

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2022. Т. 67, № 2

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2022. Т. 67, № 2

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

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 395 от 18 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

Владимир Иванович Торчик – Отделение биологических наук Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

М. Е. Никифоров (*заместитель главного редактора*) – Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

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
- В. М. Шкуматов** – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

- 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-Пяэцка** – Варшавский университет естественных наук, Варшава, Республика Польша
- О. Н. Пугачев** – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- А. И. Рапопорт** – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвийская Республика
- И. А. Тихонович** – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Адрес редакции:

ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Сайт: vestibio.belnauka.by

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2022. Т. 67, № 2.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Л. И. Кудерко*

Подписано в печать 12.04.2022. Выход в свет 27.04.2022. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 78 экз. Заказ 58.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,67 руб., ведомственная подписка – 29,77 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, 2022

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2022, vol. 67, no. 2

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

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

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

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

Editor-in-Chief

Vladimir I. Torchyk – Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

Mikhail E. Nikiforov (*Associate Editor-in-Chief*) – Scientific and Practical Center of the National Academy
of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus

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*

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

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

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

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

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

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

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

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

Vladimir F. Baginski – F. Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus
Arvids Barsevskis – Daugavpils University, Daugavpils, Republic of Lithuania
Yaroslav B. Blume – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Yuri Yu. Dgebuadze – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Vasiliy E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus
Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Wanda Olech-Piasecka – Warszaw University of Life Sciences, Warszaw, 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
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 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Website: vestibio.belnauka.by*

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series, 2022, vol. 67, no. 2.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *L. I. Kudzerko*

Sent for press 12.04.2022. Output 27.04.2022. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14.88. Publisher's signatures 16.4. Circulation 78 copies. Order 58.
Number price: individual subscription – 12.67 byn., departmental subscription – 29.77 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, 2022

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

ЗМЕСТ

Аверина Н. Г., Савина С. М., Дремук И. А., Емельянова А. В., Прищепчик Ю. В., Усатов А. В. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на физиолого-биохимические характеристики сортов озимой пшеницы с разным содержанием антоцианов в колеоптилях	135
Чижик О. В., Юхимук А. Н., Решетников В. Н. Голубика высокая (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.): протеомные и молекулярно-генетические исследования	147
Лущик М. Л., Амелянович М. Д., Тузова А. А., Моссэ И. Б., Данилова Л. И. Молекулярно-генетические характеристики пациентов с сахарным диабетом	158
Лобановская П. Ю., Акимова Л. Н., Хейдорова Е. Э. Распространение и характеристика <i>Ashworthius sidemi</i> Schulz, 1933 (Nematoda, Trichostrongylidae) у диких копытных в Беларуси	172
Хомюк Я. В., Литвиновская Р. П., Колбас А. П. Влияние эфирных масел и его эфиров с серной кислотой на морфометрические параметры подсолнечника <i>Helianthus annuus</i> L. сорта Гелиос	181
Пилипчук Т. А., Охремчук А. Э., Коломиец Э. И. Особенности молекулярно-генетической организации <i>Pseudomonas phage</i> БИМ BV-45 Д	190
Николаева И. В., Шейбак В. М., Дорошенко Е. М. Уровень свободных аминокислот и их метаболитов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и печени в условиях введения ацетата свинца	197
Павловский Н. Б. Оценка экологической адаптивности сортов голубики высокорослой, интродуцированных в Беларуси	206
Гуринович А. С., Сацункевич Н. Е., Титок М. А. Распространение рBS72-подобных конъюгативных плазмид среди природных бактерий рода <i>Bacillus</i>	219

АГЛЯДЫ

Волотовский И. Д., Пинчук С. В. Проточная цитометрия. Основы технологии и ее применение в биологии ...	229
Куликов Я. К. Экологические функции растительно-микробных симбиозов и их роль в развитии ресурсосберегающих биотехнологий	243

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

CONTENTS

Averina N. G., Savina S. M., Dremuk I. A., Yemelyanova H. V., Pryshchepchyk Yu. V., Usatov A. V. Influence of 5-aminolevulinic acid on physiological and biochemical characteristics of winter wheat varieties with different levels of anthocyanins in coleoptiles	135
Chizhik O. V., Yukhimuk A. N., Reshetnikov V. N. Highbush blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.): proteomic and molecular genetic studies	147
Lushchyk M. L., Ameliyanovich M. D., Tuzava H. A., Mosse I. B., Danilova L. I. Molecular-genetic characteristics of patients with diabetes mellitus	158
Lobanovskaya P. Y., Akimova L. N., Kheidorova E. E. Distribution and characteristics of <i>Ashworthius sidemi</i> Schulz, 1933 (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ungulates in Belarus	172
Khamiuk Ya. V., Litvinovskaya R. P., Kolbas A. P. The effect of epibrassinolide and its sulfuric acid esters on the morphometric parameters of sunflower <i>Helianthus annuus</i> L. (cv. Helios)	181
Pilipchuk T. A., Akhremchuk A. E., Kalamiyets E. I. Molecular-genetic structure of <i>Pseudomonas phage</i> BIM BV-45 D	190
Nikalayeva I. V., Sheibak V. M., Doroshenko E. M. Amino acid balance of microbial-tissue complex in the small intestinal and liver under administration of lead acetate	197
Pavlovskiy N. B. Evaluation of ecological adaptability of blueberry cultivars introduced in Belarus	206
Hurynovich A. S., Satsunkevich N. E., Titok M. A. Distribution of pBS72-like conjugative plasmids among natural bacteria of the genus <i>Bacillus</i>	219

REVIEWS

Volotovskii I. D., Pinchuk S. V. Flow cytometry. Basics of technology and its application in biology	229
Kulikou Ya. K. Ecological functions of plant-microbial symbioses and their role in the development of resource-saving biotechnologies	243

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.3:577.1:631.8
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-135-146>

Поступила в редакцию 22.11.2021
Received 22.11.2021

Н. Г. Аверина¹, С. М. Савина¹, И. А. Дремук¹, А. В. Емельянова¹,
Ю. В. Прищепчик¹, А. В. Усатов²

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

²Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

ВЛИЯНИЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТОЦИАНОВ В КОЛЕОПТИЛЯХ

Аннотация. Изучен ряд физиолого-биохимических характеристик двух сортов озимой пшеницы – с красными (Эт W5) и зелеными (Влади) coleoptiles. Сорт Эт W5 с высоким содержанием в coleoptiles антоцианов (в среднем 412 ± 52 мкмоль/г сырой массы), хлорофиллов (Хл) и каротиноидов и низким – гема и пролина обладал высокой морозостойкостью (88 % выживших растений, подвергшихся воздействию температуры -8 °С в течение 5 ч в возрасте 7 дней), а также высокой способностью к продолжению роста и развития после перенесенного охлаждения. Сорт Влади с низким содержанием антоцианов (в среднем $12,5 \pm 1,2$ мкмоль/г сырой массы), Хл и каротиноидов, но с более высокими, чем у сорта Эт W5, уровнями гема и пролина в coleoptiles, характеризовался низкой морозостойкостью (80 % выживших растений) и слабой способностью к продолжению роста и развития после перенесенного охлаждения. Замачивание на 2 ч семян пшеницы в растворе экзогенной АЛК (50 мг/л) перед высевом способствовало повышению всхожести семян обоих сортов, а у растений сорта Эт W5 – увеличению их длины (на 10 %) и содержания антоцианов в coleoptiles (в 1,4 раза), а также повышению морозоустойчивости (до 97 %). Под воздействием АЛК морозоустойчивость растений сорта Влади возрастала до 93 %.

Ключевые слова: растения озимой пшеницы, сорта Эт W5 и Влади, coleoptiles, морозоустойчивость, рост, адаптация, антоцианы, хлорофиллы *a* и *b*, гем, пролин, 5-аминолевулиновая кислота

Для цитирования: Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на физиолого-биохимические характеристики сортов озимой пшеницы с разным содержанием антоцианов в coleoptiles / Н. Г. Аверина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 135–146. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-135-146>

Natalia G. Averina¹, Sviatlana M. Savina¹, Irina A. Dremuk¹, Hanna V. Yemelyanova¹,
Yuliya V. Pryshchepchik¹, Alexandr V. Usatov²

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

²South Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

INFLUENCE OF 5-AMINOLEVULINIC ACID ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF WINTER WHEAT VARIETIES WITH DIFFERENT LEVELS OF ANTHOCYANINS IN COLEOPTILES

Abstract. Physiological and biochemical characteristics of two varieties of winter wheat seedlings with red (Et W5) and green (Vladi) coleoptiles have been studied. Variety Et W5 with high content of anthocyanins (on average 412 ± 52 $\mu\text{mol/g}$ fr wt), chlorophylls (Chl) and carotenoids and a low level of heme and proline in coleoptiles had high frost resistance (88 % of surviving plants exposed to temperatures of -8 °C for 5 h at the age of 7 days) and a high ability to continue growth and development after undergoing cooling. Variety Vladi with a low content of anthocyanins (on average 12.5 ± 1.2 $\mu\text{mol/g}$ fr wt), Chl and carotenoids, but a higher level of heme and proline in coleoptiles compared to varieties Et W5 had low level of frost resistance (80 % of surviving plants) and was characterized by a low ability to continue growth and development after undergoing cooling. Soaking wheat seeds in a solution of exogenous ALA (50 mg/l) for 2 h before sowing increased the germination of seeds of both varieties, enhanced the length of plants of the Et W5 variety by 10 %, 1.4 times the content of anthocyanins in the coleoptiles of this variety plants and also increased their frost resistance up to 97 %. Under action of ALA frost resistance of Vladi seedlings increased up to 93 %.

Keywords: winter wheat plants, varieties Et W5 and Vladi, coleoptiles, frost resistance, growth, adaptation, anthocyanins, chlorophylls *a* and *b*, heme, proline, 5-aminolevulinic acid

For citation: Averina N. G., Savina S. M., Dremuk I. A., Yemelyanova H. V., Pryshchepchik Yu. V., Usatov A. V. Influence of 5-aminolevulinic acid on physiological and biochemical characteristics of winter wheat varieties with different levels of anthocyanins in coleoptiles. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 135–146 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-135-146>

Введение. Вторичные метаболиты растений – флавоноиды принадлежат к наиболее распространенному и многочисленному классу растительных полифенолов. Важнейшими представителями флавоноидов являются антоцианы – нефотосинтетические, водорастворимые пигменты, которые играют важную роль в развитии растений, их защите от патогенов и неблагоприятных факторов внешней среды [1]. Они накапливаются в вакуолях и окрашивают плоды, листья, цветы, зерна в розовый, красный, голубой, фиолетовый цвета и их различные сочетания. Антоцианы обладают огромным разнообразием физиологических функций, что определяет их высокую значимость в мире растений, животных и человека [1]. Они активно используются в фармакологической, косметической и пищевой промышленности в качестве натуральных красителей и биологически активных соединений, обладающих окислительно-восстановительными, антиоксидантными, противовоспалительными и нейропротекторными свойствами.

В растениях антоцианы уменьшают степень фотоингибирования, а также ускоряют восстановление фотосинтетического аппарата растений [2]. Они активно поглощают излучение в УФ-области, защищая растения от губительного действия УФ-лучей [3]. Молекулы антоцианов благодаря наличию в их структуре ароматических колец и свободных гидроксильных групп легко вступают в свободнорадикальные реакции, связывают активные формы кислорода и перекисные радикалы, образующиеся при стрессовых воздействиях, выполняя при этом роль низкомолекулярных антиоксидантов [4, 5]. Очищенные растворы антоцианов удаляют практически все виды активных форм кислорода и азота с эффективностью в 4 раза большей, чем аскорбат и α -токоферол [6].

Наиболее перспективным представляется использование антоцианов в качестве антистрессоров в сельскохозяйственном производстве, в частности в растениеводстве, что позволит повысить устойчивость растений, произрастающих в условиях неблагоприятных факторов внешней среды [7, 8]. Низкотемпературный стресс является чрезвычайно важным фактором, ограничивающим развитие и урожайность сельскохозяйственных культур, реализацию их биологического потенциала. Показано, что при низкотемпературном стрессе в растениях усиливается накопление антоцианов [9], повышается экспрессия генов ключевых ферментов и транскрипционных факторов пути биосинтеза флавоноидов – *PAL*, *CHS*, *CHI*, *DFR*, *PAP1*, *HY5* [9, 10], возрастают их содержание и активность, что в целом приводит к повышению низкотемпературной устойчивости растений [11]. Индукция накопления антоцианов в хозяйственно ценных сельскохозяйственных культурах, в том числе в озимых, может явиться весьма эффективным способом повышения холодо- и морозоустойчивости растений. 5-Аминолевулиновая кислота (АЛК) – предшественник циклических и линейных тетрапирролов – также является экологически чистым природным регулятором роста растений, антистрессором [12] и высокоэффективным индуктором накопления антоцианов. АЛК усиливает обусловленную антоцианами окраску плодов, улучшает товарный вид и вкусовые качества яблок [13], персиков [14], груш [15], китайской сливы [16]. В кожуре яблок и в листьях реликтового растения Гингко билоба, а также в растениях озимого рапса, обработанных АЛК, отмечено повышение экспрессии генов ключевых ферментов системы биосинтеза антоцианов – *PAL*, *CHS*, *CHI*, *DFR* [17] и гена регуляторного фактора *HY5* [18]. Использование АЛК в качестве индуктора накопления антоцианов может стать эффективным приемом повышения холодо- и морозоустойчивости растений.

Большое внимание уделяется также изучению влияния антоцианов на формирование стрессоустойчивости разных тканей и органов растений. Наиболее подходящим объектом для таких исследований является пшеница, гены которой, контролирующие пигментацию отдельных ее органов, таких как колеоптили (*Rc*-гены), стебли (*Pc*), зерно (*R*), перикарп (*Pp*), пыльники (*Pan*) и др. [19, 20], расшифрованы и установлена их регуляторная природа [20, 21]. Важная роль в формировании устойчивости растений к абиотическим и биотическим факторам внешней среды отводится колеоптилям пшеницы. Так, показана защитная роль антоцианов, содержащихся в колеоптилях проростков пшеницы, выращиваемых в присутствии ионов Cd [22]. Проростки близко изогенных линий пшеницы с интенсивно окрашенными в красный цвет колеоптилями и высоким содержанием антоцианов обладали большей устойчивостью к засухе по сравнению с растениями со слабо окрашенными органами и низким уровнем в них антоцианов [23]. Отмечена защита корневой системы и побегов от засухи в присутствии антоцианов в колеоптилях пшеницы [24].

