры. В Европу завезена в 1861 г. Зибольдом из Японии. Нами получена в 2001 г. из питомника Piszarzewice (Польша) саженцем.

Введение перспективных декоративных форм в массовую культуру зависит как от их устойчивости в новых природно-климатических условиях, так и от уровня регенерационной способности стеблевых черенков, на основе которой разрабатываются эффективные технологии их размножения. Исследования показали [11], что большинству декоративных форм присуща высокая регенерационная способность стеблевых черенков. Достаточно легко укореняются нитчатые формы кипарисовика горохоплодного '*Filifera*' и '*Sungold*'. При создании необходимых условий укореняемость их черенков достигает 100 %. Низкорослые формы кипарисовика горохоплодного укореняются несколько хуже (до 40 %). Из-за высокой чувствительности к солнечным ожогам низкая укореняемость и у '*Squarrosa Intermedia*' (15–20 %). Из числа изученных садовых форм кипарисовика нутканского успешно размножаются '*Aurea*' и '*Glauca*' – укореняемость их составляет 60–100 % (у '*Tatra*' она значительно ниже – 10 %). Следует также отметить, что корни у черенков декоративных форм кипарисовиков появляются через 2–5 мес. Количество корней первого порядка составляет от 3 до 15 штук, их длина – 8–14 см (см. таблицу).

Максимальное количество корней на черенке образуется у '*Filifera*' (15 шт.). Корней второго порядка формы кипарисовика горохоплодного – 20–60 штук, их длина – 1–6 см. Максимальное количество корней третьего порядка у '*Filifera*' – 33–34, их длина – 1–2 см. У других форм количество корней

**Биометрические показатели укорененных черенков у культиваров различных видов
рода кипарисовик (*Chamaecyparis* Spach.)**

**Biometric indicators of rooted cuttings in cultivars of various speciesgenus Cypress
(*Chamaecyparis* Spach.)**

Декоративная форма	К-во корней, шт.		Длина корней, см	
	первого порядка	второго порядка	первого порядка	второго порядка
<i>Кипарисовик нутканский</i>				
'Aurea'	3,0 ± 0,1	34,0 ± 2,0	8,3 ± 0,4	2,4 ± 0,1
'Glauca'	6,0 ± 0,8	17,3 ± 1,6	5,5 ± 0,2	2,0 ± 0,1
'Tatra'	13,0 ± 0,1	54,0 ± 0,8	12,8 ± 0,4	1,6 ± 0,1
<i>Кипарисовик горохоплодный</i>				
'Filifera'	3,3 ± 0,4	42,6 ± 1,5	13,3 ± 1,4	6,0 ± 0,3
'Filifera Nana'	8,5 ± 1,5	19,5 ± 2,5	4,7 ± 0,8	0,7 ± 0,1
'Nana'	7,0 ± 0,4	42,0 ± 2,9	1,5 ± 1,3	2,4 ± 0,2
'Squarrosa Intermedia'	7,0 ± 0,9	24,0 ± 0,5	14,0 ± 1,6	2,8 ± 0,4
'Sungold'	9,3 ± 1,0	60,0 ± 5,6	11,9 ± 1,4	2,9 ± 0,1
<i>Кипарисовик туевидный</i>				
'Andelyensis'	11,3 ± 2,6	86,6 ± 0,2	12,3 ± 2,5	1,9 ± 1,0

составляет от 10 до 45 штук, длина – до 1 см, и только '*Filifera Nana*' не образует корней третьего порядка. Максимальный прирост надземной части черенков (22–25 см) дают '*Filifera*' и '*Sungold*'.

Укорененные черенки кипарисовика туевидного '*Andelyensis*' по развитию корневой системы близки к садовым формам кипарисовика горохоплодного, но отличаются большим количеством корней второго порядка (46–87 шт.). Однако из-за низкой устойчивости к отрицательным температурам зимнего периода он не рекомендуется для массового использования в зеленом строительстве Беларуси.

Заключение. Таким образом, по результатам собственных исследований и анализа опыта интродукции представителей рода *Chamaecyparis* Spach. перспективными для культивирования на всей территории республики являются декоративные формы кипарисовика горохоплодного. Декоративные формы кипарисовика Лавсона и кипарисовика нутканского рекомендуется использовать преимущественно в западных и юго-западных районах, в центральной части и северных областях растения следует высаживать в защищенных от сквозных ветров местах или укрывать их на зиму. Из декоративных форм кипарисовика туполистного в укрывной культуре могут использоваться карликовые формы высотой не более 0,5 м. Представители рода *Chamaecyparis* Spach. обладают достаточно высокой регенерационной способностью стеблевых черенков (укореняемость большинства изученных декоративных форм – от 60 до 100 %), что позволяет организовать выращивание посадочного материала в местных условиях.

Высокорослые формы кипарисовика горохоплодного ('*Filifera*', '*Squarrosa*') рекомендуется использовать в качестве акцента при посадке у водоемов, в садах и парках. Нитчатые формы с желтой окраской хвои ('*Sungold*') и карликовые ('*Filifera Nana*') следует высаживать на солнечных местах, в альпинариях, рабатках, одиночно на небольших участках.

Декоративные формы кипарисовика горохоплодного из группы '*Squarrosa*' ('*Snow*', '*Squarrosa Dumosa*', '*Squarrosa Intermedia*', '*Boulevard*' и др.) более чувствительны к солнечному освещению, поэтому их рекомендуется высаживать в полутени, в местах, защищенных от ветра и с высокой влажностью воздуха и почвы.

Список использованных источников

1. Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие культивируемые и перспективные для интродукции / редкол. : С. Я. Соколов, Б. К. Шишкин. – М. ; Л. : Из-во Акад. наук СССР, 1949. – Ч. 1 : Голосеменные. – 464 с.
2. Крюссман, Г. Хвойные породы / Г. Крюссман. – М. : Лесн. пром-ть, 1986. – 253 с.
3. List of names of woody plants: International standard ENA 2005–2010 / ed. M. H. A. Hoffman. – Boskoop : Applied Plant Research, 2005. – 871 p.

4. Auders, A. G. *Encyclopedia of Conifers* / A. G. Auders, D. P. Spicer. – Woking, United Kingdom : Royal Horticultural Society, 2012. – 1500 p.
5. Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР / отв. ред. П. И. Лапин. – М. : Гл. бот. сад АН СССР, 1972. – 27 с.
6. Лапин, П. И. Оценка перспективности интродукции древесных растений по данным визуальных наблюдений / П. И. Лапин, С. В. Сиднева // Опыт интродукции древесных растений : сб. науч. тр. / Гл. бот. сад АН СССР ; отв. ред. П. И. Лапин. – М., 1973. – С. 7–67.
7. Иванова, З. Я. Биологические основы и приемы вегетативного размножения древесных растений стеблевыми черенками / З. Я. Иванова. – Киев : Наук. думка, 1982. – 288 с.
8. Трейвас, Л. Ю. Болезни и вредители роз, хвойных и других декоративных растений: атлас-определитель / Л. Ю. Трейвас. – М. : Фитон XXI, 2017. – 360 с.
9. Древесные растения Центрального ботанического сада АН БССР / Е. З. Бобореко [и др.] ; под ред. Н. Д. Нестеровича. – Минск : Наука и техника, 1982. – 293 с.
10. Федорук, А. Т. Интродуцированные деревья и кустарники западной части Белоруссии / А. Т. Федорук. – Минск : Изд. БГУ, 1972. – 192 с.
11. Торчик, В. И. Ризогенез у декоративных садовых форм хвойных растений и способы его интенсификации / В. И. Торчик, А. Ф. Келько, А. Г. Холопук. – Минск : Беларус. навука, 2017. – 218 с.

References

1. *Trees and shrubs of the USSR. Wild cultivated and promising for introduction. Vol. 1. Gymnosperms.* Moscow, Leningrad, Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1949. 464 p. (in Russian).
2. Krüssmann G. *Handbuch der Nadelgehölze.* Berlin, Hamburg, Parey, 1972. 366 S. (Russ. ed.: Kryussman G. *Khvoynye porody.* Moscow, Lesnaya promyshlennost' Publ., 1986. 253 p.).
3. *List of Names of Woody Plants – International Standard ENA 2005–2010.* Wageningen, Applied Plant Research Publ., 2005. 871 p.
4. Auders A. G., Spicer D. P. *Encyclopedia of Conifers.* Royal Horticultural Society Publ., 2012. 1500 p.
5. Lapin P. I. (ed.). *The methodology of phenological observations in the botanical gardens of the USSR.* Moscow, Edition of the Main Botanical Garden of the USSR Academy of Sciences, 1972. 27 p. (in Russian).
6. Lapin P. I., Sidneva S. V. Assessment of the prospects of introduction of woody plants according to visual observations. *Opyt introduktsii drevesnykh rastenii: sbornik nauchnykh trudov* [Experience in introducing woody plants: a collection of scientific papers]. Moscow, 1973, pp. 7–67 (in Russian).
7. Ivanova Z. Ya. *Biological basis and methods of vegetative propagation of woody plants with stem cuttings.* Kiev, Navukova dumka Publ., 1982. 288 p. (in Russian).
8. Treivas L. Yu. *Diseases and pests of roses, conifers and other ornamental plants: atlas-determinant.* Moscow, Fiton XXI Publ., 2017. 360 p. (in Russian).
9. Boboreko E. Z., Nesterovich N. D., Orlenok E. I., Chakhovskii A. A., Shkutko N. V. *Woody plants of the Central Botanical Garden of the Academy of Sciences of the BSSR.* Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1982. 293 p. (in Russian).
10. Fedoruk A. T. *Introduced trees and shrubs of the western part of Belarus.* Minsk, Publishing House of the Belarusian State University, 1972. 192 p. (in Russian).
11. Torchik V. I., Kel'ko A. F., Kholopuk G. A. *Rizogenesis in ornamental garden forms of conifers and ways of its intensification.* Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2017. 218 p. (in Russian).

Информация об авторе

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

Information about the author

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

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 575.153:576.311.347: 576.311.342:575.174.015.3:575.224.22

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-358-364>

Поступила в редакцию 21.02.2020

Received 21.02.2020

**А. Е. Ермакович, М. Г. Синявская, В. С. Панкратов, О. Д. Левданский,
И. М. Голоенко, А. М. Шимкевич, Н. В. Луханина, О. Г. Давыденко**

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА ИЗМЕНЧИВОСТИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ ЯЧМЕНЯ МЕТОДОМ NGS-АНАЛИЗА ОРГАНЕЛЬНЫХ СМЕСЕЙ

Аннотация. Проведено сравнение полных последовательностей геномов хлоропластов и митохондрий диких (*Hordeum vulgare subsp. spontaneum*) и культурных (*Hordeum vulgare subsp. vulgare*) образцов ячменя с целью оценки их внутривидового разнообразия.

Объектами исследования стали 17 образцов ячменя, для которых было проведено секвенирование нового поколения (next generation sequencing – NGS) хлоропластной и примеси митохондриальной ДНК, полученных из фракции хлоропластов, изолированной методом дифференциального центрифугирования. Изучено также 5 полных последовательностей хлоропластного и 2 – митохондриального геномов ячменя, доступных в базе данных NCBI GenBank. При обработке полученных NGS-данных учитывали области гомологии внутри и между геномами.

Сравнительный анализ 22 хлоропластных геномов ячменя (10 *H. vulgare subsp. vulgare* и 12 *H. vulgare subsp. spontaneum*) выявил 107 полиморфных локусов: 9 INDEL (insertion or deletion), 79 SNP (single nucleotide polymorphism) и 19 полиморфизмов SSR-областей (simple sequence repeats). Из найденных SNP хлоропластного генома 20 были локализованы в экзонах генов.

Анализ 19 полных последовательностей митохондриальных геномов (8 *H. vulgare subsp. vulgare* и 11 *H. vulgare subsp. spontaneum*) показал более низкий уровень изменчивости данных органелл внутри вида: 1 INDEL и 22 SNP. Из 4 найденных в экзонах SNP 2 приходились на кодирующую область одного из генов малой субъединицы рибосом и 2 были расположены в экзоне псевдогена.

В результате исследования обнаружена высокая варибельность хлоропластных геномов *Hordeum vulgare* при относительно низкой изменчивости митохондриальных геномов внутри данного вида. Выявлен ряд полиморфных локусов хлоропластного и митохондриального геномов, которые могут быть использованы для внутривидовой идентификации и филогенетических исследований. Доказана эффективность метода NGS смесей хлоропластной и митохондриальной ДНК для получения полных последовательностей органельных геномов ячменя.

Ключевые слова: ячмень, хлоропластный геном, митохондриальный геном, секвенирование нового поколения, внутривидовое разнообразие

Для цитирования: Оценка изменчивости хлоропластных и митохондриальных геномов ячменя методом NGS-анализа органельных смесей / А. Е. Ермакович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 358–364. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-358-364>

**Anna E. Yermakovich, Maryna G. Siniauskaya, Vasili S. Pankratov, Aleh D. Liaudanski,
Innesa M. Halayenka, Andrei M. Shymkevich, Natalia V. Lukhanina, Oleg G. Davydenko**

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

BARLEY CHLOROPLAST AND MITOCHONDRIAL GENOMES DIVERSITY EVALUATION BY NGS OF THE ORGANELLE DNA MIXTURES

Abstract. In this study, complete chloroplast and mitochondrial genomes of wild (*Hordeum vulgare subsp. spontaneum*) and cultivated (*Hordeum vulgare subsp. vulgare*) barley forms were compared to evaluate the diversity of these genomes within the species.

NGS (next generation sequencing) was conducted for mixtures of chloroplast and mitochondrial DNA of 17 barley samples. The chloroplast DNA was obtained from the fraction of these organelles, isolated by differential centrifugation. Such fraction contained an admixture of mitochondrial DNA, which made it possible to conduct sequencing of both genomes simultaneously. The NGS data processing algorithm included some features to prevent mistakes during the alignment of reads from the homology regions within and between the genomes. Five sequences of barley chloroplast genome and two sequences of mitochondrial genome accessible in NCBI GenBank were also involved in the full-genome comparative analysis.

Comparison of 22 complete barley chloroplast genome sequences revealed a high level of diversity of these genomes within *Hordeum vulgare*. There were 107 polymorphic loci: 9 INDELs, 79 SNPs and 19 polymorphisms of SSR-regions (simple sequence repeats). Twenty from 79 found SNPs were located in coding sequences.

Analysis of 19 complete sequences of mitochondrial genomes (8 *H. vulgare subsp. vulgare* and 11 *H. vulgare subsp. spontaneum*) showed a lower level of variability of these organelles: 1 INDEL and 22 SNP (4 in coding sequences). Two SNPs were found in one of the genes of the small subunit of ribosomes and two were located in the exon of a pseudogene.

The results of the study proved the applicability of NGS of chloroplast and mitochondrial DNA mixtures to the obtaining of complete sequences of these genomes. Revealed polymorphic loci could be used for barley intraspecific identification and phylogeny.

Keywords: barley, chloroplast genome, mitochondrial genome, NGS, intraspecific diversity

For citation: Yermakovich A. E., Siniauskaya M. G., Pankratov V. S., Liaudanski A. D., Halayenka I. M., Shymkevich A. M., Lukhanina N. V., Davydenko O. G. Barley chloroplast and mitochondrial genomes diversity evaluation by NGS of the organelle DNA mixtures. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 358–364 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-358-364>

Введение. Большое количество копий на клетку, наследование по материнской линии, практическое отсутствие рекомбинации, а также наличие ключевых генов метаболизма делают хлоропласты и митохондрии удобным объектом популяционно-генетических, филогенетических, селекционных и эволюционных исследований [1, 2]. Секвенирование отдельных участков хлоропластного (хп) и митохондриального (мт) геномов часто применяется в филогении различных видов растений. Совершенствование методов полногеномного секвенирования повысило эффективность применения последовательностей оргanelльных геномов не только в межвидовых, но и во внутривидовых исследованиях [2–4].