Сообщается, что пшеница с интенсивно окрашенными колеоптилями обладает высокой устойчивостью к заражению головней [25]. Особый интерес представляет озимая пшеница, которая является основной и важнейшей культурой в сельском хозяйстве многих стран – России, США, Канады, а также Беларуси, находящейся в зоне неустойчивого или рискованного земледелия. Зимостойкость озимой пшеницы является одной из важнейших характеристик ее адаптивности. Данные о наличии связи между содержанием антоцианов в колеоптилях и морозоустойчивостью растений пшеницы (при воздействии отрицательных температур) отсутствуют. Представляло значительный интерес провести сравнительный анализ ряда физиолого-биохимических характеристик проростков двух сортов озимой пшеницы с разной окраской и содержанием антоцианов в колеоптилях, оценить степень морозоустойчивости таких растений, изучить влияние экзогенной АЛК на дополнительное накопление антоцианов в колеоптилях растений с разным исходным уровнем антоцианов и на морозоустойчивость таких растений.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали 7–10-дневные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух сортов: Эт W5 (с красной окраской колеоптилей) и Влади (с зеленой окраской колеоптилей). Семена пшеницы высаживали в грунт «Восторг» и выращивали в лабораторных условиях при температуре $+25 \pm 2$ °С под люминесцентными лампами белого света (Philips TL-D 36W/765) в режиме 14 ч света/10 ч темноты до 7–10-дневного возраста, оценивая в них морфометрические и ряд биохимических показателей. В опытах с экзогенной АЛК семена пшеницы предварительно замачивали в дистиллированной воде (контроль) или в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л, выдерживали в течение 2 ч при температуре $+25 \pm 2$ °С, а затем высаживали в грунт «Восторг» и выращивали при описанных выше условиях до 10-дневного возраста.

Длину колеоптилей и общую длину проростков над зерновкой измеряли с помощью линейки.

Для моделирования стрессовых условий 7–8-дневные проростки помещали в климатическую камеру (ClimaCell, Чехия) и выдерживали при температуре -8 °С в течение 5 ч. Затем проростки переносили в нормальные условия выращивания при $+25 \pm 2$ °С на 24 ч, оценивали относительное содержание выживших и погибших проростков и доращивали их до 10-х суток, чтобы оценить способность проростков к продолжению роста и развития после перенесенного охлаждения.

Содержание антоцианов определяли согласно методу [26]. Навеску 0,1 г свежего растительного материала растирали в 0,5 мл 1 %-ного HCl. Остаток в ступке еще раз смывали 0,5 мл раствора. К экстракту добавляли 1 мл хлороформа и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 12 000 g и температуре 4 °С. Супернатант отбирали и измеряли оптическую плотность при 525 нм на спектрофотометре Solar PB 2201. Содержание антоцианов рассчитывали в мкмоль на 1 г сырой массы (в эквиваленте цианидин-3-глюкозида), используя коэффициент молярной экстинкции $31,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Для определения содержания пролина навеску листьев ячменя (0,1 г) фиксировали жидким азотом, растирали в 1 мл 3 %-ной сульфосалициловой кислоты и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 13 000 g. К супернатанту (0,25 мл) добавляли равные объемы ледяной уксусной кислоты и кислого нингидринового реагента (0,25 г нингидрина в 10 мл раствора, содержащего ледяную уксусную кислоту, дистиллированную воду и 85 %-ную ортофосфорную кислоту в соотношении 6:3:1). Пробы инкубировали 1 ч при 90 °С. От оптической плотности раствора при 515 нм [27] переходили к содержанию пролина, используя калибровочную кривую.

Содержание Хл и каротиноидов в колеоптилях определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [28]. Пигменты экстрагировали из свежего растительного материала 100 %-ным ацетоном, содержащим CaCO₃ (из расчета 0,1 г навески листьев + 2 мл ацетона + 100 мг CaCO₃). Разделение Хл и каротиноидов осуществляли на хроматографе высокого давления Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия). В качестве элюента А использовали раствор, содержащий 90 % ацетонитрила, 9,9 % фильтрованной H₂O и 0,1 % триэтиламина, в качестве элюента В – 100 %-ный этилацетат. Скорость потока элюентов составляла 0,5 мл/мин. Регистрацию пигментов проводили при спектре поглощения от 200 до 700 нм,

используя детектор с диодной матрицей. Идентификацию пиков осуществляли по спектрам поглощения [28]. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм. Для количественного определения Хл и каротиноидов использовали площади пиков хроматограммы.

Содержание пигментов (табл. 1) рассчитывали по формуле $C_{\text{пигм}} = S_{440} F_{\text{пигм}} V / V_{\text{инъекц}} m$, где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента (мкг/г сырой массы); S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм; $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета концентрации Хл и каротиноидов; V – объем супернатанта (2 мл); $V_{\text{инъекц}}$ – объем инъекции (20 мкл), m – масса сухого вещества в 0,1 г навески.

Т а б л и ц а 1. Последовательность выхода пигментов из колонки и факторы для расчета концентрации Хл и каротиноидов

Table 1. Sequence of exit of pigments from the column and factors for calculating the concentration of Chl and carotenoids

Пигмент	Фактор
Неоксантин	$65 \cdot 10^{-9}$
Виолксантин	$44 \cdot 10^{-9}$
Антраксантин	$56 \cdot 10^{-9}$
Лютеин	$45 \cdot 10^{-9}$
Зеаксантин	$81 \cdot 10^{-9}$
Хлорофилл <i>b</i>	$182 \cdot 10^{-9}$
Хлорофилл <i>a</i>	$189 \cdot 10^{-9}$
β -Каротин	$88 \cdot 10^{-9}$

Содержание нековалентно связанного с белками гема определяли согласно [29]. Из навески 0,5 г растительного материала колеоптилей извлекали Хл и свободный гем в смесь ацетон:0,1 н NH_4OH (9:1, v:v). Из оставшихся осадков с использованием смеси кислого ацетона (0,5 мл концентрированной HCl в 10 мл ацетона) и ДМСО экстрагировали гем, нековалентно связанный белками. Гем переводили в диэтиловый эфир, после чего концентрировали на колонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6В, элюировали смесью 96 %-ный этанол:ледяная уксусная кислота:вода (81:9:10, v:v:v) и по спектрам поглощения при $\lambda = 398$ нм определяли его количество (молярный коэффициент экстинкции $144 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Для статистической обработки экспериментальных данных и учета полученных результатов использовали стандартные пакеты программ Excel 2010, SigmaPlot 10.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований. Статистическая обработка данных состояла в определении средней квадратичной ошибки их среднего. Приведены средние значения из 3–7 независимых экспериментов и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение. Оценка содержания антоцианов в колеоптилях 7-дневных проростков двух сортов озимой пшеницы показала, что у сорта Эт W5 с красными колеоптилями оно составило в среднем $411,7 \pm 51,6$ мкмоль/г сырой массы, что практически в 33 раза превышало таковое у сорта Влади с зелеными колеоптилями – $12,5 \pm 1,2$ мкмоль/г сырой массы.

В 7-дневном возрасте растения двух сортов незначительно отличались по морфометрическим характеристикам. Так, средняя высота надземной части проростков у сорта Эт W5 составляла $12,2 \pm 1,0$ см, а у сорта Влади – $13,1 \pm 0,7$ см (рис. 1). Высота колеоптилей у проростков этих сортов – $2,5 \pm 0,7$ и $2,3 \pm 0,7$ см соответственно (рис. 2).

Наряду с этим была проведена оценка морозоустойчивости изучаемых сортов. Проростки озимой пшеницы в возрасте 7–8 дней выдерживали в течение 5 ч при температуре -8 °С. Сразу после выноса растений из камеры подсчитывали упавшие стебли, а на следующие сутки после воздействия отрицательной температуры – относительное содержание погибших проростков. Оба сорта показали разную морозоустойчивость: высокую – у Эт W5 (88 % выживших проростков), более низкую – у Влади (80 % выживших проростков) (рис. 3).

Одним из показателей морозоустойчивости растений, их способности к адаптации в условиях смены режима выращивания является их способность к продолжению роста и развития после

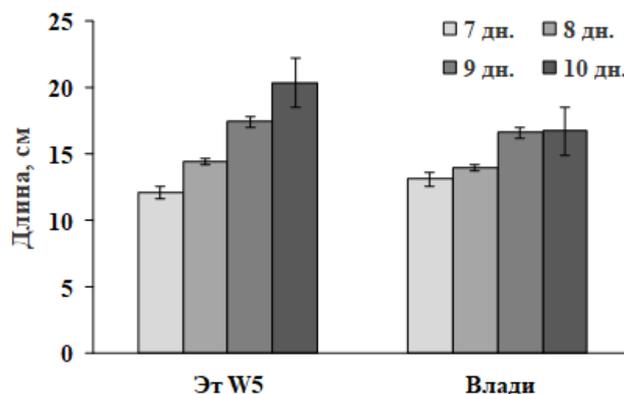


Рис. 1. Длина надземной части проростков у сортов Эт W5 и Влади, которые в 7-дневном возрасте помещали в морозильную камеру при -8°C на 5 ч, а затем переносили в нормальные условия выращивания (до 10-х суток)

Fig. 1. The length of the above-ground part of the seedlings in varieties Et W5 and Vladi, which at 7 days of age were placed in a freezer at -8°C for 5 h, and again transferred to normal growing conditions (up to 10 days)

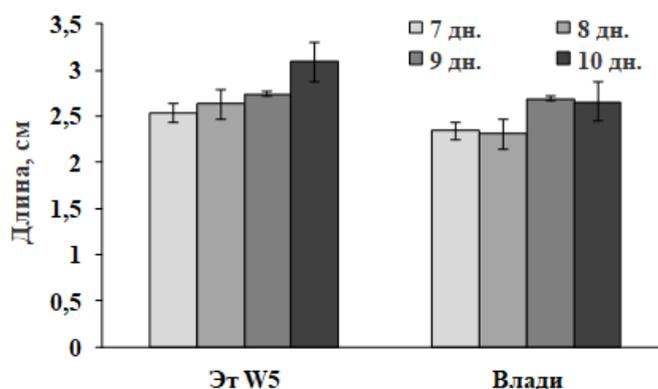


Рис. 2. Длина coleoptилей у проростков сортов Эт W5 и Влади, которые в 7-дневном возрасте помещали в морозильную камеру при -8°C на 5 ч, а затем переносили в нормальные условия выращивания (до 10-х суток)

Fig. 2. The length of coleoptiles in seedlings of varieties Et W5 and Vladi, which at 7 days of age were placed in a freezer at -8°C for 5 h, and then transferred again to normal growing conditions (up to 10 days)

перенесенного охлаждения. Наблюдение за ростом растений после перенесенного в возрасте 7 дней охлаждения показало следующую картину. Через сутки после воздействия охлаждения прирост надземной части растений у сорта Эт W5 составил 2,3 см, у проростков сорта Влади – 0,9 см (см. рис. 1). Между 2-ми и 3-ми сутками после перенесенного охлаждения (9- и 10-дневные растения) прирост надземной части проростков у сорта Эт W5 с красными coleoptилями составил 2,95 см, в то время как у растений сорта Влади с зелеными coleoptилями прироста практически не наблюдалось (лишь 0,09 см прироста). Через 3 сут после охлаждения прирост длины проростков у сорта Влади в среднем составил 3,4 см, что было значительно ниже, чем у сорта Эт W5 (8,2 см).

Похожая картина наблюдалась и при оценке ростовых характеристик coleoptилей. После переохлаждения прирост coleoptилей у сорта Эт W5 на 10-е сутки вегетации в среднем составил 0,55 см, а у сорта Влади – 0,32 см (рис. 2). Таким образом, проростки с красными coleoptилями показали высокую способность к сохранению жизнеспособности после перенесенного охлаждения.

В coleoptилях проростков изучаемых сортов было изучено содержание фотосинтетических пигментов – Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов. В 7-дневных проростках Эт W5 среднее содержание Хл *a* составило 212 ± 16 мкг/г сырой массы, Хл *b* – 83 ± 6 мкг/г сырой массы. Во всех экспериментах у проростков сорта Влади, обладающего низкой морозоустойчивостью, содержание Хл *a* и Хл *b* оказывалось всегда ниже по сравнению с их содержанием у сорта Эт W5 – в среднем 179 ± 19 и 68 ± 7 мкг/г сырой массы соответственно.

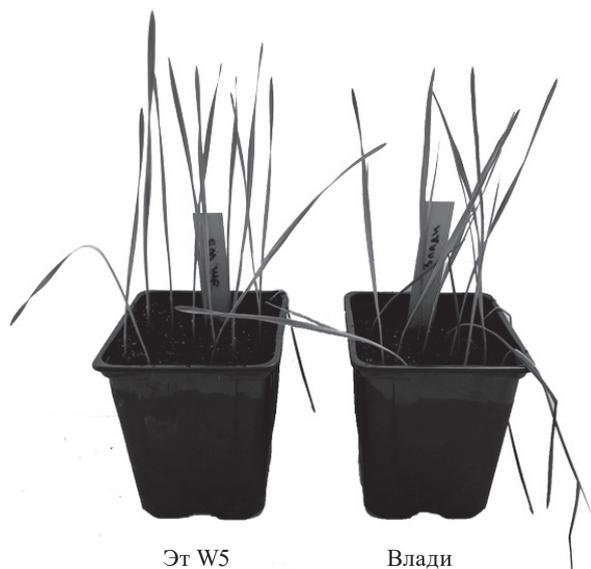


Рис. 3. Внешний вид 8-дневных проростков озимой пшеницы сортов Эт W5 и Влади, которые в 7-дневном возрасте находились в морозильной камере при -8°C в течение 5 ч (результаты индивидуального опыта)

Fig. 3. Appearance of 8-day-old seedlings of winter wheat varieties Et W5 and Vladi, which at 7 days of age were placed in a freezer at -8°C for 5 h (results of individual experience)

с этим гем осуществляет тонкий контроль за образованием и активностью ряда ферментов, которые принимают участие в биосинтезе тетрапирролов и, в частности, осуществляют синтез АЛК [12].

Оценен уровень нековалентно связанного с белками гема, который составляет основную часть клеточного гема, а в хлоропластах в 3 раза превышает количество ковалентно связанного с белками гема. Содержание гема у сорта Эт W5 оказалось низким ($5,0 \pm 1,6$ нмоль/г сырой массы – 100 %) по сравнению с сортом Влади ($6,8 \pm 0,9$ нмоль/г сырой массы – 135 %). Хотя различия между вариантами недостоверны, не исключено, что гем, входящий в состав пероксидаз и каталазы, участвует в формировании стрессоустойчивости растений сорта Влади.

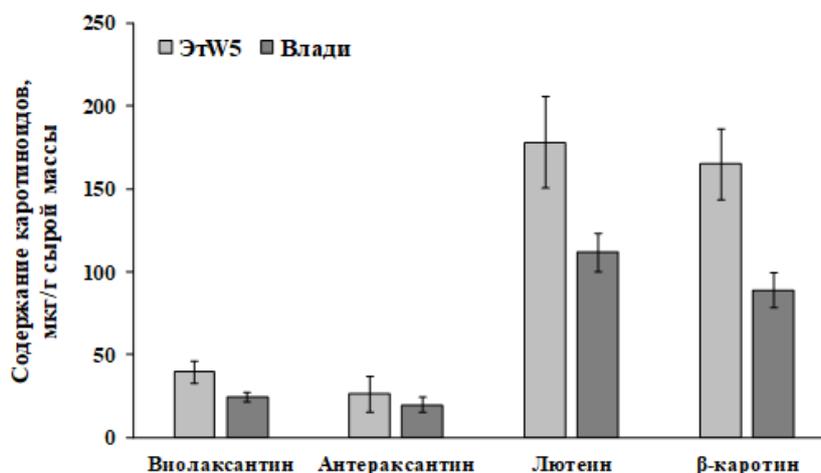


Рис. 4. Содержание ксантофиллов и β-каротина в coleoptiles 8-дневных проростков озимой пшеницы сортов Эт W5 и Влади

Fig. 4. Content of xanthophylls and β-carotene in coleoptiles of 8-day-old seedlings of winter wheat varieties Et W5 and Vladi

Общее содержание каротиноидов у сорта Эт W5 с красными coleoptiles и высоким содержанием антоцианов было значительно выше (409 ± 63 мкг/г сырой массы), чем в coleoptiles проростков сорта Влади (246 ± 26 мкг/г сырой массы). Такой же характер распределения между сортами наблюдали и при оценке содержания индивидуальных каротиноидов, ксантофиллов – виолаксантина, антраксантина, лютеина, а также бескислородного каротиноида β-каротина (рис. 4). Показатели содержания фотосинтетических пигментов коррелировали с показателями морозоустойчивости изучаемых сортов озимой пшеницы, что может указывать на важную роль фотосинтетических пигментов, а следовательно, и фотосинтеза в формировании морозоустойчивости.

Изучено также содержание еще одного важнейшего продукта в системе синтеза тетрапирролов – гема. Гемсодержащие белки участвуют в связывании кислорода, дыхании, детоксикации активных форм кислорода, входя в состав пероксидаз и каталазы, а также в транспорте электронов в ходе окислительного и фотосинтетического фосфорилирования (цитохромы) и восстановлении нитратов высшими растениями (нитратредуктаза и нитритредуктаза). Наряду

В следующей серии экспериментов нами было изучено содержание универсального стресс-протектора пролина. Пролин является обязательным компонентом растительной клетки, а в условиях стресса его содержание многократно возрастает. В настоящее время он рассматривается как универсальный антистрессор, который выполняет целый ряд защитных функций, выступая, в частности, в качестве тушителя синглетного кислорода и H_2O_2 , а также перехватчика свободных радикалов [30, 31]. Как и в случае с гемом, низкий уровень пролина (89 ± 18 мкг/г сырой массы – 100 %) наблюдали в coleoptilyах сорта Эт W5 в возрасте 8 дней (рис. 5). Уровень пролина в coleoptilyах сорта Влади, обладающего низкой морозоустойчивостью, составил 212 ± 15 мкг/г сырой массы – 238 % по сравнению с его содержанием у сорта Эт W5. По-видимому, в условиях низкого уровня антоцианов основную роль в морозоустойчивости растений играет универсальный антистрессор пролин, который в условиях стресса выполняет функцию основного защитного агента.

В отдельной серии экспериментов с предварительным (в течение 2 ч) замачиванием семян пшеницы перед посевом в растворе экзогенной АЛК (50 мг/л – опыт) либо в воде (контроль) было показано незначительное повышение длины проростков (до 10 %) и длины coleoptilyей (до 15 %) у пшеницы сорта Эт W5 в возрасте 7 дней. По-видимому, стимуляция ростовых процессов связана с известным проявлением экзогенной АЛК свойств регулятора роста растений [12]. Обработка АЛК увеличивала также всхожесть семян: от 65 % в контрольных растениях до 80 % у сорта Влади и, соответственно, от 95 до 100 % у сорта Эт W5.

Содержание антоцианов в coleoptilyах 8-дневных растений сортов Эт W5 и Влади возрастало по сравнению с контрольными вариантами каждого сорта (табл. 2). В coleoptilyах сорта Эт W5 содержание антоцианов в среднем составило 592 мкмоль/г сырой массы. Под действием АЛК окраска coleoptilyей данного сорта становилась более интенсивной. Напротив, у сорта Влади визуальных изменений в окраске coleoptilyей под действием АЛК не зафиксировано. Среднее содержание антоцианов в coleoptilyах этого сорта так и осталось низким и составило в среднем 22 мкмоль/г сырой массы.

Содержание Хл *a* в coleoptilyах 8-дневных проростков пшеницы сорта Эт W5 снижалось под действием АЛК на 19 % по сравнению с контролем и практически не изменялось у сорта Влади (меньше лишь на 4 %) (рис. 5, *b*). Такая же картина наблюдалась и в случае Хл *b*, содержание которого в coleoptilyах сорта Эт W5 после обработки АЛК снизилось на 16 %, а у сорта Влади – на 8 %. Ранее на растениях озимого рапса нами было показано, что при их выращивании на растворе АЛК в концентрации 200 мг/л содержание Хл значительно снижается на ранних стадиях развития проростков, что сопровождается накоплением антоцианов [32]. Одной из причин являлось снижение под действием высокой концентрации экзогенной АЛК активности ряда

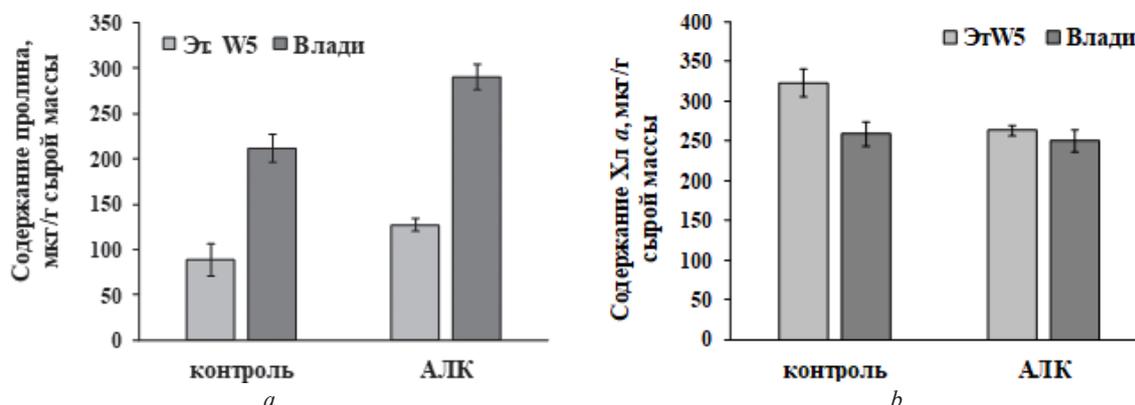


Рис. 5. Содержание пролина (*a*) и Хл *a* (*b*) в coleoptilyах 8-дневных проростков озимой пшеницы сортов Эт W5 и Влади, семена которых предварительно перед посевом замачивали в течение 2 ч в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л или в воде (контроль)

Fig. 5. The content of proline (*a*) and Chl *a* (*b*) in coleoptiles of 8-day-old seedlings of winter wheat varieties Et W5 and Vladi, the seeds of which were soaked before sowing for 2 h in a solution of ALA with a concentration of 50 mg/l, or in water (control)

ферментов, принимающих участие в образовании Хл, что рассматривалось нами как один из защитных механизмов, контролирующих образование порфиринов-фотосенсибилизаторов из экзогенной АЛК. Следует отметить, что максимальное снижение содержания Хл наблюдалось у сорта Эт W5 с высоким содержанием антоцианов. В работе [33] высказано предположение, что пластидно-ядерная сигнализация, управляющая экспрессией ядерных генов пути биосинтеза антоцианов и фотосинтетических генов, оказывает противоположное действие на оба процесса, что, возможно, и приводит к снижению содержания Хл в ходе параллельного накопления антоцианов у Эт W5.

Т а б л и ц а 2. Содержание антоцианов (мкмоль/г сырой массы) в coleoptiles 8-дневных проростков пшеницы сортов Эт W5 и Влади, семена которых перед посевом предварительно замачивали в течение 2 ч в растворах АЛК в концентрации 50 мг/л либо в воде (контроль)

Table 2. The content of anthocyanins (μ mol/g fr wt) in coleoptiles of 8-day-old wheat seedlings of varieties Et W5 and Vladi, the seeds of which were soaked before sowing for 2 hours in ALA solutions at a concentration of 50 mg/l, or in water (control)

Концентрация АЛК, мг/л	Эт W5	Влади
0 (контроль)	411,7 \pm 51,6	12,5 \pm 1,2
50	591,6 \pm 78,6	21,6 \pm 7,5

Нами отмечено также устойчивое снижение содержания каротиноидов в coleoptiles сорта Эт W5, выращенного из семян, обработанных АЛК. Так, содержание ксантофиллов в среднем составило 57 % от контроля, β -каротин – 65, общее содержание каротиноидов – 64 %. В то же время в coleoptiles сорта Влади содержание лютеина, β -каротин и общее содержание каротиноидов превышало их содержание в контроле на 19, 34 и 19 % соответственно.

Достоверных различий и четкой картины влияния АЛК на содержание гема в coleoptiles растений озимой пшеницы сортов Эт W5 и Влади не зафиксировано. Так, воздействие АЛК способствовало снижению содержания гема в coleoptiles сорта Эт W5 на 10 %, у сорта Влади – на 3 % по сравнению с соответствующими контролями. В то же время обработка АЛК привела к отчетливому повышению содержания пролина в coleoptiles обоих сортов – на 38 мкг/г сырой массы у сорта Эт W5 и на 78 мкг/г сырой массы у сорта Влади после обработки (рис. 5).

Оценка влияния АЛК на морозоустойчивость растений показала повышение этого показателя у растений сорта Эт W5 до 97 %, а у растений сорта Влади до 93 %.

Заключение. Таким образом, изучены два сорта озимой пшеницы – с красными (Эт W5) и зелеными (Влади) coleoptiles. Сорт Эт W5 с содержанием антоцианов в coleoptiles в среднем 412 ± 52 мкмоль/г сырой массы обладал высоким уровнем морозостойкости (88 % выживших растений в возрасте 7–8 дней, подвергшихся воздействию температуры -8 °C в течение 5 ч) и высокой способностью к продолжению роста и развития после перенесенного охлаждения. Так, через 3 сут после охлаждения прирост длины проростков в среднем составил 8,2 см. Растения сорта Влади с зелеными coleoptiles, низким содержанием антоцианов в coleoptiles ($12,5 \pm 1,2$ мкмоль/г сырой массы) и более низким уровнем морозостойкости (80 % выживших растений) характеризовались низкой способностью к продолжению роста и развития после перенесенного охлаждения – через 3 сут после охлаждения прирост длины проростков у этого сорта составил 3,4 см.

Содержание Хл *a* и Хл *b* в coleoptiles растений сорта Влади, обладающего низкой морозоустойчивостью, оказывалось в среднем на 17 % ниже, чем у сорта Эт W5. Как общее содержание каротиноидов, так и содержание ксантофиллов – виолаксантина, антраксантина, лютеина и бескислородного β -каротин – было высоким у сорта Эт W5 (409 ± 63 мкг/г сырой массы) и низким у сорта Влади (246 ± 26 мкг/г сырой массы), что в целом указывает на важную роль фотосинтетических пигментов, а следовательно, и фотосинтеза в формировании морозоустойчивости.

Отмечена тенденция к повышению содержания гема в coleoptiles проростков сорта Влади (до 133 %) по сравнению с его содержанием в coleoptiles растений сорта Эт W5. Такую же картину наблюдали и при оценке содержания в coleoptiles универсального стресс-протектора

пролина. Его уровень также был выше у сорта Влади (212 мкг/г сырой массы) по сравнению с обогащенным антоцианами сортом Эт W5 (89 мкг/г сырой массы). Полученные результаты указывают на то, что при низком уровне антоцианов основную роль в морозоустойчивости растений играет универсальный антистрессор пролин, который в условиях стресса выполняет функцию защитного агента. Вместе с тем высокое содержание антоцианов, а также фотосинтетических пигментов в колеоптилях растений озимой пшеницы на фоне низких уровней гема и пролина обеспечивает проросткам высокую морозоустойчивость и способность к последующей адаптации после перенесенного охлаждения.