Для изучения генетических эффектов взаимодействия ядра и цитоплазмы в лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси создана коллекция замещенных линий ячменя, полученных путем 7-кратного беккроссирования и сочетающих в себе ядерный и цитоплазматический геномы от различных форм [5]. Наличие в коллекции линий, несущих хп и мт геномы как культурных разновидностей ячменя (*Hordeum vulgare subsp. vulgare*), так и его дикорастущих форм (*Hordeum vulgare subsp. spontaneum*), делает ее удобным объектом для изучения разнообразия оргanelльных геномов внутри вида *Hordeum vulgare*.

Цель исследования – оценка разнообразия хлоропластных и митохондриальных геномов диких (*Hordeum vulgare subsp. spontaneum*) и культурных (*Hordeum vulgare subsp. vulgare*) образцов ячменя на основании анализа их полных последовательностей, полученных в результате секвенирования нового поколения (next generation sequencing – NGS).

ДНК оргanelл выделяли из фракции хлоропластов, изолированных методом дифференциального центрифугирования [6]. Такая фракция содержит примесь мт ДНК, что позволяет одновременно секвенировать хп и мт геномы каждого из образцов. Однако использование данного метода осложняется тем, что обработка полученных NGS-данных требует учета обширных областей гомологии как внутри каждого из геномов, так и между ними. Так, в ходе предварительного анализа гомологичных последовательностей между хп и мт геномами ячменя, имеющих длину не менее 100 пар оснований (Blast), было установлено, что общая длина таких последовательностей составляет 19 % от хп генома и 6 % от мт генома. Кроме того, каждый из геномов имеет обширные области внутренних повторов, длина которых достигает десятков тысяч нуклеотидов. Очевидно, что ошибочное выравнивание NGS-прочтений с таких областей может привести к серьезному искажению результатов секвенирования.

Таким образом, для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи: провести NGS смесей оргanelльной ДНК образцов диких и культурных образцов ячменя; оптимизировать алгоритм обработки данных NGS для смесей хп и мт ДНК ячменя с учетом областей гомологии внутри и между хп и мт геномами;

получить полные нуклеотидные последовательности хп и мт геномов для каждого из изучаемых образцов;

провести анализ изменчивости оргanelльных геномов внутри вида *Hordeum vulgare* с использованием полученных полных последовательностей, а также последовательностей хп и мт геномов ячменя из базы данных NCBI GenBank.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись хп и мт геномы 17 образцов ячменя: 12 замещенных линий, содержащих цитоплазмы как дикого (W1, W3, W4, W8, W9), так и культурного (Atlas, Himalaya) ячменя, а также 5 сортов (Vezha, Roland, Vizit, Sobolyok, Maresi).

Органельную ДНК трехдневных проростков ячменя выделяли, используя метод фенол-хлороформной экстракции из хп фракции, полученной путем дифференциального центрифугирования [6]. NGS смесей хп и мт ДНК осуществляли с помощью технологии Illumina, с использованием секвенатора MiSeq System, набора для приготовления библиотек NexteraXT, наборов для секвенирования MiSeq Reagent Kit v.2 и v.3.

Процесс обработки NGS-данных был заранее отработан на искусственных прочтениях, сгенерированных в наборе инструментов ART и обладающих характеристиками, максимально приближенными к реальным. Алгоритм включал следующие этапы: очистку FASTQ-файлов (Trimmomatic-0.36); выравнивание прочтений на «слитый» референс, включающий полные последовательности хп (NC_008590) и мт (AP017301) геномов *H. vulgare subsp. vulgare* (Bowtie2-2.3.3); получение статистики качества выравнивания (bash scripts, Bcftools-1.5); визуализацию выравнивания прочтений (Tablet); получение и фильтрацию VCF-файлов (Samtools-1.5, Vcfliib). Полученные в результате файлы формата VCF (Variant Call Format) представляли собой таблицы, содержащие все полиморфные по отношению к референсным последовательностям позиции геномов. На основании полученных VCF были созданы FASTA-последовательности полных геномов хлоропластов и митохондрий (SnapGene 5.0.5) [7].

Кроме полученных нами последовательностей при сравнительном анализе геномов органелл были использованы полные последовательности хп и мт геномов ячменя, доступные в базе данных NCBI GenBank (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Последовательности органелльных геномов ячменя из базы данных NCBI GenBank

Table 1. Barley organellar genome sequences from the NCBI GenBank database

Последовательность	Организм	Номер доступа в NCBI GenBank	Длина, п. о.	Источник
Хлоропластный геном	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	NC_008590	136462	C. Saski с соавт. [8]
		KC912687	115974	C. P. Middleton с соавт. [9]
		KT962228	136462	Q. X. Zeng с соавт. [10]
	<i>Hordeum vulgare subsp. spontaneum</i>	KC912688	114434	Middleton C. P. с соавт. [9]
		KC912689	114873	
Митохондриальный геном	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	AP017301	525599	H. Hisano, M. Tsujimura,
	<i>Hordeum vulgare subsp. spontaneum</i>	AP017300	525599	T. Terachi, K. Sato [11]

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования был оптимизирован алгоритм обработки данных NGS для получения полных последовательностей хп и мт геномов ячменя при секвенировании смесей органелльной ДНК, полученной из фракции хлоропластов (см. *Объекты и методы исследования*). Данный алгоритм содержит стандартные этапы обработки NGS-прочтений при ресеквенировании геномов (очистка прочтений, выравнивание на референсную последовательность, получение и фильтрация VCF-файлов), однако включает особенности, необходимые для исключения ошибки выравнивания прочтений, относящихся к гомологичным областям генома (см. рисунок). Результаты тестирования метода подтвердили его применимость для обработки данных NGS смесей хп и мт ДНК с различными соотношениями их концентраций.

В результате обработки данных NGS получены полные нуклеотидные последовательности хп и мт геномов 17 образцов, несущих цитоплазму 5 диких форм (*Hordeum vulgare subsp. spontaneum*) и 7 культурных сортов (*Hordeum vulgare subsp. vulgare*) ячменя. В табл. 2 приведена более подробная информация об исследуемых образцах, а также номера доступа к полученным полным последовательностям в NCBI GenBank.

На основании полученных данных, а также последовательностей хп и мт геномов из базы данных NCBI GenBank (табл. 1) был проведен анализ изменчивости органелльных геномов ячменя, результаты которого представлены в табл. 3.



Алгоритм апрацоўкі даных NGS смесей хлоропластнай і мітохондрыяльнай ДНК ячменя
 NGS data processing algorithm for barley chloroplast and mitochondrial DNA mixtures

Таблица 2. Образцы ячменя, для которых получены полные последовательности хп и мт геномов

Table 2. Barley samples with obtained complete sequences of cp and mt genomes

Тип образца	Название образца	Номер доступа в NCBI GenBank		Страна происхождения источника цитоплазмы	Источник цитоплазмы
		Хп-геном	Мт-геном		
Замещенные линии ячменя (BC ⁷)	Vizit (W3)	MN171383	MN127980	Израиль	<i>Hordeum vulgare subsp. spontaneum</i>
	Vezha (W3)	MN171381	MN127977		
	Roland (W3)	MN171377	MN127971		
	Vizit (W4)	MN171384	MN127981	Израиль	
	Roland (W4)	MN171378	MN127972		
	Vizit (W8)	MN171385	MN127982	Израиль	
	Roland (W8)	MN171379	MN127973		
	Vezha (W8)	MN171382	MN127978		
	Roland (W1)	MN171376	MN127970	Израиль	
Roland (W9)	MN171380	MN127974	Израиль		
Roland (Atlas)	MN171387	MN127967	США, Калифорния		
Roland (Himalaya)	MN171389	MN127968	Непал		
Сорта ячменя	Vezha	MN171391	MN127976	Беларусь	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>
	Roland	MN171388	MN127969	Швеция	
	Vizit	MN171392	MN127979	Беларусь	
	Sobolyok	MN171390	MN127975	Россия	
	Maresi	MN171386	MN127966	Германия	

Таблица 3. Изменчивость оргanelльных геномов ячменя в исследуемой выборке

Table 3. The variability of barley organellar genomes in the study sample

Тип полиморфизмов	Общее число полиморфизмов (в том числе в кодирующей области)	
	Хлоропластный геном	Митохондриальный геном
Инсерции/делеции (INDEL)	9 (0)	1 (0)
Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP)	79 (20)	22 (4)
Изменчивость микросателлитных локусов (SSR)	19 (0)	0

В ходе сравнительного анализа 22 полных последовательностей хп геномов ячменя (10 образцов *H. vulgare subsp. vulgare* и 12 образцов *H. vulgare subsp. spontaneum*) выявлено 107 полиморфных локусов (табл. 3). Большинство найденных полиморфизмов расположено в некодирующей области генома, что может быть объяснено относительной консервативностью хп генов у представителей одного вида (*H. vulgare*). Тем не менее, 20 из 79 обнаруженных SNP располагались в экзонах генов субъединиц РНК-полимеразы (*rpoA*, *rpoC1*, *rpoC2*), АТФ-синтазы (*atpA*), НАДН-дегидрогеназы (*ndhA*, *ndhD*, *ndhH*, *ndhG*, *ndhK*), апопротеина А1 фотосистемы I (*psaA*), фактора инициации трансляции 1 (*infA*) и матуразы К (*matK*); 6 из них приводили к замене аминокислоты в кодируемой белковой последовательности (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Обнаруженные несинонимичные SNP хлоропластного генома ячменя

T a b l e 4. Discovered nonsynonymous SNPs of the barley chloroplast genome

Позиция в хп геноме (NC_008590)	Предковый аллель	Производный аллель	Замена аминокислоты	Ген (NCBI ID)	Продукт гена	Формы, несущие производный аллель
2634	C	T	Val370Ile	<i>matK</i> (4525145)	Интронная матураза	Roland (W9)
3242	A	G	Leu167Pro			<i>H. spontaneum</i> KC912688
25067	T	G	Asn571Lys	<i>rpoC1</i> (452512)	β'-субъединица РНК-полимеразы	Roland (W9)
49408	T	C	Lys233Asn	<i>ndhK</i> (4525141)	К-субъединица НАДН-дегидрогеназы	Roland (W9)
76884	G	A	Ser87Leu	<i>infA</i> (4525109)	Фактор инициации трансляции 1	Vizit (W3), Vezha (W3), Roland (W3), Vizit (W4), Roland (W4), Roland (W1)
111390	C	T	Gly16Glu	<i>ndhG</i> (4525170)	6-субъединица НАДН-дегидрогеназы	Roland (W9)
115228	T	G	Arg136Arg	<i>ndhH</i> (4525173)	7-субъединица НАДН-дегидрогеназы	Vizit (W3), Vezha (W3), Roland (W3), Vizit (W4), Roland (W4), Roland (W1), Vizit (W8), Vezha (W8), Roland (W8), Vezha

Анализ 19 полных последовательностей митохондриальных геномов (8 образцов *H. vulgare subsp. vulgare* и 11 образцов *H. vulgare subsp. spontaneum*) выявил сравнительно низкий уровень изменчивости данных органелл внутри вида: всего 1 INDEL и 22 SNP. Из 4 найденных в экзонах SNP 2 приходились на кодирующую область одного из генов малой субъединицы рибосом (*rps 4*), а остальные 2 были расположены в экзоне псевдогена (*rps3a_p*).

Выводы

1. В результате исследования полных последовательностей хлоропластных геномов ячменя обнаружена их высокая вариабельность внутри вида *Hordeum vulgare*, ранее не описанная для геномов органелл данного вида. Уровень изменчивости митохондриальных геномов *Hordeum vulgare* был заметно ниже, чем хлоропластных.

2. Выявлен ряд полиморфизмов хлоропластных и митохондриальных геномов, которые могут быть использованы для внутривидовой идентификации и филогенетических исследований ячменя. Найденные полиморфизмы в кодирующей области лежат в генах белков, вовлеченных в ключевые процессы жизнедеятельности растительной клетки (дыхание, фотосинтез, транскрипция и трансляция) и могут оказывать влияние на фенотип растений.

3. Метод NGS смесей хлоропластной и митохондриальной ДНК представляет собой оригинальный подход, позволяющий получать одновременно данные об изменчивости обоих геномов. При небольшой модификации процесса обработки NGS-прочтений он может быть использован и для других культур.

Благодарности. Работа выполнена в рамках ГПНИ «Биотехнологии», 2016–2020 гг., подпрограмма 2 «Структурная и функциональная геномика», задания 2.06 и 2.29.

Acknowledgements. The study was carried out as a part of the State Scientific Research Program “Biotechnologies”, 2016–2020, Subprogram 2 “Structural and functional genomics”, assignments 2.06 and 2.29.

Список использованных источников

1. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering / H. Daniel [et al.] // *Genome Biol.* – 2016. – Vol. 17, N 1. – Art. 134. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>
2. Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome / Y. Ogihara [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – Vol. 33, N 19. – P. 6235–6250. <https://doi.org/10.1093/nar/gki925>
3. Chloroplast genomic resources for phylogeny and DNA barcoding: a case study on *Fritillaria* / Y. Bi [et al.] // *Sci. Reports.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – Art. 1184. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19591-9>
4. Targeted resequencing reveals genomic signatures of barley domestication / A. Pankin [et al.] // *New Phytologist.* – 2018. – Vol. 218, N 3. – P. 1247–1259. <https://doi.org/10.1111/nph.15077>
5. The productivity characteristics of substituted barley lines collection with marked chloroplast and mitochondrial genomes / I. M. Goloenko [et al.] // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – Vol. 7, N 2A. – P. 483–491.
6. Triboush, S. O. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower / S. O. Triboush, N. G. Danilenko, O. G. Davydenko // *Plant Mol. Biol. Reporter.* – 1998. – Vol. 16. – P. 183–189. <https://doi.org/10.1023/A:1007487806583>
7. NGS data processing method for the mixture of chloroplast and mitochondrial DNA of barley / M. Makarevich [et al.] // *Systems biology and bioinformatics (SBB–2018) : Tenth International young scientists school, within the framework of the 11th International conference BGRS/SB–2018, Novosibirsk, Russia, 27–31 Aug., 2018 : abstracts* / Inst. of Cytology and Genetics, Siberian branch of the Rus. Acad. of Sci. [et al.]. – Novosibirsk, 2018. – P. 29.
8. Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes / C. Saski [et al.] // *Theor. Appl. Genetics.* – 2007. – Vol. 115, N 4. – P. 571–590. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0595-0>
9. Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae tribe / C. P. Middleton [et al.] // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 9, N 3. – P. e85761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085761>
10. The complete chloroplast genome of Tibetan hulless barley / Q. X. Zeng [et al.] // *Mitochondrial DNA. Part A.* – 2017. – Vol. 28, N 3 – P. 324–325. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1122765>
11. Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*) / H. Hisano [et al.] // *BMC Genomics.* – 2016. – Vol. 17, N 1. – Art. 824. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3159-3>