Показано, что замачивание семян пшеницы в растворе экзогенной АЛК (50 мг/л) на 2 ч перед высевом повышает всхожесть семян обоих сортов, а у сорта Эт W5 на 10 % увеличивает длину растений и на 15 % длину колеоптилей. В колеоптилях растений этого сорта отмечено возрастание содержания антоцианов в 1,4 раза, а также повышение морозоустойчивости таких растений до 97 % (у растений сорта Влади – до 93 %), что делает привлекательным использование АЛК как эффективный прием для повышения морозоустойчивости растений озимой пшеницы.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (договор № Б20ГРМГ-001) в рамках международного проекта «Расшифровка взаимозависимых механизмов управления биосинтезом хлорофилла и антоцианов в условиях абиотического стресса». Авторы также выражают искреннюю благодарность кандидату биологических наук, доценту С. И. Гордею – руководителю отдела озимых зерновых культур в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» за предоставление семян сортов озимой пшеницы.

Acknowledgements. The work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (contract no. B20GRMG-001) within the framework of the international project “Deciphering the interdependent mechanisms for controlling the biosynthesis of chlorophyll and anthocyanins under abiotic stress”. The authors also express their sincere gratitude to Candidate of Biological Sciences, Associate Professor S. I. Gordey, Head of the Department of Winter Grain Crops at the Republican Unitary Enterprise “Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Agriculture” for providing seeds of winter wheat varieties.

Список использованных источников

1. Peer, W. A. Flavonoids as signal molecules: targets of flavonoid action / W. A. Peer, A. S. Murphy // The science of flavonoids / ed. by P. E. Grotewald. – New York, 2008. – P. 239–268.
2. Feild, T. S. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood / T. S. Feild, D. W. Lee, N. M. Holbrook // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 127, N 2. – P. 566–574. <https://doi.org/10.1104/pp.010063>
3. Giusti, M. M. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins / M. M. Giusti, L. E. Rodriguez-Saona, R. E. Wrolstad // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, N 11. – P. 4631–4637. <https://doi.org/10.1021/jf981271k>
4. Shi, M. Z. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana* / M. Z. Shi, D. Y. Xie // Recent Pat. Biotechnol. – 2014. – Vol. 8, N 1. – P. 47–60. <https://doi.org/10.2174/1872208307666131218123538>
5. Zhao, H. J. Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress / H. J. Zhao, Q. Zou // Photosynthetica. – 2002. – Vol. 40, N 4. – P. 523–527. <https://doi.org/10.1023/a:1024339716382>
6. Wang, H. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins / H. Wang, G. Cao, R. L. Prior // J. Agric. Food Chem. – 1997. – Vol. 45, N 2. – P. 304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
7. Chalker-Scott, L. Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues? / L. Chalker-Scott // Adv. Bot. Res. – 2002. – Vol. 37. – P. 103–127. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(02\)37046-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)37046-0)
8. Chalker-Scott, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses / L. Chalker-Scott // Photochem. Photobiol. – 1999. – Vol. 70, N 1. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x>
9. Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings / Y. Zhang [et al.] // J. Plant Physiol. – 2011. – Vol. 168, N 4. – P. 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.025>
10. Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits / M. T. Sanchez-Ballesta [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, N 7. – P. 2726–2731. <https://doi.org/10.1021/jf991141r>
11. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* / E. Schulz [et al.] // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6, N 1. – P. 34027. <https://doi.org/10.1038/srep34027>
12. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапиролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 413 с.
13. 5-Aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples / L. Xie [et al.] // Plant Growth Regul. – 2013. – Vol. 69, N 3. – P. 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9772-5>

14. The mechanism analysis of anthocyanin accumulation in peach accelerated by ALA / L. Guo [et al.] // *Acta Hort. Sinica*. – 2013. – Vol. 40, N 6. – P. 1043–1050.
15. Effects of bagging and exogenous 5-aminolevulinic acid treatment on coloration of ‘Yunhongli 2’ / C. C. Xiao [et al.] // *Nanjing Agricult. Univ.* – 2012. – Vol. 35. – P. 25–29.
16. 5-Aminolevulinic acid affects fruit coloration, growth, and nutrition quality of Litchi chinensis Sonn. cv. Feizixiao in Hainan, tropical China / S. Feng [et al.] // *Sci. Hort.* – 2015. – Vol. 193. – P. 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.010>
17. Effects of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of *Ginkgo biloba* / F. Xu [et al.] // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. – 2011. – Vol. 39, N 1. – P. 41–47. <https://doi.org/10.15835/nbha3915880>
18. Молекулярно-генетические механизмы регуляции дигидрофлавонол редуктазы и транскрипционного фактора HУ5 экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках озимого рапса / Н. Г. Аверина [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 317–324.
19. Himi, E. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat / E. Himi, A. Nisar, K. Noda // *Genome*. – 2005. – Vol. 48, N 4. – P. 747–754. <https://doi.org/10.1139/g05-026>
20. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений / В. Ф. Аджиева [и др.] // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 5. – С. 561–573.
21. Shoeva, O. Y. The specific features of anthocyanin biosynthesis regulation in wheat / O. Y. Shoeva, E. K. Khlestkina // *Advances in wheat genetics: from genome to field : proc. of 12th Int. wheat genetics symp.* / ed. : Y. Ogiwara, S. Takumi, H. Handa. – Tokyo, 2015. – P. 147–157.
22. Shoeva, O. Y. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings against cadmium stress / O. Y. Shoeva, E. K. Khlestkina // *Cereal Res. Comm.* – 2018. – Vol. 46, N 2. – P. 242–252. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.070>
23. Relationship between anthocyanin biosynthesis and abiotic stress in wheat / O. Y. Tereshchenko [et al.] // *Proceedings of the 15th EWAC conference, November 7–11, 2011, Novi Sad, Serbia* / ed. : A. Börner, B. Kobijlski. – Novi Sad, 2011. – P. 72–75.
24. Anthocyanins participate in protection of wheat seedlings from osmotic stress / O. Y. Shoeva [et al.] // *Cereal Res. Comm.* – 2017. – Vol. 45, N 1. – P. 47–56. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.044>
25. Bogdanova, E. D. Resistance of common wheat to bunt / E. D. Bogdanova, A. T. Sarbaev, K. K. Makhmudova // *Proceedings of the Research Conference on Genetics*. – Moscow, 2002. – P. 43–44.
26. Mabry, T. J. The systematic identification of flavonoids / T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas. – Berlin : Springer, 1970. – 354 p.
27. Misra N., Gupta A. K. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram / N. Misra, A. K. Gupta // *Plant Sci.* – 2005. – Vol. 169, N 2. – P. 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
28. Rodriguez-Amaya, D. B. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis / D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. – Washington : HarvestPlus, 2004. – 63 p.
29. Weinstein, J. D. Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis* / J. D. Weinstein, S. I. Beale // *J. Biol. Chem.* – 1983. – Vol. 258, N 11. – P. 6799–6807. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)32293-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)32293-2)
30. Кузнецов, Вл. В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / Вл. В. Кузнецов, Н. И. Шевякова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321–336.
31. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance / P. V. K. Kishor [et al.] // *Curr. Sci.* – 2005. – Vol. 88, N 3. – P. 424–438.
32. Индукция накопления антоцианов и состояние защитной системы в растениях озимого рапса, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой / Н. Г. Аверина [и др.] // Физиология растений. – 2017. – Т. 64, № 3. – С. 173–182.
33. The genomes uncoupled – dependent signaling pathway coordinates plastid biogenesis with the synthesis of anthocyanins / A. S. Richter [et al.] // *Phil. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 375, N 1801. – Art. ID 20190403. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0403>

References

1. Peer W. A., Murphy A. S. Flavonoids as signal molecules: targets of flavonoid action. *The Science of Flavonoids*. New York, 2008, pp. 239–268.
2. Feild T. S., Lee D. W., Holbrook N. M. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology*, 2001, vol. 127, no. 2, pp. 566–574. <https://doi.org/10.1104/pp.010063>
3. Giusti M. M., Rodriguez-Saona L. E., Wrolstad R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no. 11, pp. 4631–4637. <https://doi.org/10.1021/jf981271k>
4. Shi M. Z., Xie D. Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Patents on Biotechnology*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 47–60. <https://doi.org/10.2174/1872208307666131218123538>
5. Zhao H. J., Zou Q. Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress. *Photosynthetica*, 2002, vol. 40, no. 4, pp. 523–527. <https://doi.org/10.1023/a:1024339716382>

6. Wang H., Cao G., Prior R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, vol. 45, no. 2, pp. 304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
7. Chalker-Scott L. Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues? *Advances in Botanical Research*, 2002, vol. 37, pp. 103–127. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(02\)37046-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)37046-0)
8. Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, vol. 70, no. 1, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x>
9. Zhang Y., Zheng S., Liu Z., Wang L., Bi Y. Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 2011, vol. 168, no. 4, pp. 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.025>
10. Sanchez-Ballesta M. T., Zacarias L., Granell A., Lafuente M. T. Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, no. 7, pp. 2726–2731. <https://doi.org/10.1021/jf991141r>
11. Schulz E., Tohge T., Zuther E., Fernie A. R., Hinch D. K. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no. 1, p. 34027. <https://doi.org/10.1038/srep34027>
12. Averina N. G., Yaronkaya E. B. *Tetrapyrroles biosynthesis in plants*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2012. 413 p. (in Russian).
13. Xie L., Wang Z. H., Cheng X. H., Gao J. J., Zhang Z. P., Wang L. 5-Aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples. *Plant Growth Regulation*, 2013, vol. 69, pp. 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9772-5>
14. Guo L., Cai Z. X., Zhang B. B., Xu J. L., Song H. F., Ma R. J. The mechanism analysis of anthocyanin accumulation in peach accelerated by ALA. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, vol. 40, no. 6, pp. 1043–1050.
15. Xiao C. C., Zhang S. L., Hu H. J., Tian R., Wu J., Yang Z. J. Effects of bagging and exogenous 5-aminolevulinic acid treatment on coloration of ‘Yunhongli 2’. *Nanjing Agricultural University*, 2012, vol. 35, pp. 25–29.
16. Feng S., Li M. F., Wu F., Li W. L., Li S. P. 5-Aminolevulinic acid affects fruit coloration, growth, and nutrition quality of Litchi chinensis Sonn. cv. Feizixiao in Hainan, tropical China. *Scientia Horticulturae*, 2015, vol. 193, pp. 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.010>
17. Xu F., Cheng S. Y., Zhu J., Zhang W., Wang Y. Effects of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of *Ginkgo biloba*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2011, vol. 39, no. 1, pp. 41–47. <https://doi.org/10.15835/nbha3915880>
18. Averina N. G., Emel’yanova A. V., Kalyaga T. G., Savina S. M. Molecular mechanisms of regulation of dihydroflavonol reductase and HY5 transcription factor by exogenous 5-aminolevulinic acid in winter rape seedlings. *Doklady Natsional’noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 3, pp. 317–324 (in Russian).
19. Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Genome*, 2005, vol. 48, no. 4, pp. 747–754. <https://doi.org/10.1139/g05-026>
20. Adzhieva V. F., Babak O. G., Shoeva O. Yu., Kil’chevskii A. V., Khlestkina E. K. Molecular genetic mechanisms of the formation of the color of fruits and seeds of plants. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov journal of genetics and breeding], 2015, vol. 19, no. 5, pp. 561–573 (in Russian).
21. Shoeva O. Y., Khlestkina E. K. The specific features of anthocyanin biosynthesis regulation in wheat. *Advances in wheat genetics: from genome to field: Proceedings of the 12th International wheat genetics symposium*. Tokyo, 2015, pp. 147–157.
22. Shoeva O. Y., Khlestkina E. K. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings against cadmium stress. *Cereal Research Communications*, 2018, vol. 46, no. 2, pp. 242–252. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.070>
23. Tereshchenko O. Y., Khlestkina E. K., Gordeeva E. I., Arbutzova V. S., Salina E. A. Relationship between anthocyanin biosynthesis and abiotic stress in wheat. *Proceedings of the 15th EWAC conference, November 7–11, 2011, Novi Sad, Serbia*. Novi Sad, 2011, pp. 72–75.
24. Shoeva O. Y., Gordeeva E. I., Arbutzova V. S., Khlestkina E. K. Anthocyanins participate in protection of wheat seedlings from osmotic stress. *Cereal Research Communications*, 2017, vol. 45, no. 1, pp. 47–56. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.044>
25. Bogdanova E. D., Sarbaev A. T., Makhmudova K. K. Resistance of common wheat to bunt. *Proceedings of the research conference on genetics*. Moscow, 2002, pp. 43–44.
26. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Springer Publ., 1970. 354 p.
27. Misra N., Gupta A. K. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Science*, 2005, vol. 169, no. 2, pp. 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
28. Rodriguez-Amaya D. B., Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington, HarvestPlus, 2004. 63 p.
29. Weinstein J. D., Beale Weinstein S. I. Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, vol. 258, no. 11, pp. 6799–6807. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)32293-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)32293-2)
30. Kuznetsov V. I., Shevyakova N. I. Proline under stress: biological role, metabolism, regulation. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 1999, vol. 46, no. 2, pp. 321–336 (in Russian).
31. Kavi Kishor P. B., Sangam S., Amrutha R. N., Sri Laxmi P., Naidu K. R., Rao K. R., Rao S., Reddy K. J., Theriappan P., Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 2005, vol. 88, no. 3, pp. 424–438.

32. Averina N. G., Shcherbakov R. A., Emel'yanova A. V., Domanskaya I. N., Usatov A. V. Induction of anthocyanin accumulation and the state of the protective system in winter rapeseed plants treated with 5-aminolevulinic acid. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 2017, vol. 64, pp. 1–10 (in Russian).

33. Richter A. S., Tohge T., Femie A. R., Grimm B. The genomes uncoupled – dependent signaling pathway coordinates plastid biogenesis with the synthesis of anthocyanins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2020, vol. 375, no. 1801, art. ID 20190403. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0403>

Информация об авторах

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

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

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

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

Прищепчик Юлия Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliya_prishchepchik@mail.ru

Усатов Александр Вячеславович – д-р биол. наук, профессор. Южный федеральный университет (ул. Большая Садовая, 105/42, Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: usatova@mail.ru

Information about the authors

Natalia G. Averina – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: averina_ng@tyt.by

Sviatlana M. Savina – 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: svetlanapavluchkova@yandex.ru

Irina A. Dremuk – 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: irinadremuk@yandex.ru

Hanna V. Yemelyanova – 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: yashchuk.anna@mail.ru

Yuliya V. Prishchepchik – 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: yuliya_prishchepchik@mail.ru

Alexandr V. Usatov – D. Sc. (Biol.), Professor. Southern Federal University (105/42, Bolshaya Sadovaya Str., Rostov-on-Don, Russian Federation). E-mail: usatova@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 581.4:581.19
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-147-157>

Поступила в редакцию 15.12.2022
Received 15.12.2022

О. В. Чижик, А. Н. Юхимук, В. Н. Решетников

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ГОЛУБИКА ВЫСОКАЯ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.): ПРОТЕОМНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аннотация. Результаты интродукции представителей сем. Вересковые (*Ericaceae* Juss.), начатой Центральным ботаническим садом НАН Беларуси в 1980 г. в Белорусском Полесье, дали начало новому для республики направлению – промышленному ягодоводству.

Для повышения эффективности получения качественного посадочного материала необходимо изучить фундаментальные процессы, лежащие в основе роста и развития растений и установить возможные пути их регуляции. Также крайне актуальными являются исследования, направленные на подтверждение сортосоответствия посадочного материала заявленному сорту (разработка генетических паспортов). Развитие биотехнологии способствует появлению новых подходов к исследованиям, переходу к новым технологиям изучения и анализа генома и протеома растительного организма.

Впервые для представителя *Vaccinium corymbosum* L. (голубики высокой) проведена молекулярно-генетическая идентификация и разработаны генетические паспорта с использованием маркерной системы SCoT (Start Codon Targeted). Предложенный метод ДНК-паспортизации обеспечивает возможность проверки сортосоответствия посадочного материала.

Методом 2D-электрофореза впервые получены протеомные карты листовой ткани и дана оценка протеомного статуса растений четырех сортов голубики высокой – *in vitro* культуры и исходных растений (*in vivo*). Установлена видо- и сортоспецифичность продуктов экспрессированного генома исследуемых растений. Впервые определены белки, претендующие на роль маркерных для вида *Vaccinium corymbosum* L., а также белки-маркеры сортовой принадлежности и физиологического состояния голубики высокой, культивируемой *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: голубика высокая, молекулярно-генетическая идентификация, ДНК-маркирование, SCoT, протеомный анализ, 2D-электрофорез, белки-маркеры

Для цитирования: Чижик, О. В. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.): протеомные и молекулярно-генетические исследования / О. В. Чижик, А. Н. Юхимук, В. Н. Решетников // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 147–157. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-147-157>

Olga V. Chizhik, Andrei N. Yukhimuk, Vladimir N. Reshetnikov

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

HIGHBUSH BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.): PROTEOMIC AND MOLECULAR GENETIC STUDIES

Abstract. The Vacciniaceae family introduction carry out by the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus since 1980. It made it possible to give rise the new direction for the republic – the industrial berry growing.

To increase the efficiency of high-quality planting material obtaining it is necessary to study the fundamental processes underlying the growth and development of plants and to establish the possible ways of their regulation. It is of current interest to confirm the conformity of the planting material to the declared variety (the genetic passports elaboration). The biotechnology development promotes a new approaches and technologies for studying and analyzing of a plant organism genome and proteome.

For the first time the molecular genetic identification for *Vaccinium corymbosum* L. varieties were carried out by Start Codon Targeted (SCoT) system. This method of DNA certification makes it possible to check the cultivar conformity of the blueberry planting material.

For the first time by 2D electrophoresis the proteomic maps of leaf tissue were obtained and the proteomic status of four highbush blueberry varieties – *in vitro* culture and parental plants (*in vivo*) was estimated. The species and varieties specificity of the expressed genome products were established. The proteins that claims to be markers for the *Vaccinium* species and the variety markers were identified for the first time, as well as the physiological state markers of high blueberry cultivated *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: high bush blueberry, molecular genetic identification, DNA marking, SCoT primers, proteomic analysis, 2-D electrophoresis, marker proteins

For citation: Chizhik O. V., Yukhimuk A. N., Reshetnikov V. N. Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.): proteomic and molecular genetic studies. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 147–157 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-147-157>

Введение. Для удовлетворения высокого спроса населения в качественных продуктах здорового питания необходимо внедрение новых источников витаминной плодово-ягодной продукции и лекарственного сырья. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – ягодная культура, ценность которой определяется содержанием широкого спектра биологически активных веществ, гипоаллергенностью и прекрасными вкусовыми качествами ягод [1, 2].

Результаты интродукции клюквы крупноплодной, голубики высокорослой и брусники обыкновенной, начатой Центральным ботаническим садом (ЦБС) НАН Беларуси в 1980 г. в Белорусском Полесье, дали начало новому для республики направлению – промышленному нетрадиционному ягодоводству [3].

Для повышения эффективности получения качественного посадочного материала необходимо изучить фундаментальные процессы, лежащие в основе роста и развития растений и установить возможные пути их регуляции. Также крайне актуальными являются исследования, направленные на подтверждение сортоответствия посадочного материала заявленному сорту (разработка генетических паспортов).

Развитие биотехнологии способствует появлению новых подходов к исследованиям, переходу к новым технологиям изучения и анализа генома и протеома растительного организма. Современные аналитические способы исследования специфичности биологических макромолекул позволяют на принципиально новой основе решить проблему идентификации генотипов, а также ряд вопросов, касающихся охраны прав собственности на селекционные достижения, сохранения и реализации сортов, контроля безопасности материала (наличие патогенов) и т. п. В дополнение к традиционным подходам (паспортизации на основе морфолого-физиологических признаков) успешно разрабатываются целые направления с использованием биохимических и молекулярных маркеров – белков и нуклеиновых кислот. Использование молекулярных маркеров, основанных на полиморфизме фрагментов белков и ДНК, позволяет успешно решать целый ряд задач фундаментального и прикладного характера, в том числе создавать новые тест-системы для анализа генетического полиморфизма, расширяя возможности направленной селекции растений.

Известно, что ключевым этапом реализации наследственной информации является биосинтез белков, гетерогенность и специфичность которых определяют ход метаболизма и онтогенетическое развитие организма. Следовательно, на протяжении жизненного цикла растений появляются группы белков и отдельные белки, которые функционально, количественно и качественно ответственны за определенный этап развития и/или за ответную реакцию на воздействие внешних факторов. Определение таких белков дает возможность использовать их как тест для оценки состояния организма, а в отдельных случаях – как непосредственную мишень регуляторного воздействия.

Цель работы – проведение ДНК-идентификации (паспортизации) представителя семейства *Ericaceae* Juss. (голубики высокой), оценка протеомного статуса, установление функциональных особенностей продуктов экспрессированного генома и сравнительная молекулярно-биологическая характеристика исходных растений (*in vivo*) и растений *in vitro*. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: провести молекулярное маркирование исследуемых растений с помощью ПЦР-техники, получить протеомные карты и определить биохимические маркеры, отражающие стадии развития голубики.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись растения голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) хозяйственно ценных интродуцированных сортов, полученные методом *in vitro*, и растения открытого грунта (*in vivo*) из маточника голубики отраслевой лаборатории интродукции и технологии ягодных растений (ЦБС, г. Ганцевичи). В исследовании использованы 5 сортов голубики высокой, в том числе включенных в Госреестр РБ: Atlantic, Concord, Bluecrop, Elizabeth, Weymouth.

Обезвоженную в силикагеле листовую ткань предварительно гомогенизировали. Препараты тотальной ДНК из исследуемых образцов получали методом СТАВ-экстракции [4] в нашей модификации. Качественный и количественный анализ полученных препаратов ДНК проводили спектрофотометрическим методом. Полученные препараты тотальной ДНК соответствовали предъявляемым к качеству требованиям: $R_{260/280} - 1,7-1,9$; $R_{260/230} - 1,7-2,2$. Все полученные препараты тотальной ДНК включены в ДНК-банк отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси.

Маркирование тотальной ДНК осуществляли с использованием техники полимеразной цепной реакции (ПЦР) и системы SCoT (Start Codon Targeted) – маркирующей участки ДНК однопраймерной мультилокусной системы, которая ассоциирована с короткими консервативными участками ДНК, фланкирующими стартовый кодон в генах растений [5–7]. В исследование был включен базовый набор из 36 SCoT-праймеров, протестированных на предмет получения высокополиморфных воспроизводимых маркеров.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала следующие компоненты: 1×реакционный буфер, содержащий 2 mM $MgCl_2$ («Евроген», Россия), 0,2 mM dNTPs («Евроген», Россия), 20 mM SCoT-праймера («Праймтех», Беларусь), 1 ед. HS Taq-полимеразы и 30 нг геномной ДНК. ПЦР проводили в термоциклере SureCyler 8800 (Agilent), протокол состоял из следующих этапов: начальной денатурации при 95 °C в течение 3 мин (30 циклов, последовательно включающих денатурацию при 95 °C в течение 30 с, отжиг праймеров (T_m) в течение 30 с, элонгацию при 72 °C в течение 2 мин) и финальной элонгации при 72 °C в течение 10 мин. T_m праймеров определялась нуклеотидной последовательностью праймера и составом реакционного буфера.

Продукты амплификации разделяли посредством горизонтального электрофореза в агарозных гелях (1,2 % Agarose, 1×TAE), предварительно окрашенных бромидом этидия до рабочей концентрации 1 мкг/мл, и визуализировали на приборе VersaDoc MP4000 (Bio-Rad, США). Длину фрагментов в парах нуклеотидов (п. н.) рассчитывали с использованием программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad) на основе сравнения с маркерами молекулярного веса 100 и 1000 п. н. («Праймтех», Беларусь).

Для проведения молекулярно-генетической идентификации исследуемых образцов сортового материала голубики были отобраны 7 SCoT-праймеров, обладающих достаточным полиморфизмом и воспроизводимой амплификационной активностью (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Список SCoT-праймеров, отобранных для генотипирования сортов *V. corymbosum*

Table 1. SCoT primers list selected for genotyping *V. corymbosum* cultivars

Праймер	5'→3'	Nn	GC, %	T_m , °C
SCoT-18	ACCATGGCTACCACCGCC	18	67	60,8
SCoT-19	ACCATGGCTACCACCGGC	18	67	60,8
SCoT-22	AACCATGGCTACCACCAC	18	56	56,3
SCoT-28	CCATGGCTACCACCGCCA	18	67	60,8
SCoT-29	CCATGGCTACCACCGGCC	18	72	62,9
SCoT-31	CCATGGCTACCACCGCCT	18	67	60,8
SCoT-35	CATGGCTACCACCGGCC	18	72	62,9

П р и м е ч а н и е. Nn – количество нуклеотидов в праймере, GC – соотношение гуаниновых и цитозинового оснований.

Все использованные праймеры генерировали четкие воспроизводимые маркеры, набор которых для каждого сорта голубики характеризовался выраженной индивидуальностью (рис. 1).

Общую фракцию клеточных белков из листовой ткани получали методом ТХУ/ацетоновой преципитации по Amme [8] в нашей модификации. При подготовке опытных образцов к 2D-электрофорезу к сухому осадку белка добавляли DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) и инкубировали в течение 45 мин при +4 °C, затем центрифугировали. Супернатант очищали

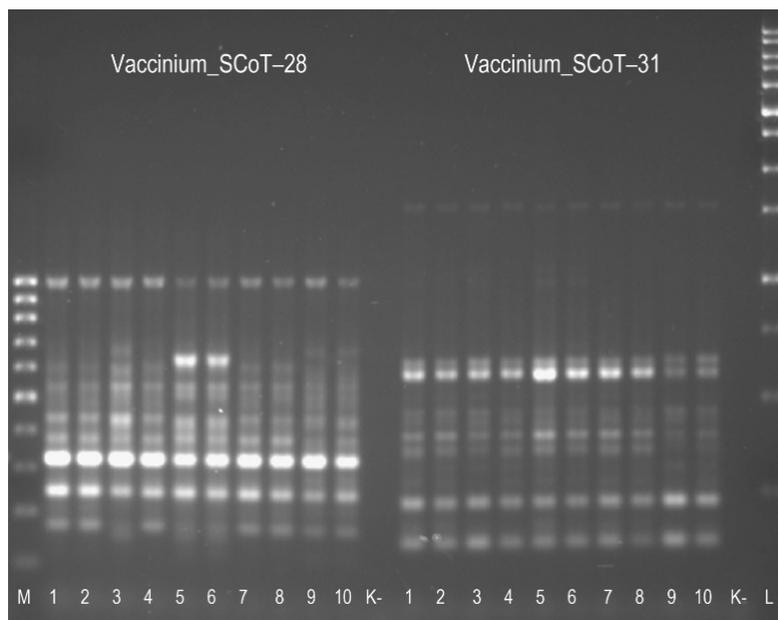


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации тотальной ДНК сортов *V. corymbosum* L. с праймерами SCoT-28 и SCoT-31: 1 – *Atlantic_vv*, 2 – *Atlantic_vt*, 3 – *Concord_vv*, 4 – *Concord_vt*, 5 – *Bluecrop_vv*, 6 – *Bluecrop_vt*, 7 – *Elizabeth_vv*, 8 – *Elizabeth_vt*, 9 – *Weymouth_vv*, 10 – *Weymouth_vt*; К – отрицательный контроль; М – размерный стандарт 100 bp, L – размерный стандарт 1 Kb; vv – *in vivo*, vt – *in vitro*

Fig. 1. Electrophoretic separation of amplification products of total DNA of *V. corymbosum* L. cultivars with primers SCoT-28 and SCoT-31: 1 – *Atlantic_vv*, 2 – *Atlantic_vt*, 3 – *Concord_vv*, 4 – *Concord_vt*, 5 – *Bluecrop_vv*, 6 – *Bluecrop_vt*, 7 – *Elizabeth_vv*, 8 – *Elizabeth_vt*, 9 – *Weymouth_vv*, 10 – *Weymouth_vt*; K – negative control; M – size standard 100 bp, L – size standard 1 Kb; vv – *in vivo*, vt – *in vitro*

от примесей с помощью набора реагентов 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). Очищенный и сконцентрированный белковый осадок растворяли в ReadyPrep Rehydration/Sample buffer (Bio-Rad). Количество белка в образцах определяли с помощью набора реагентов RC DC Protein Assay (Bio-Rad).