References

1. Daniel H., Lin C.-S., Yu M., Chang W.-J. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 2016, vol. 17, no. 1, art. 134. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>
2. Ogihara, Y., Yamazaki, Y., Murai K., Kanno A., Terachi T., Shiina T. [et al.]. Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research*, 2005, vol. 33, no. 19, pp. 6235–6250. <https://doi.org/10.1093/nar/gki925>
3. Bi Y., Zhang M., Xue J., Dong R., Du Y., Zhang X.-H. Chloroplast genomic resources for phylogeny and DNA barcoding: a case study on *Fritillaria*. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, art. 1184. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19591-9>
4. Pankin A., Altmüller J., Becker C., von Korff M. Targeted resequencing reveals genomic signatures of barley domestication. *New Phytologist*, 2018, vol. 218, no. 3, pp. 1247–1259. <https://doi.org/10.1111/nph.15077>
5. Goloenko I. M., Lukhanina N. V., Shimkevich A. M., Aksyonova E. A., Danilenko N. G., Davydenko O. G. The productivity characteristics of substituted barley lines collection with marked chloroplast and mitochondrial genomes. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2002, vol. 7, no. 2A, pp. 483–491.
6. Triboush S. O., Danilenko N. G., Davydenko O. G. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, vol. 16, pp. 183–189. <https://doi.org/10.1023/A:1007487806583>
7. Makarevich M., Pankratov V., Sinyavskaya M., Lukhanina N., Shymkevich A., Liaudansky A., Goloenko I., Danilenko N., Davydenko O. NGS data processing method for the mixture of chloroplast and mitochondrial DNA of barley. *Systems biology and bioinformatics (SBB–2018): the Tenth International young scientists school, within the framework of the 11th International conference BGRS/SB–2018. Novosibirsk, Russia, 27–31 August, 2018: abstracts*. Novosibirsk, 2018, p. 29.
8. Saski C., Lee S. B., Fjellheim S., Guda C., Jansen R. K., Luo H., Tomkins J., Rognli O. A., Daniell H., Clarke J. L. Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, vol. 115, no. 4, pp. 571–590. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0595-0>
9. Middleton C. P., Senerchia N., Stein N., Akhunov E. D., Keller B., Wicker T., Kilian B. Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae tribe. *PLoS ONE*, 2016, vol. 9, no. 3, p. e85761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085761>

10. Zeng Q. X., Yuan J. H., Wang L. Y., Xu J. Q., Nyima T. The complete chloroplast genome of Tibetan hullless barley. *Mitochondrial DNA. Part A*, 2017, vol. 28, no. 3, pp. 324–325. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1122765>

11. Hisano H., Tsujimura M., Yoshida H., Terachi T., Sato K. Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). *BMC Genomics*, 2016, vol. 17, no. 1, art. 824. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3159-3>

Информация об авторах

Ермакович Анна Евгеньевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bio.makarevich@gmail.com

Синявская Марина Георгиевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: m.sin@inbox.ru

Панкратов Василий Сергеевич – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vasilipankratov@gmail.com

Левданский Олег Дмитриевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 666555@tut.by

Голоенко Инна Михайловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: goloenkoi@tut.by

Шимкевич Андрей Михайлович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shymkevichandrei@mail.ru

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

Давыденко Олег Георгиевич – член-корреспондент, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: davydenko@tut.by

Information about the authors

Anna E. Yermakovich – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bio.makarevich@gmail.com

Maryna G. Siniauskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: m.sin@inbox.ru

Vasili S. Pankratov – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vasilipankratov@gmail.com

Aleh D. Liaudanski – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 666555@tut.by

Innesa M. Halayenka – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: goloenkoi@tut.by

Andrei M. Shymkevich – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shymkevichandrei@mail.ru

Natalia V. Lukhanina – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: n_lukhanina@mail.ru

Oleg G. Davydenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: davydenko@tut.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.954:712.423

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-365-373>

Поступила в редакцию 01.04.2020

Received 01.04.2020

В. Н. Прохоров

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

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЧИСТЫХ ОТ МНОГОЛЕТНИХ СОРНЯКОВ ГАЗОННЫХ ТРАВСТОЕВ

Аннотация. В статье проведен анализ хорошо известных подходов, применяемых для ограничения численности одуванчика лекарственного в газонных травостоях и регулирования процессов роста газонных трав. На основе полученных собственных экспериментальных данных установлены наиболее эффективные сочетания препаратов для формирования чистых от многолетних сорняков газонных травостоев.

Ключевые слова: городские газоны, одуванчик лекарственный, ингибиторы роста

Для цитирования: Прохоров, В. Н. Актуальные вопросы формирования чистых от многолетних сорняков газонных травостоев / В. Н. Прохоров // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 365–373. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-365-373>

Valery N. Prokhorov

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

ACTUAL ISSUES OF FORMING LAWN GRASS STANDS CLEAN OF PERENNIAL WEEDS

Abstract. The article analyzes practical approaches to the use of growth regulators and herbicides in practice in order to limit the number of dandelion medicinal in lawn grass and regulate the growth of lawn grasses. On the basis of their own experimental data, the most effective compositions for solving these problems have been established.

Keywords: urban lawns, dandelion, growth inhibitors

For citation: Prokhorov V. N. Actual issues of forming lawn grass stands clean of perennial weeds. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 365–373 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-365-373>

Введение. В условиях высокого уровня урбанизации оздоровительная роль газонов особенно неопределима. Широкое использование газонов, которые испаряют большое количество влаги, повышают относительную влажность воздуха и создают прохладу над поверхностью, являются преградой для распространения шумов, а благодаря своей ровной поверхности и однородной зеленой окраске успокаивающе воздействуют на психику человека, позволяет сократить площадь пылеобразующих и сильно нагреваемых поверхностей и улучшить микроклимат. Хорошо известны также газо- и дымопоглощающая способность газонных трав, их высокая устойчивость ко многим вредным химическим веществам [1–6].

Газоны имеют огромное декоративно-планировочное значение и являются одним из основных элементов любого парка, сада, сквера и т. д. Создание новых газонов – наиболее простой, легкий и экономичный способ озеленения, а их устройство и содержание значительно дешевле, чем устройство и содержание такой же единицы площади замощенного участка. Удельный вес газонов в зеленом строительстве и садово-парковом хозяйстве очень велик – от 40 до 90 %, в результате чего их хозяйственно-экономическое значение существенно повышается.

В городских условиях газоны подвергаются сильному антропогенному загрязнению, что приводит к выпадению злаковых растений, появлению свободных экологических ниш, а следовательно, к проникновению в такие фитоценозы различных видов сорных растений. Если однолетние виды сорных растений достаточно легко удаляются из структуры газона путем регулярного

скашивания, то многолетние их виды не только снижают эстетическое восприятие, но и постепенно вытесняют злаки из травостоя. Особенно сильным является проникновение в городские газоны одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.), который благодаря своей высокой плодовитости и способности к расселению быстро занимает освобождающиеся экологические ниши.

На нарушенных местообитаниях семенная продуктивность одуванчика лекарственного достигает 7000 семян и более на одно растение [7, 8]. На сильно засоренных участках количество семян может достигать 60 000 шт/м². Полной спелости семена достигают уже через 7 дней после начала цветения. Полностью зрелые семена не имеют первичного покоя и могут прорасти почти сразу после того как покинут материнское растение. Полевая всхожесть семян одуванчика лекарственного обычно составляет 80–90 %. В почве семена сохраняют жизнеспособность от 20 мес. до 50 лет [7].

Высокая конкурентоспособность одуванчика обусловлена не только высокой семенной продуктивностью, но и способностью его корневой системы проникать глубоко в почву, что обеспечивает растению преимущество в поглощении питательных веществ и воды. Так, в засушливые годы разрастание одуванчика обусловлено ослаблением конкуренции со стороны других видов растений [9], а также тем, что его корень интенсивно поглощает воду даже после срезания листьев. Кроме того, благодаря высокой конкурентоспособности и аллелопатической активности одуванчик лекарственный оказывает существенное влияние на изменение структуры фитоценозов [10]. Одуванчик – эксплерент. Он способен быстро занимать пространства, лишенные растительности, а также участки с разреженными травостоями. Семена могут прорасти как с поверхности почвы, так и находясь на небольшой глубине в почве. Максимальное количество проростков отмечается при размещении семян на глубине до 1,5 см. С глубины 4 см семена не прорастают. Жизненный цикл растения проходит за 10–20 лет и более [11]. Отмечается, что выделяемые им вещества угнетают прорастание овсяницы красной (*Festuca rubra* L.) и мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) [12] – основных злаковых компонентов фитоценозов.

В настоящее время борьба с многолетними видами сорняков в Беларуси решается с помощью разрешенных к применению в городских условиях химических препаратов Балерина СЭ, Линтур ВДГ, Лонтрел 300 ВР. Однако в последние годы отмечается значительное повышение устойчивости растений одуванчика лекарственного к данным гербицидам, особенно к Лонтрелу. Это приводит к существенному засорению одуванчиком городских газонов, обуславливая снижение их декоративных качеств и насыщение воздуха пылью. Пыльца одуванчика может вызвать ряд сильных аллергических реакций дыхательных путей и кожных покровов человека. Известно, что аллергия на пыльцу одуванчика, или поллиноз (сезонный аллергический риноконъюнктивит), является одним из стимуляторов тяжелого заболевания – бронхиальной астмы. Одним из экологически безопасных способов формирования высококачественных, чистых от сорняков газонов является обработка травостоя гербицидами, относящимися к III–IV классу опасности, и регуляторами роста. Кроме того, грамотно разработанная программа применения гербицидов и регуляторов роста позволяет снизить затраты на стрижку и вывоз травы на 50 % и более [13]. В последнее время в мире идет активный поиск и разработка микогербицидов, однако за полвека реально применяются не более двух десятков. В основном они предназначены для борьбы с инвазивными, наркотическими и паразитическими видами и имеют низкое избирательное действие.

В связи с этим разработка экологически безопасных способов ингибирования роста, развития и формирования жизнеспособного потомства одуванчика лекарственного имеет практическое значение для создания зеленых зон в условиях урбанизированной среды. Кроме того, использование биологически активных соединений будет способствовать повышению качества городских газонов за счет усиления процессов кущения злаковых трав, что позволит формировать более плотную дернину, а также снижать количество аллергенной пыли одуванчика лекарственного в период его массового цветения.

Цель работы – разработка экологически безопасных способов подавления роста, развития и формирования жизнеспособного потомства у одуванчика лекарственного, позволяющих сократить материальные и трудовые затраты по уходу за газонами.

Объекты и методы исследования. Объекты исследования – травостой газонных трав, засоренные одуванчиком лекарственным. Полевые опыты проводили в 2015–2018 гг. в Октябрьском районе г. Минска (РНПЦ травматологии) и Ленинском районе г. Минска (Лошицкий парк, УП «Минскзеленстрой»). Сильно засоренные многолетними сорными растениями, особенно одуванчиком лекарственным, газонные травостой обрабатывали гербицидами Балерина СЭ (ЭГЭ 2,4-Д кислоты, 410 г/л + флорасулам, 7,4 г/л), Линтур ВДГ (триасульфурон, 41 г/кг + дикамб, 659 г/кг), Лонтрел-300 ВР (клопиралид, 300 г/л), Магнум ВДГ (метсульфурон-метил, 600 г/кг), а также регулятором роста Фазор ВГ (800 г/кг малеинового гидразида по калиевой соли). Все использованные в опытах препараты внесены в «Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь».

Изучали влияние однократного применения препаратов и их баковых смесей, внесенных путем опрыскивания (через 3–4 дня после скашивания газона) весной (2–3-я декада мая) и осенью (2–3-я декада сентября). При проведении опытов использовали следующие схемы внесения доз препаратов: контроль; Фазор, 7,5 кг/га; Фазор, 3,75 кг/га; Фазор, 1,88 кг/га; Фазор, 1,00 кг/га; Магнум, 30 г/га; Магнум, 15 г/га; Магнум, 7,5 г/га; Фазор, 3,75 кг/га + Магнум, 15 г/га; Фазор, 1,88 кг/га + Магнум, 15 г/га; Фазор, 1,88 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; Фазор, 1,00 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; Лонтрел, 0,66 л/га; Линтур, 0,18 кг/га; Балерина, 0,5 л/га. Площадь делянки – 25 м².

Действие изучаемых препаратов на растения одуванчика лекарственного и газонный травостой оценивали по таким показателям, как количество растений одуванчика лекарственного до и после обработки в течение всего вегетационного периода; вес надземной биомассы, ее структура и доля растений одуванчика в ней; высота газонного травостоя; плотность газонного травостоя; содержание хлорофилла в растениях; проективное покрытие злаковых компонентов и одуванчика; видовой состав сорной растительности; декоративность и выровненность газона; цвет и степень повреждения газонных трав под влиянием изучаемых препаратов. Газонный травостой до проведения обработок был сильно засорен растениями одуванчика лекарственного (до 32 растений на 1 м²) и другими сорными видами, среди которых преобладали торица полевая (*Spérgula arvensis* L.), люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L.), тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.), пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursa-pastoris* L.), дымянка аптечная (*Fumaria officinalis* L.), осот полевой (*Sonchus arvensis* L.), подмаренник настоящий (*Galium verum* L.), горец птичий (*Polygonum aviculare* L.), подорожник большой (*Plantago major* L.).

Результаты и их обсуждение. Применение регулятора роста гидразид малеиновой кислоты (ГМК) в различных дозах (препарат Фазор) показало, что при высоких концентрациях (3,75–7,5 кг/га) он проявляет свойства гербицида сплошного действия, уничтожая как однодольные травянистые растения, так двудольные (в том числе одуванчик лекарственный). Меньшие дозы (1,00–1,88 кг/га) не оказывают угнетающего действия на злаковые компоненты газонного травостоя, но их эффективность ниже, чем при воздействии на растения одуванчика лекарственного. При применении ГМК отмечается снижение ростовых процессов злаков. Основными факторами, влияющими на характер действия препарата Фазор, являются дозировка препарата, время применения, физиологическое состояние растений в период обработки и условия внешней среды. Его действие наиболее эффективно проявляется в условиях, обеспечивающих активный обмен веществ в растениях (благоприятные условия влажности, температуры воздуха и питания растений). Основную роль при этом играет влажность почвы и воздуха. В условиях нормальной и повышенной влажности ГМК активно проникает в растение и вызывает продолжительное торможение роста, не снижая декоративных качеств газона.

При дефиците влаги происходит усиление гидролитических и затухание синтетических процессов, вследствие чего отмечается задержка роста растений. Воздействие в этих условиях ГМК усугубляет нарушение обмена веществ и осмотических свойств клеток, что в конечном итоге приводит к увяданию растений и проявлению у них антоциановой (серовато-фиолетовой) окраски.

Однократное опрыскивание растений в дозировке 3,75 кг/га вызывает торможение роста злаков в течение 2 мес. Оптимальные сроки применения ГМК – весна (после достижения полной декоративности газона, через 3–4 дня после скашивания). После прекращения действия ГМК наблюдается усиление побегообразования у обработанных растений, что способствует повышению



Рис. 1. Внешний вид растений одуванчика лекарственного: слева – до обработки гербицидами, справа – через 3 недели после обработки препаратом Фазор

Fig. 1. View of plants dandelion medicinal: on the left – before treatment with herbicides, on the right – 3 weeks after treatment with the drug Fazor

проективного покрытия почвы травостоем, более равномерному распределению растений на поверхности газона, а следовательно, и улучшению декоративного внешнего вида газона в целом.