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) общей фракции клеточных белков проводили на автоматической станции Protean i12 IEF Cell (Bio-Rad) на иммобилизованных сухих стрипах (ReadyStrip™ IPG Strips pI 3-10, 11 см, Bio-Rad). После ИЭФ IPG-стрипы уравнивали с буферными системами ReadyPrep 2-D Starter Kit Equilibration Buffer (Bio-Rad). SDS-электрофорез, как второе направление 2D-электрофореза, проводили по методу Laemmli [9] на готовых гелях Criterion TGX Precast Midi Protein Gel, 13,3×8,7 см, 4–15 %, 11 см (Bio-Rad). В качестве маркера использовали Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). Гели окрашивали красителем Oriole Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad) и фотографировали с использованием системы VersaDoc (Bio-Rad). Анализ протеомных карт осуществляли с помощью специализированного программного обеспечения PDQuest 2-D Analysis Software (Bio-Rad), учитывая только хорошо различимые визуально пятна. Идентификацию белков проводили путем сравнения экспериментально рассчитанных молекулярных масс с данными, содержащимися в базе UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием компьютерной программы Statistica 7.0, изменения считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для генотипов сортов *V. corymbosum* L. максимальное количество локусов (ДНК-маркеров), равное 11, было идентифицировано с помощью праймеров SCoT-18, SCoT-19, SCoT-29 и SCoT-22, тогда как минимальное, равное 9, – с использованием праймеров SCoT-28, SCoT-31, SCoT-35. В общей сложности нами идентифицирован 71 локус (ДНК-маркер). Для каждого праймера были определены максимальное, минимальное и среднее количество маркеров, а также показатель R_p, характеризующий разрешающую способность праймера [10].

Максимальной разрешающей способностью характеризовался праймер SCoT-29 (5,6), минимальной – SCoT-31 (3,4). Из всего пула маркеров 60 являлись полиморфными. Примененная

маркерная система позволила выявить достаточно высокий уровень полиморфизма у исследуемых генотипов сортов *V. corymbosum* L., составивший в среднем 84,5 %. Максимальные его значения (100,0 %) установлены при использовании праймера SCoT-18, минимальные (72,7 %) – при использовании праймера SCoT-22.

Для каждого маркера (локуса) был рассчитан информационный индекс полиморфизма (PIC), отражающий вклад маркера в общий уровень полиморфизма [11]. Средние значения данных индексов для всех маркеров варьировались от 0,22 для праймеров SCoT-19 и SCoT-22 до 0,28 для праймера SCoT-18.

По результатам анализа 71 ДНК-маркера были определены генетические дистанции и произведена кластеризация исследуемых генотипов сортов *V. corymbosum* L. по методу присоединения соседей – *Neighbor joining*. На основании полученных данных для каждого праймера нами сконструированы отдельные дендрограммы, а также построена комплексная дендрограмма (рис. 2). За корневой таксон принята искусственная аут-группа – *artificial outgroup*; узлы, имеющие достоверную топологию (более 50 %), обозначены соответствующим значением; bootstrap-анализ составил 1000 реплик.

Комплексный анализ приведенных данных позволил уточнить топологию и генетические взаимосвязи исследуемых образцов. Так, на основании комплексной дендрограммы было установлено, что исследуемые сорта *V. corymbosum* L., за исключением сорта Concord, группируются попарно, в соответствии с сортовой принадлежностью. Растения *in vivo* голубики высокой сорта Concord совместно кластеризуются с парой сорта Bluecrop, в то время как растения, полученные методом микрклонального размножения (*in vitro*), находятся в метакластере с парами сортов Atlantic, Elizabeth и Weymouth. Подобная топология свидетельствует об определенных генетических различиях растений голубики сорта Concord, что позволяет усомниться в их сортовой принадлежности, поэтому данный таксон был исключен из дальнейших исследований.

Таким образом, проведенное мультилокусное маркирование генотипов исследуемых сортов *V. corymbosum* L. с использованием маркерной системы SCoT позволило дифференцировать все исследуемые генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из них, рассчитать генетические дистанции родства/отдаленности. На основании полученных мультилокусных ДНК-спектров для всех исследованных образцов составлены генетические паспорта, четыре из которых представлены в табл. 2.

Разработанная нами система генетических SCoT-маркеров дает возможность регистрировать генотипы сортов голубики в виде молекулярно-генетических паспортов, что позволит использовать полученные данные в маркер-сопутствующей селекции.

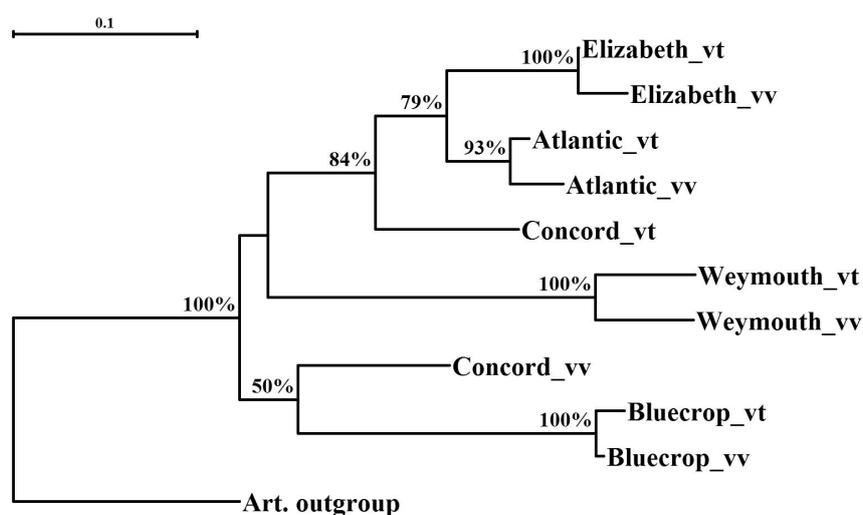


Рис. 2. Дендрограмма *Neighbor Joining*, отражающая степень генетического сходства между сортами *V. corymbosum* L., выявленного при использовании маркерной системы SCoT

Fig. 2. *Neighbor Joining* dendrogram, reflecting the degree of genetic similarity between *V. corymbosum* cultivars, identified by SCoT marker system

Т а б л и ц а 2. Молекулярно-генетические паспорта сортов *V. corymbosum*T a b l e 2. Molecular genetic passports of *V. corymbosum* varieties

Праймер	ДНК-маркеры
Bluecrop (in vivo)	
SCoT-18	SCoT18 ₆₂₇ , SCoT18 ₅₃₈ , SCoT18 ₃₉₅ , SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁ , SCoT18 ₁₇₅
SCoT-19	SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₄₇₉ , SCoT19 ₄₁₃ , SCoT19 ₃₃₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₆₁₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₁₅ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈
SCoT-31	SCoT31 ₁₀₅₅ , SCoT31 ₉₇₈ , SCoT31 ₆₁₂ , SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₄₉ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₁₀₁₇ , SCoT29 ₆₉₇ , SCoT29 ₅₆₂ , SCoT29 ₅₁₆ , SCoT29 ₄₆₁ , SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₄₅₃ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀
SCoT-22	SCoT22 ₇₇₇ , SCoT22 ₆₁₃ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₃₀₆ , SCoT22 ₂₆₉ , SCoT22 ₂₂₄
Bluecrop vt (in vitro)	
SCoT-18	SCoT18 ₆₂₇ , SCoT18 ₅₃₈ , SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁ , SCoT18 ₁₇₅
SCoT-19	SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₄₇₉ , SCoT19 ₄₁₃ , SCoT19 ₃₃₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₆₁₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₁₅ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈
SCoT-31	SCoT31 ₁₀₅₅ , SCoT31 ₉₇₈ , SCoT31 ₆₁₂ , SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₄₉ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₁₀₈₉ , SCoT29 ₁₀₁₇ , SCoT29 ₆₉₇ , SCoT29 ₅₆₂ , SCoT29 ₅₁₆ , SCoT29 ₄₆₁ , SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₄₅₃ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀
SCoT-22	SCoT22 ₇₇₇ , SCoT22 ₆₁₃ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₃₀₆ , SCoT22 ₂₆₉ , SCoT22 ₂₂₄
Elizabeth vv (in vivo)	
SCoT-18	SCoT18 ₃₃₅ , SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁
SCoT-19	SCoT19 ₈₄₀ , SCoT19 ₆₆₂ , SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₅₈₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₂₄ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈ , SCoT28 ₁₆₈
SCoT-31	SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀ , SCoT35 ₁₈₅
SCoT-22	SCoT22 ₆₄₅ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₂₈₆ , SCoT22 ₂₂₄
Elizabeth vt (in vitro)	
SCoT-18	SCoT18 ₃₂₀ , SCoT18 ₂₈₄ , SCoT18 ₂₁₁
SCoT-19	SCoT19 ₈₄₀ , SCoT19 ₆₆₂ , SCoT19 ₆₁₄ , SCoT19 ₅₆₈ , SCoT19 ₂₂₆ , SCoT19 ₁₇₅
SCoT-28	SCoT28 ₅₈₁ , SCoT28 ₅₂₉ , SCoT28 ₄₂₄ , SCoT28 ₃₇₁ , SCoT28 ₂₄₈ , SCoT28 ₁₆₈
SCoT-31	SCoT31 ₅₇₁ , SCoT31 ₄₁₄ , SCoT31 ₃₈₁ , SCoT31 ₃₄₂
SCoT-29	SCoT29 ₆₉₇ , SCoT29 ₃₆₀ , SCoT29 ₃₂₂ , SCoT29 ₂₄₀ , SCoT29 ₂₁₀
SCoT-35	SCoT35 ₉₈₃ , SCoT35 ₇₇₉ , SCoT35 ₆₅₇ , SCoT35 ₅₃₉ , SCoT35 ₃₁₄ , SCoT35 ₂₈₆ , SCoT35 ₂₂₀ , SCoT35 ₁₈₅
SCoT-22	SCoT22 ₆₄₅ , SCoT22 ₅₆₄ , SCoT22 ₄₆₄ , SCoT22 ₄₃₃ , SCoT22 ₂₈₆ , SCoT22 ₂₂₄

Несмотря на то что все клеточные структуры обладают идентичной генетической информацией, содержащейся в молекулах ДНК, в процессе развития организма данная информация считывается избирательно. Ключевым моментом в реализации наследственной информации растительного организма является биосинтез белков. Контроль за реализацией наследственной информации (включением/выключением генов) осуществляют эпигенетические механизмы, к которым относятся модификация ДНК и изменение структуры хроматина. Следует отметить, что практически все хроматин-регулирующие соединения относятся к классу белков [12, 13].

Протеомные исследования позволяют оценить влияние различных факторов на реализацию наследственной информации и составляют основу разработок современных биотехнологий. Протеомика дает возможность охарактеризовать виды растений и идентифицировать предполагаемые молекулярные маркеры не только видо- и сортоспецифичности, но и белки-маркеры функционального состояния растительного организма. Таким образом, протеомика является многообещающим подходом, который может дополнять геномику, транскриптомику и метаболомику.

Следует подчеркнуть, что до настоящего времени детального изучения протеомного статуса растений голубики высокой практически не проводилось. Исследования общего протеома голубики высокой методом 2D-электрофореза с использованием автоматической станции Protean i12 IEF Cell (Bio-Rad, США) были выполнены в нашей республике впервые.

На основе проведенных исследований были составлены протеомные карты *in vivo* и *in vitro* растений четырех сортов голубики высокой. По нашим оценкам, общий протеом листовой ткани растений данного вида насчитывает около 350 белков. Однако следует учитывать, что количество последних может быть занижено, поскольку часть белков в процессе анализа подвергается протеолизу, а при проведении ИЭФ их молекулы способны агрегироваться, что может несколько изменять количество фракций, величину молекулярной массы и значение изоэлектрической точки pI. Поэтому для определения общего количества функционально различающихся белков в наблюдаемом спектре пятен вносили поправку на изоформы, продукты протеолиза и возможные потери, обусловленные посттрансляционными модификациями [14].

Установлено, что независимо от генотипа основная масса белков на протеомных картах голубики *in vivo* и *in vitro* находится в области молекулярных масс (Мм) от 10 до 80 кДа и диапазоне pI 3,5–7,5. При этом белковые профили листовой ткани всех исследуемых образцов характеризовались высокой степенью идентичности, подтверждаемой присутствием в них сходных групп белков, являющихся, на наш взгляд, характерными для данного вида вересковых. На представленных на рис. 3 протеомных картах растений голубики *in vivo* и *in vitro* отчетливо детектируются 9 сходных по молекулярным массам белковых зон (обозначены красным маркером), представляющих собой изоформы, различающиеся значениями pI, а также отдельные белки (обозначены синим маркером) (рис. 3).