Эффективность действия препарата Фазор в отношении одуванчика лекарственного ниже, чем у изученных гербицидов, а доля его растений в газонном травостое при уменьшении дозы с 7,5 до 1,0 кг/га увеличивается от 3 до 35 %. У обработанных растений одуванчика листья сначала краснеют и сморщиваются, потом ослизняются и высыхают (рис. 1).

Наибольшая эффективность в опытах по ограничению распространения и искоренению растений одуванчика лекарственного отмечена у препарата Магнум и его баковых смесей с препаратом Фазор (рис. 2). При применении этих композиций доля одуванчика в газонном травостое в сравнении с контролем снижалась до 2–3 %. Из препаратов, уже используемых в борьбе с одуванчиком лекарственным, наиболее эффективны Лонтрел (14 %) и Балерина (17 %), менее – Линтур (25 %). Следует подчеркнуть, что если после применения препарата Магнум и его баковых смесей с препаратом Фазор отмечается длительное (до 3–4 мес. и более) практически полное отсутствие растений одуванчика лекарственного в газонных травостоях, то при обработке препаратами Линтур и Балерина уже через 2 мес. наблюдается значительное увеличение засоренности газона сорной растительностью. Препарат Лонтрел в этом плане занимает промежуточное положение, однако его эффективность по сравнению с препаратом Магнум и его баковыми смесями с регулятором роста Фазор сильнее зависит от экологических условий в период обработки.

Гербицид Магнум и его баковая смесь с препаратом Фазор эффективны не только в уничтожении сорной растительности, но и в торможении роста газонных трав и накоплении ими надземной биомассы. Высота газонного травостоя через 10 дней после скашивания (через 2 мес. после обработки) в вариантах с препаратом Магнум и его баковыми смесями с препаратом Фазор почти в 2 раза меньше, чем в контроле (рис. 3). В варианте с препаратом Лонтрел, наоборот, на фоне сильного сокращения засоренности газонного травостоя сорными растениями отмечается существенный рост злаковых компонентов в высоту, что связано с расширением их экологических ниш, в первую очередь за счет выпадения одуванчика лекарственного. Это обусловило не только улучшение светового режима, но и снижение негативного аллелопатического воздействия одуванчика на злаки. В отличие от Лонтрела, Магнум и его баковые смеси на этом фоне проявляют ингибирующее действие на рост злаков, что позволяет не только снизить число кошений газона, но и уменьшить биомассу газонной травы (рис. 4), а соответственно, затраты на ее вывоз. Препараты Балерина и особенно Линтур оказывают слабое влияние на рост злаковых компонентов.

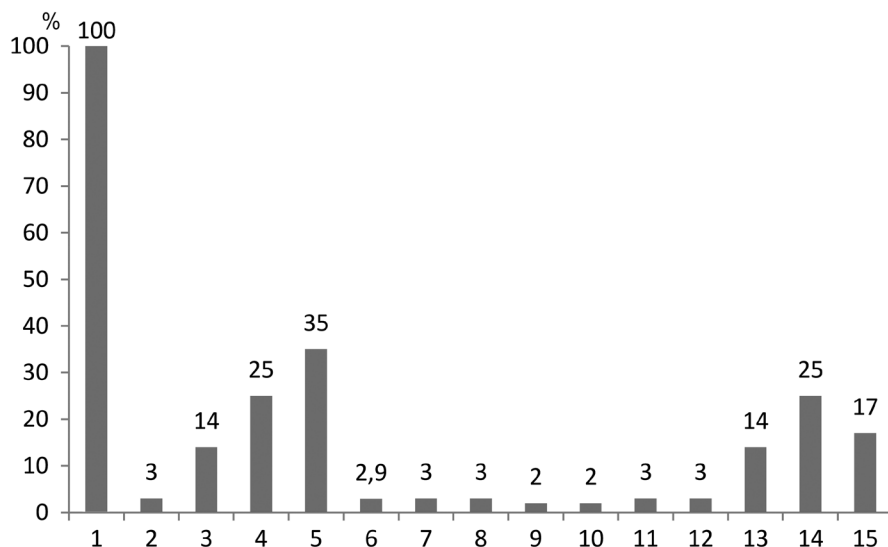


Рис. 2. Влияние обработки газонов различными препаратами и их баковыми смесями на количество растений одуванчика лекарственного в газонном травостое: 1 – контроль; 2 – Фазор, 7,5 кг/га; 3 – Фазор, 3,75 кг/га; 4 – Фазор, 1,88 кг/га; 5 – Фазор, 1 кг/га; 6 – Магнум, 30 г/га; 7 – Магнум, 15 г/га; 8 – Магнум, 7,5 г/га; 9 – Фазор, 3,75 кг/га + Магнум, 15 г/га; 10 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 15 г/га; 11 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 12 – Фазор, 1,0 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 13 – Лонтрел, 0,66 л/га; 14 – Линтур, 0,18 кг/га; 15 – Балерина, 0,5 л/га

Fig. 2. The effect of lawn treatment with various preparations and their tank mixtures on the number of dandelion plants in a lawn grass stand: 1 – control; 2 – Phasor, 7.5 kg/ha; 3 – Phasor, 3.75 kg/ha; 4 – Phasor, 1.88 kg/ha; 5 – Phasor, 1 kg/ha; 6 – Magnum, 30 g/ha; 7 – Magnum, 15 g/ha; 8 – Magnum, 7.5 g/ha; 9 – Phasor, 3.75 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 10 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 11 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 12 – Phasor, 1.0 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 13 – Lontrel, 0.66 l/ha; 14 – Lintur, 0.18 kg/ha; 15 – Ballerina, 0.5 l/ha

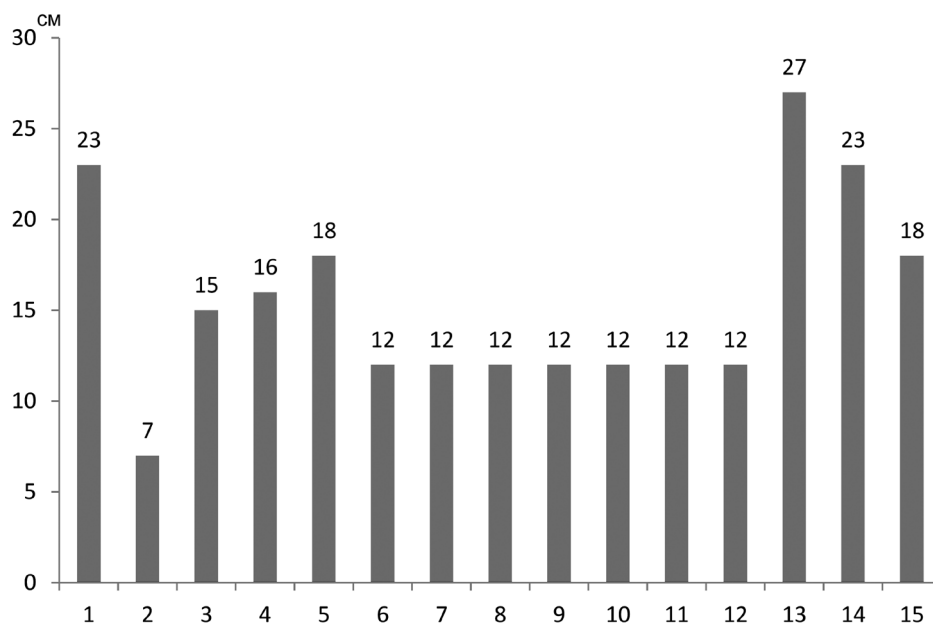


Рис. 3. Влияние обработки газонов различными препаратами и их баковыми смесями на высоту газонного травостоя: 1 – контроль; 2 – Фазор, 7,5 кг/га; 3 – Фазор, 3,75 кг/га; 4 – Фазор, 1,88 кг/га; 5 – Фазор, 1 кг/га; 6 – Магнум, 30 г/га; 7 – Магнум, 15 г/га; 8 – Магнум, 7,5 г/га; 9 – Фазор, 3,75 кг/га + Магнум, 15 г/га; 10 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 15 г/га; 11 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 12 – Фазор, 1,0 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 13 – Лонтрел, 0,66 л/га; 14 – Линтур, 0,18 кг/га; 15 – Балерина, 0,5 л/га

Fig. 3. The effect of lawn treatment with various preparations and their tank mixtures on the height of the lawn grass stand: 1 – control; 2 – Phasor, 7.5 kg/ha; 3 – Phasor, 3.75 kg/ha; 4 – Phasor, 1.88 kg/ha; 5 – Phasor, 1 kg/ha; 6 – Magnum, 30 g/ha; 7 – Magnum, 15 g/ha; 8 – Magnum, 7.5 g/ha; 9 – Phasor, 3.75 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 10 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 11 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 12 – Phasor, 1.0 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 13 – Lontrel, 0.66 l/ha; 14 – Lintur, 0.18 kg/ha; 15 – Ballerina, 0.5 l/ha

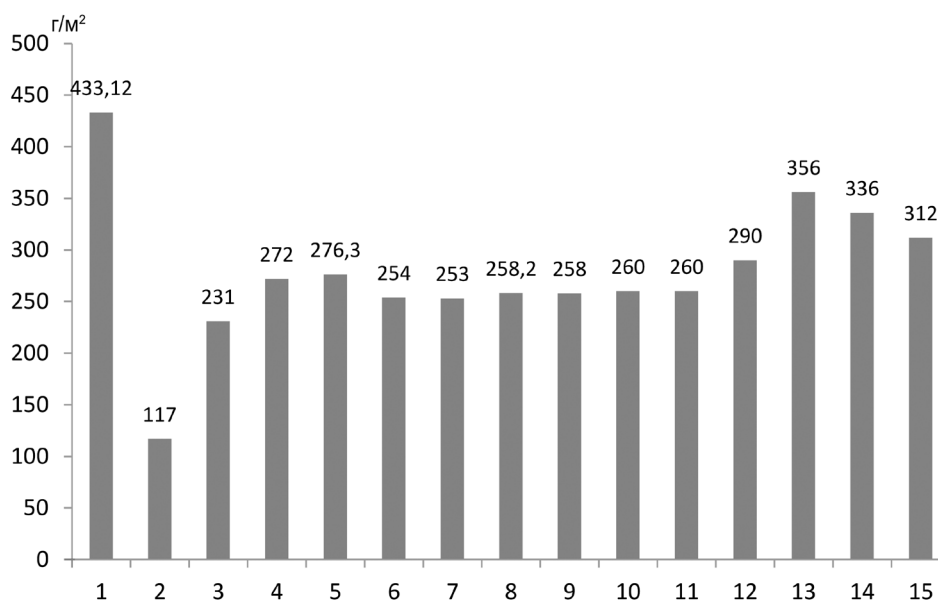


Рис. 4. Влияние обработки газонов различными препаратами и их баковыми смесями на надземную биомассу газонного травостоя: 1 – контроль; 2 – Фазор, 7,5 кг/га; 3 – Фазор, 3,75 кг/га; 4 – Фазор, 1,88 кг/га; 5 – Фазор, 1 кг/га; 6 – Магнум, 30 г/га; 7 – Магнум, 15 г/га; 8 – Магнум, 7,5 г/га; 9 – Фазор, 3,75 кг/га + Магнум, 15 г/га; 10 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 15 г/га; 11 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 12 – Фазор, 1,0 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 13 – Лонтрел, 0,66 л/га; 14 – Линтур, 0,18 кг/га; 15 – Балерина, 0,5 л/га

Fig. 4. The effect of lawn treatment with various preparations and their tank mixtures on the aboveground biomass of lawn grass stand: 1 – Control; 2 – Phasor, 7.5 kg/ha; 3 – Phasor, 3.75 kg/ha; 4 – Phasor, 1.88 kg/ha; 5 – Phasor, 1 kg/ha; 6 – Magnum, 30 g/ha; 7 – Magnum, 15 g/ha; 8 – Magnum, 7.5 g/ha; 9 – Phasor, 3.75 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 10 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 11 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 12 – Phasor, 1.0 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 13 – Lontrel, 0.66 l/ha; 14 – Lintur, 0.18 kg/ha; 15 – Ballerina, 0.5 l/ha

Важное значение при формировании высококачественных газонных травостоев имеет их декоративность, которая характеризует уровень благоустройства и создает первое впечатление. Среди основных показателей оценки декоративности газона и его качества – цвет газона, который зависит от содержания хлорофилла в растениях и плотности травостоя, характеризующейся количеством побегов на единицу площади. По обоим этим показателям выделяются варианты с препаратами Магнум и Фазор и их баковыми смесями. Содержание хлорофилла в тканях злаковых компонентов в этих вариантах варьировалось от 6,35 до 6,8 мг/г сухого веса, что на 18–27 % выше, чем в контроле (рис. 5). Обработка препаратами Балерина, Линтур и Лонтрел не оказывала существенного влияния на данный показатель.

Максимальная плотность газонного травостоя отмечалась также при обработке растений препаратом Магнум и его баковыми смесями с препаратом Фазор (рис. 6). Максимальное количество побегов на 1 м² (20 800 шт.) зафиксировано в варианте с применением препарата Магнум в чистом виде в дозе 7,5 г/га. Следует отметить, что благодаря удалению растений одуванчика лекарственного из газонного травостоя и усилению процессов кущения у злаковых компонентов за счет увеличения ресурсов роста на месте сильно засоренных, малодекоративных травостоев уже через 2,5–3 мес. формируются высококачественные газоны.

Как уже отмечалось, семена одуванчика не имеют периода покоя и могут прорасти сразу после созревания. Поэтому во второй половине вегетационного периода на необработанных газонах отмечается увеличение количества растений одуванчика лекарственного из семян текущего года. В то же время при применении препарата Магнум и баковых смесей препаратов Фазор и Магнум запасы семян одуванчика лекарственного в почве не увеличивались, поэтому данное явление не наблюдалось.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что из группы изученных препаратов (Балерина СЭ, Линтур ВДГ, Лонтрел-300 ВР, Магнум ВДГ, Фазор ВГ) и баковых смесей наиболее эффективными для формирования высококачественных газонов являются

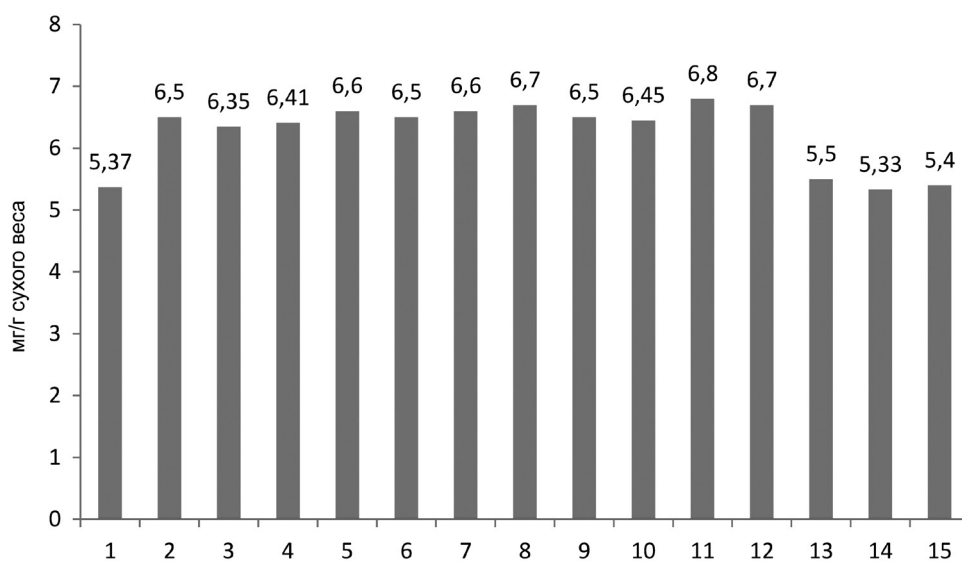


Рис. 5. Влияние обработки газонов различными препаратами и их баковыми смесями на содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* в биомассе газонных травостоев: 1 – контроль; 2 – Фазор, 7,5 кг/га; 3 – Фазор, 3,75 кг/га; 4 – Фазор, 1,88 кг/га; 5 – Фазор, 1 кг/га; 6 – Магнум, 30 г/га; 7 – Магнум, 15 г/га; 8 – Магнум, 7,5 г/га; 9 – Фазор, 3,75 кг/га + Магнум, 15 г/га; 10 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 15 г/га; 11 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 12 – Фазор, 1,0 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 13 – Лонтрел, 0,66 л/га; 14 – Линтур, 0,18 кг/га; 15 – Балерина, 0,5 л/га

Fig. 5. The effect of lawn treatment with various preparations and their tank mixtures on the total amount of chlorophylls *a* and *b* in the biomass of lawn grass stands: 1 – control; 2 – Phasor, 7.5 kg/ha; 3 – Phasor, 3.75 kg/ha; 4 – Phasor, 1.88 kg/ha; 5 – Phasor, 1 kg/ha; 6 – Magnum, 30 g/ha; 7 – Magnum, 15 g/ha; 8 – Magnum, 7.5 g/ha; 9 – Phasor, 3.75 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 10 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 11 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 12 – Phasor, 1.0 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 13 – Lontrel, 0.66 l/ha; 14 – Lintur, 0.18 kg/ha; 15 – Ballerina, 0.5 l/ha

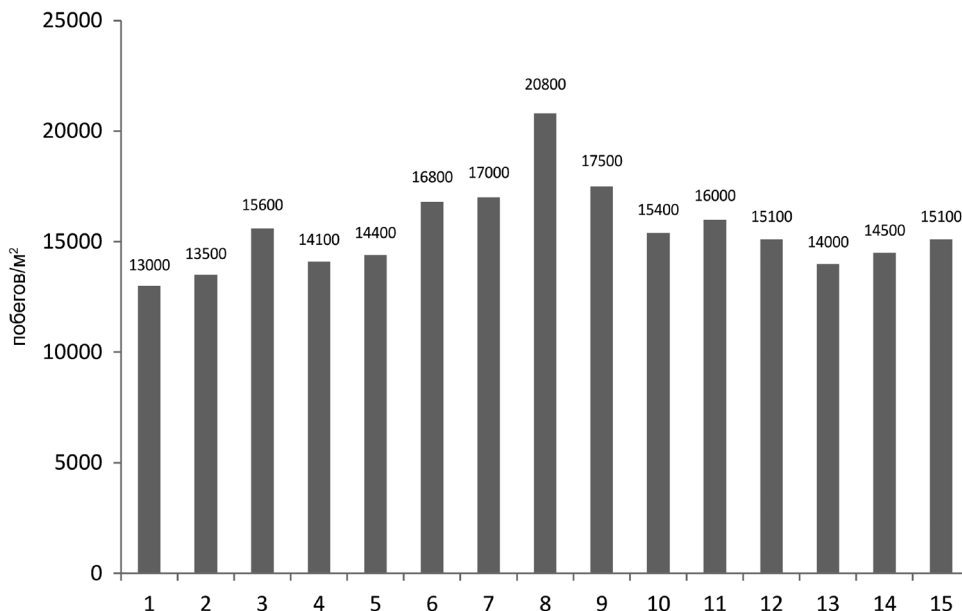


Рис. 6. Влияние обработки газонов различными препаратами и их баковыми смесями на плотность газонного травостоя: 1 – контроль; 2 – Фазор, 7,5 кг/га; 3 – Фазор, 3,75 кг/га; 4 – Фазор, 1,88 кг/га; 5 – Фазор, 1 кг/га; 6 – Магнум, 30 г/га; 7 – Магнум, 15 г/га; 8 – Магнум, 7,5 г/га; 9 – Фазор, 3,75 кг/га + Магнум, 15 г/га; 10 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 15 г/га; 11 – Фазор, 1,8 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 12 – Фазор, 1,0 кг/га + Магнум, 7,5 г/га; 13 – Лонтрел, 0,66 л/га; 14 – Линтур, 0,18 кг/га; 15 – Балерина, 0,5 л/га

Fig. 6. The effect of lawn treatment with various preparations and their tank mixtures on the density of lawn grass stand: 1 – control; 2 – Phasor, 7.5 kg/ha; 3 – Phasor, 3.75 kg/ha; 4 – Phasor, 1.88 kg/ha; 5 – Phasor, 1 kg/ha; 6 – Magnum, 30 g/ha; 7 – Magnum, 15 g/ha; 8 – Magnum, 7.5 g/ha; 9 – Phasor, 3.75 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 10 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 15 g/ha; 11 – Phasor, 1.8 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 12 – Phasor, 1.0 kg/ha + Magnum, 7.5 g/ha; 13 – Lontrel, 0.66 l/ha; 14 – Lintur, 0.18 kg/ha; 15 – Ballerina, 0.5 l/ha

препарат Магнум в чистом виде и его баковые смеси с препаратом Фазор ВГ. Для них характерны следующие преимущества:

- высокая биологическая эффективность по уничтожению одуванчика лекарственного;
- ингибирование роста злаков и снижение надземной биомассы газонного травостоя, что позволяет уменьшить число стрижек газона и затраты на вывоз скошенной травы;
- сокращение затрат на эксплуатацию специального оборудования (газонокосилок, триммеров);
- повышение декоративности газонных травостоев за счет усиления процессов кущения злаков и увеличения содержания хлорофилла в них;
- уменьшение затрат на внесение минеральных удобрений и количества поливов;
- снижение затрат на восстановление нарушенных газонов, в том числе на закупку дорогостоящих семян;
- возможность перераспределения рабочей силы в течение вегетационного сезона;
- снижение количества аллергенной пыльцы [14].

По результатам проведенных опытных, производственных и регистрационных испытаний, наиболее эффективным ингибирующим действием на рост и развитие одуванчика лекарственного обладают баковая смесь препаратов Фазор ВГ в дозе 1 кг/га и Магнум ВДГ в дозе 7,5 г/га и препарата Магнум ВДГ в чистом виде в дозе 7,5 г/га.

Обработка препаратом Магнум ВДГ и его баковой смесью с регулятором роста Фазор ВГ проводится в течение вегетационного периода (с 2–3-й декады мая до 2–3 декады сентября), через 3–4 дня после скашивания газонного травостоя.

На основе проведенных научных исследований, производственных и регистрационных испытаний в декабре 2019 г. препарат Магнум ВДГ в дозе 7,5 г/га разрешен к применению на городских газонах, что расширило сферу его применения [15].

Благодарности. Работа выполнена в рамках ОНТП «Интродукция, озеленение, экобезопасность» на 2016–2018 гг. (задание 2.1.5. «Разработать способы подавления развития растений одуванчика лекарственного *Taraxacum officinale* L. в травостоях городских газонов») и ГНТП «Промышленные биотехнологии» на 2016–2020 гг. (задание «Разработать и внедрить технологию получения комплексного микробного препарата INMI-Биостим с антифунгальной и гербицидной активностями для улучшения качества газонов»).

Acknowledgements. The work was carried out as part of the ONTP “Introduction, gardening, environmental safety” for 2016–2018 (task 2.1.5. “To develop methods for inhibiting the development of dandelion plants *Taraxacum officinale* L. in the grass of urban lawns”) and “Industrial Bionanotechnology” for 2016–2020, the task “Develop and implement the technology of obtaining a comprehensive microbial drug INMI-Biostic with antiphungal and herbicide activities to improve the quality of lawns”.

Список использованных источников

1. Лазарев, Н. Н. Газоноводство: учеб. пособие / Н. Н. Лазарев, А. И. Головня, В. А. Лесина. – М. : Изд-во РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, 2008. – 113 с.
2. Сигалов, Б. Я. Долголетние газоны. Биологические основы культуры: сб. науч. тр. / Б. Я. Сигалов. – М. : Наука, 1971. – 312 с.
3. Лаптев, А. А. Газоны / А. А. Лаптев. – Киев : Наук. думка, 1983. – 176 с.
4. Смирнова, С. К. Ускоренное создание газонных агрофитоценозов в условиях севера Нечерноземной зоны России : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.08 / С. К. Смирнова ; Сев.-Кавказ. зон. науч.-исслед. ин-т садоводства и виноградарства. – Краснодар, 2015. – 24 с.
5. Springer, T. L. Biomass yield from an urban landscape / T. L. Springer // Biomass Bioenergy. – 2012. – Vol. 37. – P. 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.029>
6. Прохоров, В. Н. Актуальные вопросы содержания газонных травостоев чистыми от многолетних сорняков // В. Н. Прохоров, Н. А. Ламан // Ботаника (исследования). – 2017. – Вып. 46. – С. 233–250.
7. Крылова, Н. П. Потенциальные ресурсы биологической мелиорации в зоне умеренного климата. Одуванчик лекарственный (зарубежный опыт) / Н. П. Крылова // С.-х. биология. – 2007. – Т. 42, № 2. – С. 95–101.
8. Северюхина, О. А. Репродуктивные особенности *Taraxacum officinale* L. в условиях химического загрязнения среды : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / О. А. Северюхина ; Ин-т экологии растений и животных Урал. отд-ния РАН. – Екатеринбург, 2004. – 23 с.
9. Ермакова, И. М. Одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.) / И. М. Ермакова // Диагнозы и ключи возрастных состояний луговых растений : в 3 ч. / редкол. : Т. И. Серебрякова [и др.]. – М., 1983. – Ч. 3. – С. 66–70.
10. Impact of the occurrence of *Taraxacum officinale* F. H. Wigg. on floristic diversity and utilisation values of meadow-pasture communities / A. Kryszak [et al.] // Appl. Ecol. Environm. Res. – 2016. – Vol. 14, N 2. – P. 55–64. https://doi.org/10.15666/aer/1402_055064

11. Ермакова, И. М. Одуванчик лекарственный [Систематика, биология, хозяйственное значение] / И. М. Ермакова // Биологическая флора Московской области / под ред. Т. А. Работнова. – 1990. – Вып. 8. – С. 210–229.
12. The initial growth and development of poa pratensis under the allelopathic of *Taraxacum officinale* / K. Jankowski [et al.] // J. Ecol. Eng. – 2014. – Vol. 15, N 2. – P. 93–99. <https://doi.org/10.12911/22998993.1094984>
13. March, S. R. Growth inhibitors in turfgrass / S. R. March, D. Martins, J. S. McElroy // Planta Daninha. – 2013. – Vol. 31, N 3. – P. 733–747. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582013000300025>
14. Рекомендации по применению на городских газонах препаратов, ингибирующих рост и развитие одуванчика лекарственного / Н. А. Ламан [и др.]; Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск : Право и экономика, 2018. – 30 с.
15. Дополнение к Государственному реестру средств защиты растений и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь : утверждено Советом по регистрации средств защиты растений и удобрений государственного учреждения «Главная государственная инспекция по семеноводству, карантину и защите растений» (постановления от 19.12.2017, 05.04.2018, 22.12.2018, 04.04.2019) / сост. : А. В. Пискун [и др.]. – Минск : Промкомплекс, 2019. – 79 с.

References

1. Lazarev N. N., Golovnya A. I., Lesina V. A. *Gas growing*. Moscow, Publishing House Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K. A. Timiryazev”, 2008. 113 p. (in Russian).
2. Sigalov B. Ya. *Long-term lawns. Biological foundations of culture*. Moscow, Nauka Publ., 1971. 312 p. (in Russian).
3. Laptev A. A. *Lawns*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1983. 176 p. (in Russian).
4. Smirnova S. K. *Accelerated creation of lawn agrophytocenoses in the north of the Non-chernozem zone*. Abstract of Ph. D. diss. Krasnodar, 2015. 24 p. (in Russian).
5. Springer T. L. Biomass yield from an urban landscape. *Biomass and Bioenergy*, 2012, vol. 37, pp. 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.029>
6. Prokhorov V. N., Laman N. A. Actual issues of keeping grass stands clean from perennial weeds. Actual issues of keeping grass stands clean from perennial weeds. *Botany (issledovaniya)* [Botany (research)], 2017, iss. 46, pp. 233–250 (in Russian).
7. Krylova N. P. Potential resources of biological reclamation in the temperate zone. Dandelion (foreign experience). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2007, vol. 42, no. 2, pp. 95–101 (in Russian).
8. Severyukhina O. A. *Reproductive features Taraxacum officinale L. in conditions of chemical pollution of the environment*. Abstract of Ph. D. diss. Yekaterinburg, 2004. 23 p. (in Russian).
9. Ermakova I. M. Medicinal dandelion (*Taraxacum officinale* Wigg.). *Diagnoses and keys of age-related conditions of meadow plants. Pt. 3*. Moscow, 1983, pp. 66–70 (in Russian).
10. Kryszak A., Klarzyńska A., Strychalska A., Maćkowiak Ł., Kryszak J. Impact of the occurrence of *Taraxacum officinale* F. H. Wigg. on floristic diversity and utilisation values of meadow-pasture communities. *Applied Ecology and Environmental Research*, 2016, vol. 14, no. 2, pp. 55–64. https://doi.org/10.15666/aeer/1402_055064
11. Eermakova I. M. Medicinal dandelion [Systematics, biology, economic value]. *Biologicheskaya flora Moskovskoi oblasti* [Biological flora of the Moscow region]. Moscow, 1990, iss. 8, pp. 210–229 (in Russian).
12. Jankowski K., Jankowska J., Ciepiela G. A., Sosnowski J., Wiśniewska-Kadżajan B., Matsyura A. The initial growth and development of poa pratensis under the allelopathic of *Taraxacum officinale*. *Journal of Ecological Engineering*, 2014, vol. 15, no. 2, pp. 93–99. <https://doi.org/10.12911/22998993.1094984>
13. March S. R., Martins D., McElroy J. S. Growth inhibitors in turfgrass. *Plantadanhina*, 2013, vol. 31, no. 3, pp. 733–747. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582013000300025>
14. Laman N. A., Prokhorov V. N., Babkov A. V., Sak M. M., Rosolenko S. I. *Recommendations on the use of drugs on city lawns that inhibit the growth and development of dandelion*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2018. 30 p. (in Russian).
15. Piskun A. V., Khvalei O. A., Yablonkskaya S. A., Kazakevich N. V., Globazh O. G., Nikolaeva T. G., Pesterev S. A. (comp.). *Addition to the State Register of Plant Protection Products and Fertilizers Approved for Use in the Republic of Belarus: approved by the Council for the Registration of Plant Protection Products and Fertilizers of the State Institution “Main State Inspectorate for Seed Production, Quarantine and Plant Protection” (resolution of 12.19.2017, 05.04. 2018, 12.22.2018, 04.04.2019)*. Minsk, Promkompleks Publ., 2019. 79 p. (in Russian).