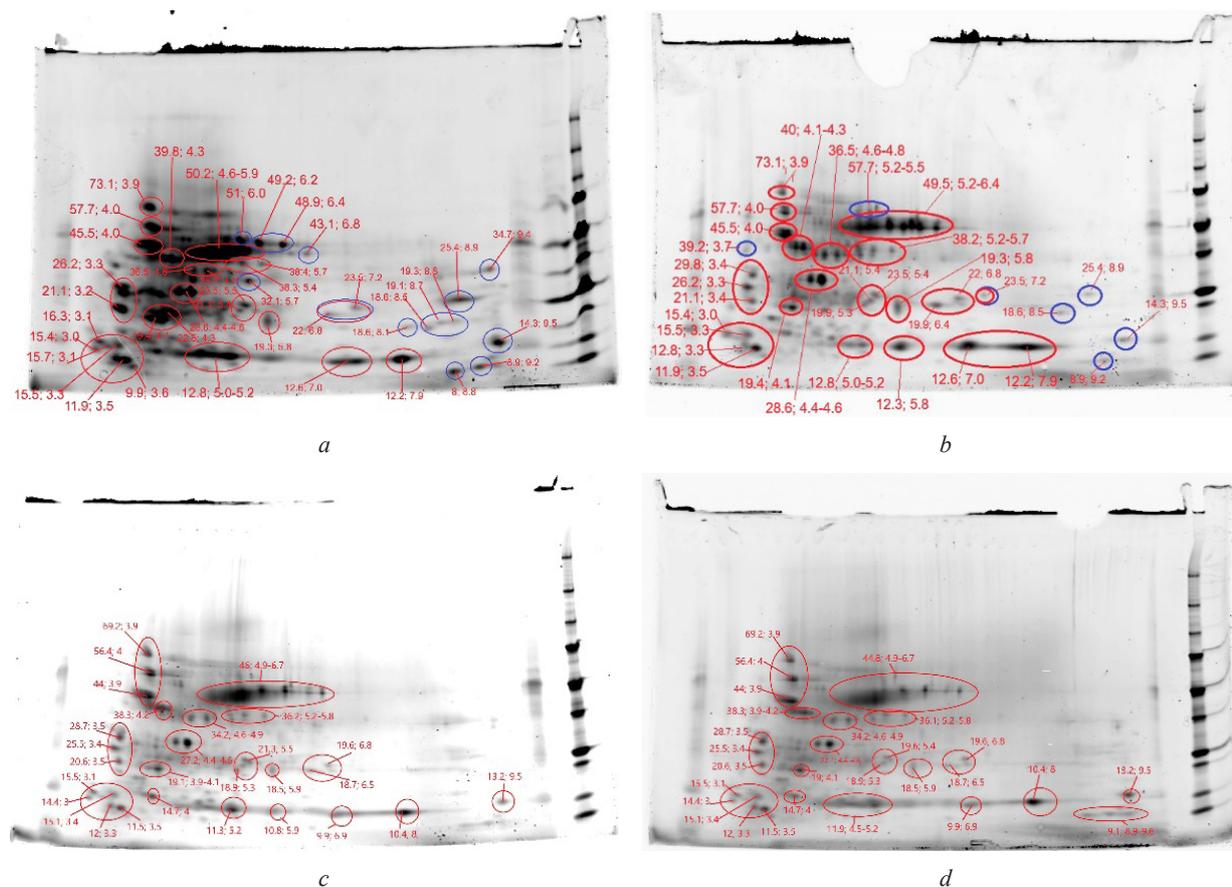


Рис. 3. Протеомные карты общего пула белков листовой ткани *V. corymbosum* L. сортов Weymouth (a – *in vivo*, b – *in vitro*) и Elizabeth (c – *in vivo*, d – *in vitro*)

Fig. 3. Proteomic maps of the total pool of proteins in the of *V. corymbosum* L. leaf tissue of Weymouth (a – *in vivo*, b – *in vitro*) and Elizabeth (c – *in vivo*, d – *in vitro*) cultivars

Сходные для всех образцов белковые зоны находились в диапазоне Мм 12–60 кДа и рI 3–5 и характеризовались следующими параметрами: 1) Мм 57,7–60,0 кДа, рI 5,2–5,5; 2) Мм 49,5–50,0 кДа, рI 5,2–5,5; 3) Мм 49,5–50,0 кДа, рI 5,2–5,5; 4) Мм 38,2–40,0 кДа, рI 4,1–6,4; 5) Мм 23,6 кДа, рI 4,4–4,6; 6) Мм 19,3–23,5 кДа, рI 4,1–7,2; 7) Мм 21,1–29,8 кДа, рI 3,4–3,7; 8) Мм 11,9–15,5 кДа, рI 3,0–3,5; 9) Мм 12,2–12,6 кДа, рI 7,0–7,9.

Дифференциально экспрессирующиеся, сходные для всех образцов голубики кислые белки имели следующие характеристики: Мм 73,1 кДа, рI 3,9; Мм 57,7 кДа, рI 4,0; Мм 45,5 кДа, рI 4,0. Предположительно, это ферменты гидроксилазы и факторы транскрипции. Данные белки могут претендовать на роль белков-маркеров вида *Vaccinium corymbosum* L.

Для выявления белков-маркеров сортовой принадлежности и функционального состояния растений голубики высокой, произрастающих в условиях открытого грунта (*in vivo*) и *in vitro*, нами проведен сравнительный анализ протеомных карт каждого сорта.

На электрофореграммах общего протеома голубики сорта Weymouth, представленных на рис. 4, были обнаружены дифференциально экспрессирующиеся белки, которые можно рассматривать в качестве белков-маркеров сортовой принадлежности, а также функционального состояния растений (отмечены синим маркером). Так, в образцах листовой ткани *in vivo* голубики высокой сорта Weymouth выявлены три полипептида – низкомолекулярные основные белки с Мм 8,9 кДа, рI 9,2 (Transcription factor T); Мм 8,8 кДа, рI 8,0 (Flavonoid 3'-hydroxylase (фрагмент)); Мм 34,7 кДа, рI 9,4 (Cyclin-dependent kinase B1), которые не экспрессируются у *in vitro* растений того же сорта. Также на протеомной карте голубики сорта Weymouth *in vivo* были обнаружены два основных белка – с Мм 14,3 кДа, рI 9,5 (Dehydrin), Мм 25,4 кДа, рI 8,9 (Glutathione S-transferase), хорошо детектируемые у исходных *in vivo* растений, но с крайне слабой экспрессией у *in vitro* образцов.

У растений голубики сорта Bluecrop *in vivo* (рис. 5) зафиксированы три низкомолекулярных основных белка – с Мм 23 кДа, рI 9; 34 кДа, рI 9; 36 кДа, рI 9 (Transcription factor, фрагменты), отсутствующие на электрофореграмме *in vitro* растений.

У голубики высокой сорта Atlantic *in vivo* на электрофореграмме общего протеома (рис. 6) обнаружены низкомолекулярные белки с Мм 20,1 кДа, рI 5,7; Мм 22,6 кДа, рI 6,7 (белки Ribulose biphosphate carboxylase large chain), отсутствующие на электрофореграмме растений, полученных методом клонального микроразмножения *in vitro*. При этом можно предположить, что белок с Мм 19,9 кДа и рI 8,0, выделенный на протеомной карте последних, является изоформой белка с Мм 22,6 кДа, рI 6,7.

Идентификация дифференциально экспрессирующихся белков проведена путем сравнения экспериментально рассчитанных молекулярных масс с данными, содержащимися базе UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Что касается сорта Elizabeth, то у данного сорта не выявлено значимых различий в протеомах растений *in vivo* и *in vitro*. Дальнейшая идентификация белков на полученных протеомных картах будет продолжена при проведении масс-спектрометрического анализа.

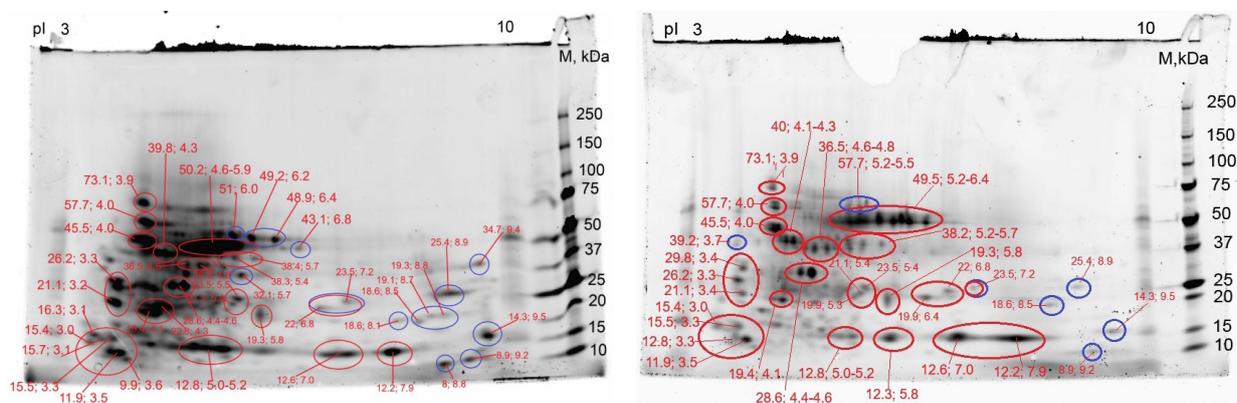


Рис. 4. Электрофореграмма *V. corymbosum* L., сорт Weymouth (a – *in vivo*, b – *in vitro*)

Fig. 4. Electrophoregram of *V. corymbosum* L., Weymouth cultivare (a – *in vivo*, b – *in vitro*)

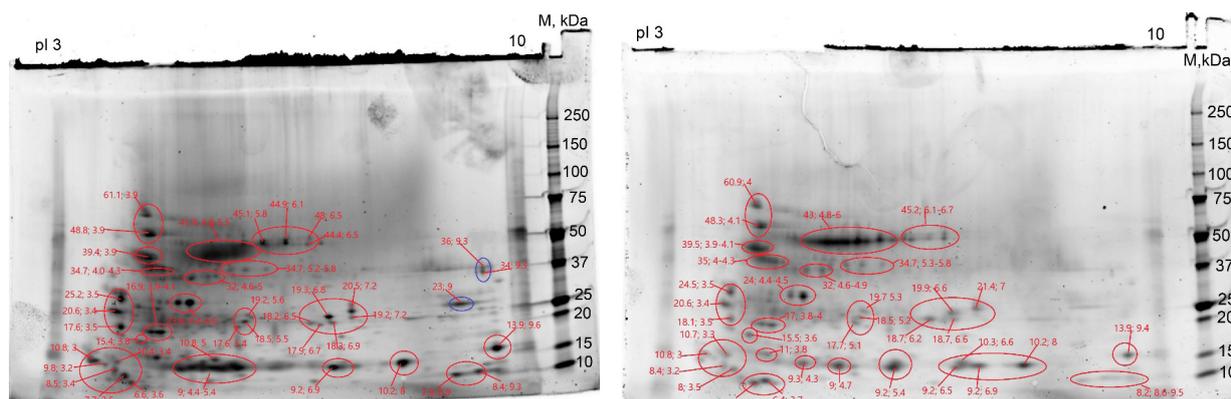


Рис. 5. Электрофореграмма *V. corymbosum* L., сорт Bluecrop (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)

Fig. 5. Electrophoregram of *V. corymbosum* L., Bluecrop cultivare (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)

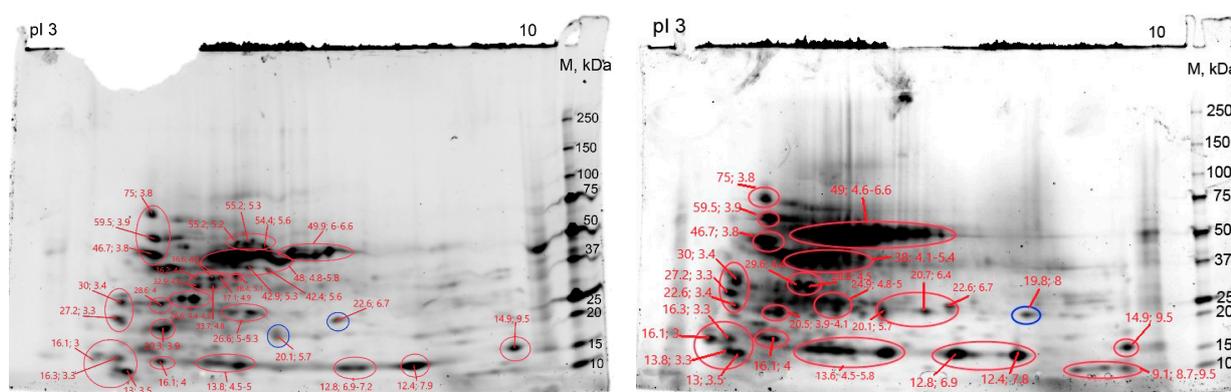


Рис. 6. Электрофореграмма *V. corymbosum* L., сорт Atlantic (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)

Fig. 6. Electrophoregram of *V. corymbosum* L., Atlantic cultivare (*a* – *in vivo*, *b* – *in vitro*)

Результаты сравнительного протеомного анализа общего пула белков листовой ткани четырех сортов голубики высокой *in vivo* и растений, полученных методом микрклонального размножения *in vitro*, показали высокую степень идентичности белковых профилей, что подтверждает стабильность и сортоотчетствие исследуемых образцов. Вместе с тем были выделены и зоны с дифференциально экспрессирующимися белками, которые могут претендовать на роль маркеров видовой и сортовой принадлежности голубики. Выявленные различия в экспрессии групп белков, являющихся в основном субъединицами окислительно-восстановительных ферментов и факторами транскрипции, могут быть обусловлены эпигенетическими воздействиями, влияющими на экспрессию определенных генов. В составе протеомов листовой ткани *in vivo* растений обнаружены дифференциально экспрессирующиеся низкомолекулярные белки (преимущественно защитные PR-белки и белки (субъединицы) патогенов), отсутствующие на протеомных картах клонированных растений. На основании этого можно сделать вывод, что с помощью метода электрофореза можно осуществлять тестирование в том числе на наличие патогенов растений голубики, которые будут рекомендованы в качестве исходного материала для тиражирования данной культуры в промышленных масштабах.

Заклучение. Проведенные нами исследования носят как фундаментальный, так и прикладной характер. Впервые проведена ДНК-идентификация с использованием маркерной системы SCoT, дана оценка протеомного статуса и определены потенциальные биохимические маркеры, отражающие видовую и сортовую принадлежность таксонов *V. corymbosum* L., а также стадии развития растений голубики высокой.