Информация об авторе

Прохоров Валерий Николаевич – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nan.botany@yandex.by

Information about the author

Valery N. Prokhorov – Ph. D. (Biol.), Chief Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nan.botany@yandex.by

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 591.65 (476)
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-374-378>

Поступила в редакцию 27.03.2020
Received 27.03.2020

А. С. Рогинский, С. В. Буга

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА ВРЕДНОСТИ КАШТАНОВОЙ МИНИРУЮЩЕЙ МОЛИ – ИНВАЗИВНОГО ВРЕДИТЕЛЯ ЗЕЛЕННЫХ НАСАЖДЕНИЙ БЕЛАРУСИ

Аннотация. Основной вредитель декоративных посадок конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) – каштановая минирующая моль, или охридский минер (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimič, 1986), чужеродный для фауны Беларуси инвазивный вид минирующих фитофагов. Ежегодно наблюдаемые вспышки массового размножения *C. ohridella* ведут к утрате кронами естественного внешнего вида и ранней дефолиации, что катастрофически сказывается на декоративных и рекреационных качествах зеленых зон. На основании данных многолетних исследований (2013–2019 гг.) дана количественная оценка физиологической вредоносности, экологической обусловленной и общей вредности каштановой минирующей моли во всех 5 районах интродукции древесных растений в Беларуси. Значения показателей физиологической вредоносности и общей вредности были минимальны для Северного и максимальны для Южного района интродукции древесных растений, статистически достоверно различаясь для большинства дендролого-интродукционных районов.

Ключевые слова: биологические инвазии, конский каштан обыкновенный, моли-пестрянки, чужеродные виды, Черная книга

Для цитирования: Рогинский, А. С. Оценка вредности каштановой минирующей моли – инвазивного вредителя зеленых насаждений Беларуси / А. С. Рогинский, С. В. Буга // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 374–378. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-374-378>

Alexey S. Roginsky, Sergey V. Buga

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

ESTIMATION OF HARMFULNESS OF THE HORSE CHESTNUT LEAF-MINER IN GREEN AREAS IN BELARUS

Abstract. The horse chestnut leaf-miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimič, 1986) is alien to the fauna of Belarus, an invasive species of mining phytophages, the main pest of horse chestnut *Aesculus hippocastanum* L. in Belarus. The annually observed *C. ohridella* mass outbreaks lead to the fact that the crowns lose their natural appearance and defoliate earlier, that affects the decorative and recreational qualities of green areas catastrophically. Based on the data of long-term (2013–2019) studies, a quantitative assessment of the physiological damage ability, ecologically conditioned and the general harmfulness of horse chestnut leaf-miner in all 5 regions of woody plants introduction in Belarus is given. The values of the indicators of physiological damage ability and general harmfulness were statistically different for most regions of woody plants introduction. They were minimal for the North and maximum for the Southern regions of woody plants introduction in Belarus.

Keywords: biological invasions, horse chestnut, Gracillariidae, alien species, Black Book

For citation: Roginsky A. S., Buga S. V. Estimation of harmfulness of the horse chestnut leaf-miner in green areas in Belarus. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 374–378 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-374-378>

Введение. Благоустройство населенных пунктов является важной практической задачей, направленной на создание комфортной, благоприятной для жизни и здоровья человека среды. Зеленые насаждения играют важное значение в архитектурно-планировочных решениях [1], особенно актуальны в условиях населенных пунктов их рекреационные и эстетические функции.

Каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimič, 1986; Insecta: Lepidoptera) – чужеродный для фауны страны инвазивный вид, внесенный в «Черную книгу инвазивных животных Беларуси» [2]. Он включен и в Список 100 наиболее опасных инвазивных видов Европы [3]. За несколько десятилетий охридский минер осуществил экспансию по континентальной Европе,

достигнув границ Республики Беларусь предположительно в 2000–2001 гг. [4] и к 2014 г. завершив ее по всей территории нашей страны [5]. К настоящему времени изучена фенология этого опасного вредителя декоративных насаждений конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L; Sapindaceae) в условиях разных регионов Беларуси [6], что создает предпосылку для количественной оценки уровня вредоносности данного инвайдера.

Оценка социально-экономического ущерба, обусловленного инвазией чужеродного для фауны или флоры вида, является важной задачей инвазионной биологии [2, 6] и играет значимую роль при научном обосновании мер по минимизации негативных последствий биологических инвазий. В то же время количественная оценка вредоносности фитофагов декоративных зеленых насаждений весьма проблематична, поскольку ущерб не может быть оценен в показателях, поддающихся экономической оценке (недобор урожая, снижение сортности либо выбраковка, гибель саженцев, имеющих определенную рыночную стоимость, и т. д.). В свое время Е. Г. Куликовой [7] применительно к кокцидам была предложена методика количественной оценки вредоносности фитофагов в декоративных зеленых насаждениях. Модификация этой методики, адаптированная к специфике вредной деятельности в декоративных насаждениях минирующих фитофагов, была предложена и успешно апробирована Ф. В. Сауткиным, С. И. Евдошенко и С. В. Бугой [8].

Цель настоящей работы – сопоставительная количественная оценка физиологической вредоносности, экологически обусловленной и общей вредоносности каштановой минирующей моли в условиях разных регионов интродукции древесных растений в Беларуси, которые в свое время предложил выделять на территории страны академик Н. Д. Нестерович [9].

Материалы и методы исследования. В основу работы были положены результаты исследований, выполнявшихся в 2014–2019 гг. в условиях всех 5 районов интродукции древесных растений в Беларуси, в ходе которых регистрировались данные фенологии и поврежденности листовых пластинок конского каштана обыкновенного (*A. hippocastanum*) каштановой минирующей молью (*C. ohridella*) в разного типа зеленых насаждениях.

Количественная оценка уровня вредоносности минера, в соответствии с использованной методикой [8], предусматривала расчет значений показателей физиологической вредоносности (Ph_{Harm}), вредоносности в аспекте снижения декоративности, или экологически обусловленной вредоносности (Dec_{Harm}), и общей вредоносности (T_{Harm}).

Показатель физиологической вредоносности рассчитывали по формуле

$$Ph_{Harm} = F_T \cdot P_{Act},$$

где F_T – тип питания, P_{Act} – период активности фитофага (имеется в виду весь период наличия мин *C. ohridella* на листовых пластинках) [8].

Для расчета значений показателя вредоносности (в баллах) в аспекте снижения декоративности использовали формулу

$$Dec_{Harm} = Dmg_T \cdot Dmg_{Loc} \cdot Pl_{Val} \cdot Ph_{Distr},$$

где Dmg_T – характер и последствия наносимых фитофагом повреждений; Dmg_{Loc} – характер локализации повреждений на растении; Pl_{Val} – распространенность и ценность повреждаемых растений с учетом спектра повреждаемых пород; Ph_{Distr} – распространенность фитофага в насаждениях [8].

Общую вредоносность (T_{Harm}) рассчитывали [8] путем перемножения значений показателей физиологической вредоносности (Ph_{Harm}), вредоносности в аспекте снижения декоративности (Dec_{Harm}), наличия и регулярности всплеск массового размножения (Ph_{Out}), числа генераций (Gen_{Num}):

$$T_{Harm} = Ph_{Harm} \cdot Dec_{Harm} \cdot Ph_{Out} \cdot Gen_{Num}.$$

Таким образом, показатель общей вредоносности является интегральным в оценке вредоносности фитофагов в условиях декоративных зеленых насаждений. Для оценки статистической достоверности различий значений расчетных показателей использован критерий знаков [10].

Результаты и их обсуждение. В таблице представлены результаты расчета показателей физиологической вредоносности, экологически обусловленной и общей вредоносности каштановой

**Количественная оценка параметров вредоносности каштановой минирующей моли
в условиях 5 интродукционно-дендрологических районов Беларуси**

**The quantitative assessment of harmfulness parameters of the horse-chestnut leaf miner in the conditions
of 5 regions of woody plants introduction in Belarus**

Район интродукции и округ	Город	F _T	D _{Act}	P _{Act}	Dmg _T	Dmg _{Loc}	Pl _{Val}	Ph _{Distr}	Gen _{Num}	Ph _{Out}	Ph _{Harm}	Dec _{Harm}	T _{Harm}
Ia – Северный	Поставы	0,5	145	7,25	1,5	1	2	3	2	3	3,625	9,0	195,75
	Глубокое	0,5	145	7,25	1,5	1	2	3	2	3	3,625	9,0	195,75
	Браслав	0,5	145	7,25	1,5	1	2	3	2	3	3,625	9,0	195,75
	Докшицы	0,5	145	7,25	1,5	1	2	3	2	3	3,625	9,0	195,75
Iб – Северный	Полоцк	0,5	140	7	1,5	1	3	3	2	3	3,500	13,5	283,50
	Витебск	0,5	140	7	1,5		3	3	2	3	3,500	13,5	283,50
	Лепель	0,5	140	7	1,5	1	2	3	2	3	3,500	9,0	189,00
	Чашники	0,5	140	7	1,5	1	2	3	2	3	3,500	9,0	189,00
IIa – Западный	Лида	0,5	165	8,25	1,5	1	2	3	2,5	3	4,125	9,0	278,44
	Гродно	0,5	165	8,25	1,5	1	3	3	2,5	3	4,125	13,5	417,66
	Волковыск	0,5	165	8,25	1,5	1	2	3	2,5	3	4,125	9,0	278,44
	Барановичи	0,5	165	8,25	1,5	1	2	3	2,5	3	4,125	9,0	278,44
IIб – Западный	Молодечно	0,5	155	7,75	1,5	1	2	3	2,5	3	3,875	9,0	261,56
	Ошмяны	0,5	155	7,75	1,5	1	2	3	2,5	3	3,875	9,0	261,56
	Воложин	0,5	155	7,75	1,5	1	2	3	2,5	3	3,875	9,0	261,56
	Сморгонь	0,5	155	7,75	1,5	1	2	3	2,5	3	3,875	9,0	261,56
IIIa – Северно-Центральный	Минск	0,5	150	7,5	1,5	1	3	3	2,5	3	3,750	13,5	379,68
	Борисов	0,5	150	7,5	1,5	1	2	3	2,5	3	3,750	9,0	253,13
	Логойск	0,5	150	7,5	1,5	1	2	3	2,5	3	3,750	9,0	253,13
	Жодино	0,5	150	7,5	1,5	1	2	3	2,5	3	3,750	9,0	253,13
IIIб – Северно-Центральный	Могилев	0,5	145	7,25	1,5	1	3	3	2,5	3	3,625	13,5	367,03
	Кричев	0,5	145	7,25	1,5	1	2	3	2,5	3	3,625	9,0	244,68
	Быхов	0,5	145	7,25	1,5	1	2	3	2,5	3	3,625	9,0	244,68
	Славгород	0,5	145	7,25	1,5	1	2	3	2,5	3	3,625	9,0	244,68
IVa – Южно-Центральный	Слуцк	0,5	160	8	1,5	1	3	3	2,5	3	4,000	13,5	405,00
	Кировск	0,5	160	8	1,5	1	2	3	2,5	3	4,000	9,0	270,00
	Осиповичи	0,5	160	8	1,5	1	2	3	2,5	3	4,000	9,0	270,00
	Старые Дороги	0,5	160	8	1,5	1	2	3	2,5	3	4,000	9,0	270,00
IVб – Южно-Центральный	Бобруйск	0,5	160	8	1,5	1	3	3	2,5	3	4,000	13,5	405,00
	Жлобин	0,5	155	7,75	1,5	1	3	3	2,5	3	3,875	13,5	392,34
	Чечерск	0,5	155	7,75	1,5	1	2	3	2,5	3	3,875	9,0	261,56
	Буда-Кошелево	0,5	155	7,75	1,5	1	2	3	2,5	3	3,875	9,0	261,56
Va – Южный	Брест	0,5	170	8,5	1,5	1	3	3	3	3	4,250	13,5	516,37
	Пинск	0,5	170	8,5	1,5	1	3	3	3	3	4,250	13,5	516,37
	Жабинка	0,5	170	8,5	1,5	1	3	3	3	3	4,250	13,5	516,37
	Кобрин	0,5	170	8,5	1,5	1	3	3	3	3	4,250	13,5	516,37
Vб – Южный	Гомель	0,5	165	8,25	1,5	1	3	3	3	3	4,125	13,5	501,18
	Мозырь	0,5	165	8,25	1,5	1	3	3	3	3	4,125	13,5	501,18
	Житковичи	0,5	165	8,25	1,5	1	3	3	3	3	4,125	13,5	501,18
	Лельчицы	0,5	165	8,25	1,5	1	3	3	3	3	4,125	13,5	501,18

Примечание. F_T – тип питания, баллы; D_{Act} – период активности фитофага, сут; P_{Act} – период активности фитофага, баллы; Dmg_T – характер и последствия наносимых фитофагом повреждений, баллы; Dmg_{Loc} – характер локализации повреждений на растении, баллы; Pl_{Val} – распространенность и ценность повреждаемых растений с учетом спектра повреждаемых пород, баллы; Ph_{Distr} – распространенность фитофага в насаждениях, баллы; Gen_{Num} – число генераций; Ph_{Out} – наличие и регулярность вспышек массового размножения, баллы; Ph_{Harm} – физиологическая вредоносность; Dec_{Harm} – вредоносность в аспекте снижения декоративности; T_{Harm} – общая вредоносность.

минирующей моли в условиях зеленых насаждений разных районов интродукции древесных растений в Беларуси, причем для обеспечения возможности статистической обработки данных в каждом районе были дифференцированы не только подрайоны, но и округа. Физиологическая вредоспособность *C. ohridella* оказалась максимальной в условиях Западного подрайона Южного интродукционно-дендрологического района (8,5 балла), минимальной – в условиях Восточного подрайона Северного района (7,0 балла). Данные различия определяются разной продолжительностью периода нанесения вреда. Значения показателя экологически обусловленной вредоносности варьируются в диапазоне от 3,50 балла для Восточного подрайона Северного района до 4,25 балла Западного подрайона Южного района. Такие различия объясняются прежде всего разной представленностью конского каштана обыкновенного в существующих зеленых насаждениях: для Северного интродукционно-дендрологического района характерно минимальное его представительство, тогда как для Южного района эта порода вполне обычна и определяет облик отдельных участков зеленых насаждений.

Значения интегрального показателя общей вредоносности варьируются в пределах от 189,00 балла для части территории Восточного подрайона Северного интродукционно-дендрологического района до 516,38 для Западного подрайона Южного района. Различия более чем в 2 раза обусловлены как низкой представленностью конского каштана обыкновенного в зеленых насаждениях на севере Беларуси, так и менее продолжительным периодом нанесения вреда инвайдером, в том числе и меньшим числом генераций *C. ohridella*, развивающихся (пусть и без успешного завершения, но обуславливающих повреждение листовых пластинок) за сезон.

По результатам сравнительного анализа данных физиологической вредоспособности выявлены статистически достоверные различия между: Северным/Западным, Северным/Северо-Центральным, Северным/Южно-Центральным, Северным/Южным, Западным/Северо-Центральным, Западным/Южно-Центральным, Западным/Южным, Северо-Центральным/Южно-Центральным, Северо-Центральным/Южным, Южно-Центральным/Южным интродукционно-дендрологическими районами. Различия обусловлены спецификой климатических условий районов интродукции древесных растений, предопределяющих сроки (продолжительность) развития данного фитофага.

По результатам сравнительного анализа общей вредоносности статистически достоверными являются различия для 7 пар сравнения: Северный/Южно-Центральный, Северный/Южный, Северный/Северо-Центральный, Западный/Южный, Северо-Центральный/Южно-Центральный, Северо-Центральный/Южный, Южно-Центральный/Южный районы интродукции растений в Беларуси. Различия между уровнями общей вредоносности в Северном и Западном не были статистически значимы.

Выводы

1. Дана оценка физиологической вредоспособности каштановой минирующей моли (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimič, 1986), повреждающей конский каштан обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.), в декоративных зеленых насаждениях разных районов интродукции древесных растений в Беларуси. Значения данного расчетного показателя оказались минимальными (7,0 балла) для Северного интродукционно-дендрологического района, максимальными (8,5 балла) – для Южного.

2. Выполнены расчеты показателя экологически обусловленной вредоносности, или вредоспособности в аспекте снижения декоративности. Для территорий, где конский каштан минимально представлен в существующих декоративных посадках, значения оказались равны 9,0 балла, а для территорий, где он обычен либо является массовой древесной породой, – 13,5 балла.

3. Результаты расчетов показали различия (в 2 раза) между интегральными показателями общей вредоносности *C. ohridella* в условиях декоративных зеленых насаждений Северного и Южного районов интродукции древесных растений в Беларуси: для части территории Восточного подрайона Северного интродукционно-дендрологического района значения показателя составили 189,00 балла, тогда как Западного подрайона Южного района – 516,37 балла.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Санаев, И. В. Роль зеленых насаждений в создании оптимальной городской среды / И. В. Санаев // Лесн. вестн. – 2006. – № 6. – С. 71–76.
2. Черная книга инвазивных видов животных Беларуси / А. В. Алехнович [и др.] ; под общ. ред. В. П. Семенченко. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 105 с.
3. Handbook of alien species in Europe / ed. J. A. Drake. – Dordrecht : Springer, 2009. – 399 p.
4. Каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella* Deshka & Dimič, 1986) в Беларуси : экспансия завершена / А. С. Рогинский [и др.] // Зоологические чтения–2015 : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Бенедикта Дыбовского, Гродно, 22–24 апр. 2015 г. / под ред. О. В. Янчуревич [и др.]. – Гродно, 2015. – С. 215–217.
5. Рогинский, А. С. Phenology of the horse-chestnut leaf-miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic, 1986) under the conditions of the Republic of Belarus / А. С. Рогинский // Иностранные языки и современный мир : материалы Междунар. науч. конф., г. Брест, 15 апр. 2016 г. : в 2 ч. / редкол. : Л. М. Максимук [и др.]. – Брест, 2016. – Ч. 1. – С. 229–230.
6. Семенченко, В. П. Чужеродные виды животных в естественных экосистемах Беларуси / В. П. Семенченко // Наука и инновации. – 2018. – № 7. – С. 20–25.
7. Куликова, Е. Г. Оценка вредоносности кокцид / Е. Г. Куликова // Защита растений. – 1987. – № 10. – С. 27–28.
8. Сауткин, Ф. В. Опыт оценки уровня вредоносности минеров-филлобионтов – вредителей декоративных кустарников в зеленых насаждениях Беларуси / Ф. В. Сауткин, С. И. Евдосенко, С. В. Буга // Защита растений : сб. науч. тр. / гл. ред. Л. И. Трешко. – 2012. – Вып. 36. – С. 198–210.
9. Нестерович, Н. Д. Интродукционные районы и древесные растения для зеленого строительства в Белорусской ССР / Н. Д. Нестерович. – Минск : Наука и техника, 1982. – 111 с.
10. Зайцев, Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г. Н. Зайцев. – М. : Наука, 1984. – 424 с.

References

1. Sanaev I. V. The role of green spaces in the creation of optimal urban environment. *Lesnoi vestnik* [Forest bulletin], 2006, no. 6, pp. 71–76 (in Russian).
2. Alekhovich A. V., Buga S. V., Drobenkov S. M., Zhorov D. G., Makarenko A. I., Petrov D. L. [et al.]. *The Black Book of invasive animals of Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2016. 105 p. (in Russian).
3. *Handbook of alien species in Europe*. Dordrecht, Springer, 2009. 399 p.
4. Roginskii A. S., Sinchuk O. V., Sautkin F. V., Buga S. V. Horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deshka & Dimič, 1986) in Belarus: expansion completed. *Zoologicheskie chteniya-2015: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi pamyati professora Benedikta Dybovskogo (Grodno, 22–24 aprelya 2015 goda)* [Zoological Readings 2015 : materials of the International scientific and practical conference dedicated to the memory of Professor Benedict Dybovsky (Grodno, April 22–24, 2015)]. Grodno, 2015, pp. 215–217 (in Russian).
5. Roginskii A. S. Phenology of the horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic, 1986) under the conditions of the Republic of Belarus. *Inostrannyye yazyki i sovremennyyi mir: sbornik materialov mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii studentov, magistrantov, aspirantov (Brest, 15 aprelya 2016 goda). Chast' 1* [Foreign languages and the modern world: a collection of materials of the international scientific conference of students, undergraduates, graduate students (Brest, April 15, 2016). Part 1]. Brest, 2016, pp. 229–230 (in Russian).
6. Semenchenko V. P. The alien animal species in the natural ecosystems of Belarus. *Nauka i innovatsii* [Science and innovations], 2018, no. 7, pp. 20–25 (in Russian).
7. Kulikova E. G. The harmfulness assessment of scale insects. *Zashchita rastenii* [Plant protection], 1987, no. 10, pp. 27–28 (in Russian).
8. Sautkin F. V., Evdoshenko S. I., Buga S. V. The experience of harmfulness assessment of leafminers – pests of decorative shrubs in green spaces of Belarus. *Zashchita rastenii: sbornik nauchnykh trudov* [Plant protection: a collection of scientific papers], 2012, iss. 36, pp. 198–210 (in Russian).
9. Nesterovich N. D. Introduction districts and woody plants for green areas in the Byelorussian SSR. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1982. 111 p. (in Russian).
10. Zaitsev G. N. *Mathematical statistics in experimental botany*. Moscow, Nauka Publ., 1984. 424 p. (in Russian).

Информация об авторах

Рогинский Алексей Сергеевич – аспирант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bio.roginski@mail.ru

Буга Сергей Владимирович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sergey.buga@gmail.com

Information about the authors

Alexey S. Roginsky – Postgraduate student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bio.roginski@mail.ru

Sergey V. Buga – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sergey.buga@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.83:635.567
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-379-384>

Поступила в редакцию 10.02.2020
Received 10.02.2020

О. В. Дорошук¹, Ж. Н. Калацкая¹, Н. А. Ламан¹, Н. И. Горошко¹,
М. А. Братанова¹, М. Н. Мандрык-Литвинкович², Н. И. Гирилович²

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

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ВНОСИМЫХ В ТОРФЯНОЙ СУБСТРАТ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* НА ПИЩЕВУЮ ЦЕННОСТЬ РУККОЛЫ КУЛЬТУРНОЙ (*ERUCA SATIVA* (L.) MILL.)

Аннотация. Известно, что многие штаммы бактерий рода *Bacillus* способны стимулировать рост растений и повышать их продуктивность. Однако сведений о влиянии бактерий на качество продукции зеленных культур крайне мало.

Изучено влияние двух штаммов бактерий рода *Bacillus* – *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM – на качество продукции рукколы культурной, выращиваемой в лабораторных условиях. Установлено, что внесение в торфяной субстрат штаммов *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM в концентрации 10⁶ клеток/мл и в объемах 10 и 5 мл/л субстрата соответственно повышало содержание водорастворимых углеводов и витамина С, снижало содержание нитрат-ионов в листьях рукколы. При этом содержание витаминов Р и В₂ и продуктивность рукколы оставались на уровне контрольных значений.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, содержание сухого вещества, водорастворимые углеводы, витамин С, витамин Р, витамин В₂, нитраты

Для цитирования: Влияние вносимых в торфяной субстрат бактерий рода *Bacillus* на пищевую ценность рукколы культурной (*Eruca sativa* (L.) Mill.) / О. В. Дорошук [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 379–384. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-379-384>

Olga V. Doroshchuk¹, Joanna N. Kalatskaja¹, Nikolai A. Laman¹, Natalia I. Goroshko¹,
Maryna A. Bratanova¹, Maryna N. Mandryk-Litvinkovich², Natalia I. Girilovich²

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

²Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF BACTERIA GENUS *BACILLUS* INTRODUCED IN PEAT SUBSTRATE ON *ERUCA SATIVA* (L.) MILL. QUALITY

Abstract. It is known that many strains of bacteria genus *Bacillus* are able to stimulate plant growth and increase plant productivity. However information about their influence on green cultures quality is not enough.

The purpose of work was studying of two strains bacteria *B. subtilis* M9/6 and *B. amyloliquefaciens* 23TM influence on *Eruca sativa* plant quality in the laboratory. It was obtained that eruca quality was higher when we used strains *B. subtilis* M9/6 and *B. amyloliquefaciens* 23TM at a concentration of 10⁶ cells/ml and 10 and 5 ml/l of peat substrate, respectively. They increased content of water-soluble carbohydrates, vitamin C and reduced content of nitrates in leaves. Content of vitamin P and vitamin В₂ and plant productivity were at the level of control values.

Keywords: bacteria *Bacillus* genus, dry matter, water soluble carbohydrates, vitamin C, vitamin P, vitamin В₂, nitrates

For citation: Doroshchuk O. V., Kalatskaja J. N., Laman N. A., Goroshko N. I., Bratanova M. A., Mandryk-Litvinkovich M. N., Girilovich N. I. Influence of bacteria genus *Bacillus* introduced in peat substrate on *Eruca sativa* (L.) Mill. quality. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 379–384 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-379-384>

Введение. В настоящее время во всем мире растет спрос на новые эффективные и экологически безопасные средства для повышения продуктивности и устойчивости растений. Перспективным направлением является разработка и внедрение в практику биологических препаратов на основе природных штаммов микроорганизмов, проявляющих рострегулирующую, фунгистатическую, иммунизирующую и антистрессорную активность в отношении биотических и абиотических

стрессоров. Наиболее привлекательными объектами для промышленного использования являются бактерии рода *Bacillus* [1–6]. В тепличных хозяйствах внесение микробиологических препаратов является эффективным способом восстановления микробоценозов, оздоровления почвы, повышения качества продукции овощеводства. Повышенные требования, предъявляемые как к качеству, так и к хранению сельскохозяйственной продукции, обуславливают возрастающий интерес к углубленному исследованию свойств бактерий – продуцентов биологически активных веществ [7, 8].

Особую ценность в питании человека представляют овощи, употребляемые в свежем виде, что способствует максимальному поступлению в организм содержащихся в них минеральных элементов и витаминов. Большинство таких овощей (салат листовой, руккола, салат кочанный, петрушка, лук, шпинат, укроп, щавель, сельдерей и др.) относится к так называемой группе зеленных культур. Расширение ассортимента этих обладающих высокой питательной ценностью и скороспелостью культур возможно как за счет более широкого внедрения в производство новых сортов, так и за счет оптимизации условий их выращивания в открытом и защищенном грунте [9, 10]. Однако при выращивании в условиях защищенного грунта они часто поражаются фитопатогенными микроорганизмами уже на начальных этапах онтогенеза, что приводит к появлению недружных всходов, ухудшению роста и развития растений и потере их товарного вида [11].

В настоящее время в Беларуси для борьбы с болезнями растений грибной и бактериальной этиологии разработан ряд биологических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*. Например, биопестицид «Бактосол» эффективно защищает картофель от грибных и бактериальных болезней при вегетации и хранении. Препарат «Бетапротектин» предназначен для защиты сахарной, столовой свеклы, огурца, томата, луковичных и клубне-луковичных цветочных культур, хвойных пород от болезней. Биопестицид «Фрутин» применяется для защиты плодовых деревьев, клубнелуковичных и луковичных цветочных культур, лиственных и хвойных пород древесных культур от болезней, для стимуляции роста и развития микроклонов осины и березы. Однако сведения о влиянии бактериальных препаратов на качество продукции зеленных культур немногочисленны [12, 13].

Руккола – зеленная культура, содержащая значительное количество витаминов (Е, К, А, В₁, В₂, В₅, В₆, В₉, РР, С), макро- и микроэлементов [14]. Следует отметить, что химический состав продукции зависит от сорта, а также от состава субстрата, продолжительности и интенсивности освещения, температурного режима и других факторов.

Цель работы – изучение влияния вносимых в субстрат штаммов бактерий рода *Bacillus* на продуктивность и качество продукции рукколы культурной.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служила руккола культурная сорта Соренто. В работе использовали выделенные из почвы штаммы спорообразующих бактерий *B. subtilis* М9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23ТМ, проявляющие высокую антагонистическую активность к широкому спектру фитопатогенов. Условия культивирования бактерий детально изложены в работе [15].

Посев семян рукколы производили в емкости объемом 250 мл, заполненные торфяным субстратом торговой марки «Двина» (N – 100–180 мг/100 г сухого вещества, Р₂О₅ – 110–190 мг/100 г, К₂О – 200–340 мг/100 г), в который дополнительно вносили минеральные удобрения (N – 60 мг/100 г, Р₂О₅ – 75 мг/100 г, К₂О – 75 мг/100 г). Культуральную жидкость штаммов бактерий *B. subtilis* М9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23ТМ вносили при подготовке субстрата к посеву в количестве 10 и 5 мл/л субстрата соответственно в концентрации 10⁶ клеток/мл. Повторность опыта трехкратная, в каждой повторности – 15 горшков по 2 растения. Растения выращивали под световыми установками с освещенностью 13–15 тыс. лк, продолжительность освещения составляла 14 ч (до наступления технической спелости).

Критериями качества продукции служили: содержание сухого вещества, водорастворимых углеводов (моно- и дисахаридов), нитратов, витаминов С (аскорбиновой кислоты), Р (рутина) и В₂ (рибофлавина). Содержание водорастворимых углеводов определяли по методике, приведенной в работе [16], витаминов С и Р – по методикам, изложенным в [17], витамина В₂ – по методу, приведенному в работе [18]. Содержание нитратов определяли на нитратометре в соответствии с методикой, описанной в работе [19]. Статистическую обработку данных осуществляли

с помощью общепринятых методов, используя для расчетов программу Microsoft Excel. В работе приведены средние значения и их отклонения, указывающие на величину стандартной ошибки средней арифметической.

Результаты и их обсуждение. Анализ полученных данных показал, что внесение в торфяной субстрат штаммов *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM не оказало влияния на накопление биомассы растениями рукколы в ходе вегетации. Содержание сухого вещества в листьях рукколы под действием бактерий также не изменилось (табл. 1).

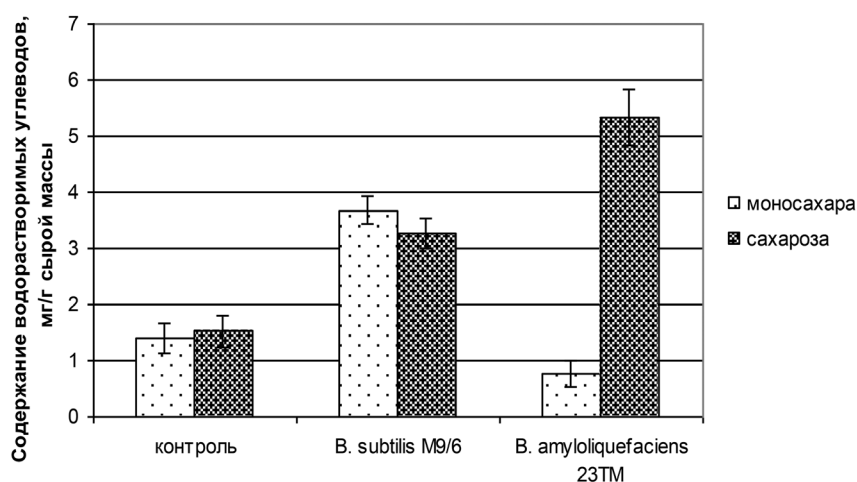
Таблица 1. Влияние штаммов *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM на массу розетки листьев и содержание в листьях сухого вещества

Table 1. Influence of strains *B. subtilis* M9/6 and *B. amyloliquefaciens* 23TM on mass of leaves and dry matter content

Вариант	Масса розетки листьев, г	Содержание сухого вещества, мг/г сырой массы
Контроль	3,40 ± 0,18	77,8 ± 2,3
<i>B. subtilis</i> M9/6	3,05 ± 0,26	77,6 ± 0,6
<i>B. amyloliquefaciens</i> 23TM	3,35 ± 0,20	75,5 ± 1,7

Продуктивность рукколы сохранялась на уровне необработанных растений, однако отмечались значительные изменения качества выращенной продукции. Известно, что водорастворимые моносахара в листьях представлены фруктозой и глюкозой, а дисахариды – сахарозой. Увеличение концентрации сахаров свидетельствует о повышении пищевой ценности продукции. Установлено, что суммарное содержание водорастворимых углеводов в листьях при внесении в субстрат штамма *B. subtilis* M9/6 превышало контрольное значение на 137,2 %, при добавлении в субстрат штамма *B. amyloliquefaciens* 23TM – на 108,5 % (см. рисунок). Следует отметить, что инокуляция субстрата штаммом *B. subtilis* M9/6 способствовала накоплению водорастворимых сахаров в листьях за счет увеличения концентрации как моносахаров, так и сахарозы. Штамм *B. amyloliquefaciens* 23TM стимулировал накопление в листьях рукколы транспортной формы углеводов – сахарозы.

Наряду с накоплением водорастворимых углеводов происходило значительное увеличение содержания аскорбиновой кислоты в листьях растений, выращенных на бактериализованных субстратах (табл. 2). Так, содержание витамина С в листьях при внесении штамма *B. subtilis* M9/6 было на 22,1 % больше, а при внесении штамма *B. amyloliquefaciens* 23TM – на 22,5 % больше, чем в листьях контрольных растений. Содержание рутина и рибофлавина оставалось на уровне контрольных значений (табл. 2).



Влияние штаммов *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM на содержание водорастворимых углеводов в листьях рукколы

Influence of strains *B. subtilis* M9/6 and *B. amyloliquefaciens* 23TM on content of water-soluble carbohydrates in *Eruca* leaves

Таблица 2. Влияние штаммов *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM на содержание витаминов С, Р и В₂ в листьях рукколыTable 2. Influence of strains *B. subtilis* M9/6 and *B. amyloliquefaciens* 23TM on content of vitamins C, P and B₂ in *Eruca* leaves

Вариант	Содержание витамина, мг/100 г сырой массы		
	С	Р	В ₂
Контроль	85,5 ± 2,0	0,16 ± 0,010	0,079 ± 0,003
<i>B. subtilis</i> M9/6	104,4 ± 2,0	0,15 ± 0,009	0,078 ± 0,001
<i>B. amyloliquefaciens</i> 23TM	104,7 ± 1,4	0,16 ± 0,008	0,075 ± 0,002

Еще одним важным критерием качества продукции является содержание в ней нитрат-ионов. Предельно допустимая концентрация (ПДК) нитратов в овощах и фруктах – мера насыщенности данными веществами, при превышении которой отмечаются отрицательные последствия для организма человека. Для зеленных культур, выращенных в закрытом грунте, ПДК составляет 3000 мг/кг сырой массы [20]. Установлено, что внесение в субстрат перед посевом рукколы бактерий рода *Bacillus* приводило к снижению содержания нитратов в листьях. Так, при внесении в субстрат штамма *B. subtilis* M9/6 содержание нитрат-ионов в готовой продукции снижалось на 14,9 %, а при внесении штамма *B. amyloliquefaciens* 23TM – на 16,4 % (табл. 3).

Таблица 3. Влияние штаммов *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM на содержание нитратов в листьях рукколыTable 3. Influence of strains *B. subtilis* M9/6 and *B. amyloliquefaciens* 23TM on content of nitrates in *Eruca* leaves

Вариант	Содержание нитратов, мг/кг сырой массы
Контроль	1795 ± 175
<i>B. subtilis</i> M9/6	1528 ± 11
<i>B. amyloliquefaciens</i> 23TM	1500 ± 80

Заключение. Проведенные исследования показали, что внесение в торфяной субстрат для выращивания рукколы штаммов *B. subtilis* M9/6 и *B. amyloliquefaciens* 23TM не оказывает влияния на продуктивность данной зеленой культуры, однако значительно повышает пищевую ценность рукколы за счет увеличения содержания в ее листьях водорастворимых углеводов (моносахаров и сахарозы) и витамина С. Наряду с этим содержание нитрат-ионов в листьях рукколы уменьшалось на 14,9 и 16,4 % соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования бактерий рода *Bacillus* для инокуляции торфяных субстратов с целью получения зеленой продукции высокого качества.

Список использованных источников

1. Монастырский, О. А. Современные проблемы и решения создания биопрепаратов для защиты культур от возбудителей болезней / О. А. Монастырский, Т. В. Першакова // Вестн. экол. образования в России. – 2009. – № 2. – С. 6–8.
2. Жиглецова, С. К. Возможности применения микроорганизмов для решения задач экологической и продовольственной безопасности / С. К. Жиглецова, И. А. Дунайцев, С. Г. Бесаева // Агрехимия. – 2010. – № 6. – С. 83–96.
3. Chourdary, D. K. Interaction of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR) / D. Chourdary, B. N. Johri // Microbiol. Res. – 2009. – Vol. 164, N 5. – P. 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
4. Impact of plant growth promoting *Bacillus subtilis* on growth and physiological parameters of *Bassia indica* (*Indian Bassia*) growth under salt stress / H. Abeer [et al.] // Pak. J. Bot. – 2015. – Vol. 47, N 5. – P. 1735–1741.
5. Pérez-García, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture / A. Pérez-García, D. Romero, A. de Vicente // Curr. Opin. Biotechnol. – 2011. – Vol. 22, N 2. – P. 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
6. Sayed, S. A. Response of three sweet basil cultivars to inoculation with *Bacillus subtilis* and arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress conditions / S. A. Sayed, A. S. Atef, E. K. Soha // Nat. Sci. – 2011. – Vol. 9, N 6. – P. 93–111.
7. Коломиец, Э. Экологически безопасные биотехнологии для сельского хозяйства / Э. Коломиец, Н. Сверчкова, М. Мандрик-Литвинкович // Наука и инновации. – 2019. – № 3 (193). – С. 4–9.

8. Крыжко, А. В. Стимулирующий эффект энтомопатогенных штаммов *Bacillus thuringiensis* на морфометрические показатели растений салата / А. В. Крыжко, Л. Н. Кузнецова // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2017. – № 4. – С. 51–53.
9. Государственная программа развития аграрного бизнеса в Республике Беларусь на 2016–2020 годы [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://www.mshp.gov.by/programms/a868489390de4373.html>. – Дата доступа : 15.07.2018.
10. Бобкова, О. Н. Оценка исходного материала для селекции салата кочанного по комплексу хозяйственно ценных признаков в зависимости от сроков сева / О. Н. Бобкова // Земледелие и защита растений. – 2018. – № 6 (121). – С. 33–37.
11. Формирование управляемого биоценоза микроорганизмов торфа и субстратов на его основе как новый подход в биометоды выращивания растений защищенного грунта / И. Г. Филиппов [и др.] // Гавриш. – 2007. – № 5. – С. 12–15.
12. Сопрунова, В. Е. Качество и потребительские свойства картофеля, выращенного с применением биопрепарата на основе бактерий рода *Bacillus* / В. Е. Сопрунова, Н. В. Долганова, Ш. Б. Байрамбеков // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2017. – № 7. – С. 45–49.
13. Radhakrishnan, R. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce / R. Radhakrishnan, I. Lee // Plant Physiol. Biochem. – 2016. – Vol. 109. – P. 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>
14. Дудченко, Л. Г. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения: справочник / Л. Г. Дудченко, А. С. Козьяков, В. В. Кривенко. – Киев : Наук. думка, 1989. – 304 с.
15. Влияние композиций на основе бактерий-антагонистов рода *Bacillus* и фитогормонов на устойчивость проростков ячменя при солевом стрессе / Ж. Н. Калацкая [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / редкол. : Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – Т. 9. – С. 183–190.
16. Кабашникова, Л. Ф. Количественный анализ свободных и связанных углеводов в одной навеске растительной ткани: учеб.-метод. пособие / Л. Ф. Кабашникова, Л. Н. Калитухо, А. В. Деревинский. – Минск : БГПУ, 2003. – 22 с.
17. Воскресенская, О. Л. Большой практикум по биоэкологии: учеб. пособие: в 2 ч. / О. Л. Воскресенская, Е. А. Алябышева, М. Г. Половникова. – Йошкар-Ола : Марийс. гос. ун-т, 2006. – Ч. 1. – 107 с.
18. Методы анализа витаминов: практикум / сост. : Г. Н. Чупахина, П. В. Масленников. – Калининград : Изд-во Калинингр. гос. ун-та, 2004. – 36 с.
19. МУ 5048-89 Методические указания по определению нитратов и нитритов в продукции растениеводства. – М., 1989 г. – 24 с.
20. Санитарно-гигиенические нормы «Допустимые уровни содержания нитратов в продуктах растительного происхождения и методы их определения». СанПиН 42-123-4619-88.

References

1. Monastyrskii O. A., Pershakova T. V. Modern problems and solutions for the creation of biological products to protect crops from pathogens. *Vestnik ekologicheskogo obrazovaniya v Rossii* [Bulletin of environmental education in Russia], 2009, no. 2, pp. 6–8 (in Russian).
2. Zhigletsova S. K., Dunaitsev I. A., Besaeva S. G. Possibilities of application of microorganisms for solving of problem of environmental and food security. *Agrokhimiya* [Agrochemistry], 2010, no. 6, pp. 83–96 (in Russian).
3. Chourdary D. K., Johri B. N. Interaction of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 2009, vol. 164, no. 5, pp. 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
4. Abeer H., Asma A. H., Allah A., Qarawi A., Shalawi A., Dilfuza E. Impact of plant growth promoting *Bacillus subtilis* on growth and physiological parameters of *Bassia indica* (*Indian Bassia*) growth under salt stress. *Pakistan Journal of Botany*, 2015, vol. 47, no. 5, pp. 1735–1741.
5. Pérez-García A., Romero D., de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, vol. 22, no. 2, pp. 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
6. Sayed S. A., Atef A. S., Soha E. K. Response of three sweet basil cultivars to inoculation with *Bacillus subtilis* and arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress. *Nature and Science*, 2011, vol. 9, no. 6, pp. 93–111.
7. Kolomiets E., Sverchkova N., Mandrik-Litvinkovich M. Environmentally friendly biotechnologies for agriculture. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2019, no. 3 (193), pp. 4–9 (in Russian).
8. Kryzhko A. V., Kuznetsova L. N. The stimulating effect of entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis* on morphometric parameters of plants of lettuce. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Khimiya. Biologiya. Farmatsiya* [Bulletin of Voronezh State University. Series Chemistry. Biology. Pharmacy], 2017, no. 4, pp. 51–53 (in Russian).
9. The state program of development of agrarian business in Republic of Belarus for 2016–2020 [Electronic resource]. – Available at: <https://www.mshp.gov.by/programms/a868489390de4373.html> (accessed 15.07.2018) (in Russian).
10. Bobkova O. N. Assessment of a starting material for selection of cabbage lettuce on a complex valuable signs depending on sowing terms. *Zemledelie i zashchita rastenii = Agriculture and Plant Protection*, 2018, no. 6 (121), pp. 33–37 (in Russian).
11. Filippov I. G., Baurin D. V., Vasil'eva A. V., Markvichev N. S., Alekseeva O. B., Pervushina E. V., Chekalova K. V., Kostylev K. O. Formation of the operated biocenosis in peat substrates by enrichment the peat with salutary microorganisms. *Gavrish* [Gavrish], 2007, no. 5, pp. 12–15 (in Russian).
12. Soprunova V. E., Dolganova N. V., Bairambekov Sh. B. Quality and consumer properties of potatoes which are grown up with application of a biological product on the basis of bacteria *Bacillus*. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya* [Storage and processing of agricultural raw materials], 2017, no. 7, pp. 45–49 (in Russian).

13. Radhakrishnan R., Lee I. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, vol. 109, pp. 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>

14. Dudchenko L. G., Koz'yakov A. S., Krivenko V. V. *Spicy-aromatic and spicy-flavoring plants*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1989. 304 p. (in Russian).

15. Kalatskaya Zh. N., Doroshchuk O. V., Laman N. A., Molchan O. V., Nosonova T. L., Ovchinnikov I. A., Frolova T. V., Bratanova M. A., Mandrik-Litvinkovich M. N. Influence of compositions on the basis of bacteria antagonists *Bacillus* and phytohormones on stability of sprouts of barley at a salt stress. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects: a collection of scientific papers]. Minsk, 2017, vol. 9, pp. 183–190 (in Russian).

16. Kabashnikova L. F., Kalitukho L. N., Derevinskii A. V. *The quantitative analysis of the free and bound carbohydrates in one shot of vegetable tissue*. Minsk, Publishing House of the Belarusian State Pedagogical University, 2003. 22 p. (in Russian).

17. Voskresenskaya O. L., Alyabysheva E. A., Polovnikova M. G. *Big workshop on a bioecology. Pt. 1*. Yoshkar-Ola, Mari State University, 2006. 107 p. (in Russian).

18. Chupakhina G. N., Maslennikov P. V. (comp.). *Methods of the analysis of vitamins*. Kaliningrad, Publishing House of Kaliningrad State University, 2004. 36 p. (in Russian).

19. *MD 5048-89 Methodical directives by definition of nitrates and nitrites in products of crop production*. Moscow, 1989. 24 p. (in Russian).

20. *Sanitary and hygienic norms "Acceptable levels of content of nitrates in products of plant origin and methods of their definition"*. SanRaN 42-123-4619-88 (in Russian).

Информация об авторах

Дорошук Ольга Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: doroshuk.olga@mail.ru

Калатская Жанна Николаевна – 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: kalatskayaj@mail.ru

Ламан Николай Афанасьевич – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Горошко Наталья Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natashka.goroshko.96@mail.ru

Братанова Марина Анатольевна – мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Мандрик-Литвинкович Марина Николаевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: biocontrol@mbio.bas-net.by

Гиролович Наталия Ивановна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Акад. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: biocontrol@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Olga V. Doroshchuk – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: doroshuk.olga@mail.ru

Joanna N. Kalatskaya – 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: kalatskayaj@mail.ru

Nikolai A. Laman – Academician, D. Sc. (Biol.), 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: nikolai.laman@gmail.com

Natalia I. Goroshko – Junior Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natashka.goroshko.96@mail.ru

Maryna A. Bratanova – Junior Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Maryna N. Mandryk-Litvinkovich – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biocontrol@mbio.bas-net.by

Natalia I. Girilovich – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biocontrol@mbio.bas-net.by