Выявленные на основании маркерной системы SCoT ДНК-маркеры могут быть использованы для создания генетических паспортов, что найдет применение при защите авторских прав,

в маркер-сопутствующей селекции растений сем. *Ericaceae* Juss., а также в сельском хозяйстве при производстве высококачественного посадочного материала, отвечающего мировым стандартам.

Составление биохимических паспортов (протеомных карт) даст возможность разработать способы определения биопродуктивности растений и позволит проводить быстрый отбор культур, перспективных для биотехнологического производства. Кроме того, использование протеомных карт может быть использовано в качестве тест-систем состояния организма на разных этапах роста и развития или как мишень регуляторного воздействия.

Полученные результаты развивают биологию ценных ягодных культур, а также научные подходы к их использованию в народном хозяйстве.

Список использованных источников

1. Phuong, H. L. Blueberry supplementation in neuronal health and protective technologies for efficient delivery of blueberry anthocyanins / H. L. Phuong, T. D. Thao // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, N 1. – Art. 102. <https://doi.org/10.3390/biom11010102>
2. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]; под ред. В. И. Парфенова. – М. : Белорус. наука, 2007. – 442 с.
3. История и результаты интродукции ягодных растений семейства *Ericaceae* в Республике Беларусь / В. В. Титок [и др.] // Опыт и перспективы выращивания нетрадиционных ягодных растений на территории Беларуси и сопредельных стран: материалы Междунар. науч.-практ. семинара (Минск–Ганцевичи, Минск, 28 сент.–1 окт. 2021 г.) / редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2021. – С. 3–14.
4. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E. L. Dempster [et al.] // *Biotechniques*. – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 66–68. <https://doi.org/10.2144/99271bm13>
5. Collard, B. C. Y. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants / B. C. Y. Collard, D. J. Mackill // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2009. – Vol. 27. – Art. 86. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>
6. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species / A. Mahjbi [et al.] // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2015. – Vol. 61. – P. 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.017>
7. Guo, D. L. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses / D. L. Guo, J. Y. Zhang, C. H. Liu // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39, N 5. – P. 5307–5313. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1329-6>
8. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes / S. Amme [et al.] // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5, N 10. – P. 2508–2518. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401274>
9. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Prevost, A. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars / A. Prevost, M. J. Wilkinson // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – Vol. 98, N 1. – P. 107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
11. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies / S. Nagy [et al.] // *Biochem. Genet.* – 2012. – Vol. 50. – P. 670–672. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
12. Chromatin remodeling in plant development / J. A. Jarillo [et al.] // *Int. J. Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 1581–1596. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072460jj>
13. Шемарова, И. В. Посттрансляционная регуляция программируемых клеточных процессов у низших эукариот / И. В. Шемарова // *Цитология*. – 2008. – Т. 50, № 8. – С. 663–670.
14. Кузовкова, А. А. Первичный протеомный анализ хлоропластов озимой ржи и методические подходы к его проведению / А. А. Кузовкова, Е. В. Спиридович, В. Н. Решетников // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2011. – Т. 43, № 2. – С. 105–112.

References

1. Phuong H. L., Thao T. D. Blueberry supplementation in neuronal health and protective technologies for efficient delivery of blueberry anthocyanins. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no. 1, art. 102. <https://doi.org/10.3390/biom11010102>
2. Rupasova Zh. A., Reshetnikov V. N., Ruban N. N., Ignatenko V. A., Yakovlev A. P., Pyatnitsa F. S. *Highbush blueberry: assessment of adaptive potential during introduction in Belarus*. Minsk, Belorusskaya nauka Publ., 2007. 442 p. (in Russian).
3. Titok V. V., Reshetnikov V. N., Volod'ko I. K., Pavlovskii N. B. History and results of the introduction of berry plants of the *Ericaceae* family in the Republic of Belarus. *Opyt i perspektivy vyrashchivaniya netraditsionnykh yagodnykh rastenii na territorii Belarusi i sopredel'nykh stran : materialy Mezhdunarodnogo nauchno-prakticheskogo seminar (Minsk–Gantsevichi, 28 sentyabrya–01 oktyabrya 2021 goda)* [Experience and prospects for growing non-traditional berry plants in Belarus and neighboring countries : materials of the International scientific and practical seminar (Minsk–Gantsevichi, September 28–October 01, 2021)]. Minsk, 2021, pp. 3–14 (in Russian).
4. Dempster E. L., Pryor K. V., Francis D., Young J. E., Rogers H. J. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *Biotechniques*, 1999, vol. 27, no. 1, pp. 66–68. <https://doi.org/10.2144/99271bm13>

5. Collard B. C. Y., Mackill D. J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, vol. 27, art. 86. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>
6. Mahjbi A., Baraket G., Oueslati A., Salhi-Hannachi A. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, vol. 61, pp. 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.017>
7. Guo D. L., Zhang J. Y., Liu C. H. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses. *Molecular Biology Reports*, 2012, vol. 39, no. 5, pp. 5307–5313. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1329-6>
8. Amme S., Rutten T., Melzer M., Sonsmann G., Vissers J., Schlesier B., Mock H.-P. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 2005, vol. 5, no. 10, pp. 2508–2518. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401274>
9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Prevost A., Wilkinson M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, vol. 98, no. 1, pp. 107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
11. Nagy S., Poczai P., Cernák I., Gorji A. M., Hegedűs G., Taller J. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 2012, vol. 50, pp. 670–672. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
12. Jarillo J. A., Piñeiro M., Cubas P., Martínez-Zapater J. M. Chromatin remodeling in plant development. *International Journal of Developmental Biology*, 2009, vol. 53, pp. 1581–1596. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072460jj>
13. Shemarova I. V. Post-translational regulation of programmed cellular processes in lower eukaryotes. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*, 2008, vol. 50, no. 8, pp. 663–670 (in Russian).
14. Kuzovkova A. A., Spiridovich E. V., Reshetnikov V. N. Primary proteomic analysis of winter rye chloroplasts and methodological approaches to its implementation. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants], 2011, vol. 43, no. 2, pp. 105–112 (in Russian).

Информация об авторах

Чижик Ольга Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: chizhikolga17@gmail.com, chizhik@cbg.org.by

Юхимук Андрей Николаевич – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.yukhimuk@gmail.com, yukhimuk@cbg.org.by

Решетников Владимир Николаевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.reshetnikov@cbg.org.by

Information about the authors

Olga V. Chizhik – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, 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: chizhikolga17@gmail.com, chizhik@cbg.org.by

Andrei N. Yukhimuk – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.yukhimuk@gmail.com, yukhimuk@cbg.org.by

Vladimir N. Reshetnikov – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616.379-008.64-074/-078.088

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-158-171>

Поступила в редакцию 05.12.2021

Received 05.12.2021

М. Л. Лущик¹, М. Д. Амелянович², А. А. Тузова¹, И. Б. Моссе², Л. И. Данилова¹

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Аннотация. В статье рассматриваются вопросы перспективности изучения полиморфных вариантов генов рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPARs) трех типов (PPAR α , PPAR δ и PPAR γ) при сахарном диабете (СД) с учетом их ключевой роли в регуляции энергетического гомеостаза, продукции провоспалительных цитокинов, контроле липидных характеристик и гликемии. Основной акцент сделан на применении методов скринингового тестирования пациентов на носительство однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) с целью совершенствования подходов к выделению групп риска формирования СД и ассоциированных заболеваний и последующей персонификации корректирующих мероприятий.

Представлены клинико-лабораторная и молекулярно-генетические характеристики групп пациентов с СД 1-го и 2-го типа, здоровых добровольцев. Изучена распространенность ОНП в генах рецепторов, активируемых PPARs, у пациентов с СД по сравнению с таковой у лиц группы контроля. Среди оцененных ОНП наиболее четкую ассоциацию с СД показал rs135551 гена *PPARA*. Выявлены 4 варианта гаплотипов, достоверно ассоциированных с СД 1-го и 2-го типа. Обсуждается целесообразность дальнейшего уточнения клинической и генетической гетерогенности случаев диабета у пациентов групп СД1 и СД2. Оценены перспективы разработки превентивных технологий в диабетологии с использованием результатов долговременных эпидемиологических молекулярно-генетических скринингов.

Ключевые слова: сахарный диабет, метаболические нарушения, молекулярно-генетические характеристики, однонуклеотидный полиморфизм, гаплотип, активируемые пероксисомным пролифератором рецепторы

Для цитирования: Молекулярно-генетические характеристики пациентов с сахарным диабетом / М. Л. Лущик [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 158–171. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-158-171>

Maxim L. Lushchyk¹, Maxim D. Ameliyanovich², Hanna A. Tuzava¹, Irma B. Mosse², Larisa I. Danilova¹

¹Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

Abstract. The article discusses the prospects for studying polymorphic variants of peroxisome proliferator-activated receptor genes (PPARs) of three types (PPAR α , PPAR δ , and PPAR γ) in diabetes mellitus (DM), taking into account their key role in the regulation of energy homeostasis, production of pro-inflammatory cytokines, and lipid characteristics and glycaemia control. The main emphasis is on the use of screening methods for testing patients for carriage of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in order to improve approaches to identifying risk groups for the formation of DM and associated diseases, and subsequent personification of corrective measures.

The clinical, laboratory and molecular genetic characteristics of groups of patients with type 1 and 2 diabetes, healthy volunteers are presented. The prevalence of SNPs in the genes of receptors activated by the peroxisome proliferator in patients with DM was studied in comparison with the control group. Among the evaluated SNPs of the rs135551 gene, *PPARA* showed the clearest association with the presence of DM. Four variants of haplotypes highly associated with DM1 and DM2 were identified. The expediency of further clarification of the clinical and genetic heterogeneity of cases of diabetes within the DM1 and DM2 groups is discussed. The prospects of this direction for the development of preventive technologies in diabetology, long-term epidemiological molecular genetic screenings are assessed.

Keywords: diabetes mellitus, metabolic disorders, molecular genetics, single nucleotide polymorphism, haplotype, peroxisome proliferator-activated receptors

For citation: Lushchyk M. L., Ameliyanovich M. D., Tuzava H. A., Mosse I. B., Danilova L. I. Molecular-genetic characteristics of patients with diabetes mellitus. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 158–171 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-158-171>

Введение. Наблюдающийся во всем мире, включая Беларусь, рост случаев сахарного диабета (СД) принимает характер пандемии, что снижает качество здоровья и жизни трудоспособного населения и способствует увеличению затрат национальных бюджетов на лечебные и реабилитационные мероприятия [1, 2].

Полногеномные ассоциированные исследования (GWAS), проведенные в разных странах в течение последних двух десятилетий, позволили верифицировать у лиц с метаболическими заболеваниями более сотни локусов, связанных с метаболическими нарушениями, но не оправдали ожиданий в отношении упрощения подходов к превенции и коррекции диабета [3, 4]. Признание целесообразности накопления клинических и молекулярно-генетических данных, наряду с дальнейшим развитием геномики и эпигеномики, определяет сохраняющийся интерес к проблеме прогнозирования и медицинской профилактики распространенных эндокринных болезней, поиску причин их омоложения и возрастания частоты ассоциированных сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Не теряет своей актуальности и поиск оптимальных подходов к оценке молекулярно-генетических рисков развития СД и его ранней превенции [5, 6].

Активно применяемый на сегодняшний день скрининг однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов позволяет определить наследственную предрасположенность не только к моногенным, но и к полигенным формам СД полифакториальной природы, что подчеркивает клиническую целесообразность совершенствования технологии определения риска развития разных вариантов эндокринных заболеваний, основанной на оценке молекулярно-генетических и клинико-лабораторных характеристик конкретного индивидуума [7].

Целью нашего исследования являлась оценка возможности и целесообразности выполнения эпидемиологического исследования для разработки критериев отбора индивидуумов, находящихся в группе риска формирования сахарного диабета, на основании молекулярно-генетического анализа в дополнение к клинико-anamnestическим прогностическим факторам.

Материалы и методы исследования. В пилотную группу был включен 241 доброволец трудоспособного возраста с диагнозом СД 1-го и 2-го типа (контрольная группа – 108 человек, группа СД1 – 42, группа СД2 – 91 человек), проживающий на территории г. Минска, Минской и Брестской областей Республики Беларусь. Исследование проводили на базе лаборатории генетики человека Института генетики и цитологии (ИГЦ) НАН Беларуси и на клинических базах кафедры эндокринологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО): УЗ «10-я городская клиническая больница г. Минска», УЗ «Минский городской эндокринологический диспансер», ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения». К обследованию приглашались лица в возрасте старше 18 лет мужского и женского пола с нормальной и избыточной массой тела, без сосудистых катастроф в анамнезе, с впервые выявленным диабетом или болеющие им не более 10 лет, давшие информированное согласие на участие в исследовании. Форма информированного согласия и программа исследования были утверждены на заседаниях комитетов по биоэтике БелМАПО и ИГЦ НАН Беларуси.

Критериями включения в группу СД1 являлась верификация диагноза СД 1-го типа в детском и молодом возрасте на фоне нормальной или сниженной массы тела, потребность в постоянной заместительной терапии препаратами инсулина в течение не менее 2 лет после постановки диагноза либо подтверждение диагноза наличием инсулиновой недостаточности и аутоантител к компонентам В-клетки (аутоантитела к глютаматдегидрогеназе-65/GAD65 и/или тирозин-фосфатазному островковому антигену-2/IA-2), наличие в анамнезе случаев кетоацидоза и гипергликемии при старте заболевания [8–10].

Критерии включения в группу СД2 соответствовали международным стандартам верификации данной патологии – критериям Международной федерации диабета (IDF) и критериям, приводимым в стандартах оказания диабетологической помощи 2019 г. Американской Диабетической Ассоциации (ADA-2019) [8]. Пациенты, вошедшие в группу СД2, были диагностированы на амбулаторно-поликлиническом этапе в соответствии со стандартами ADA-2019. Критериями исключения являлись: возраст более 60 лет, проводимая инсулинотерапия, наличие аутоантител к тирозинной пероксидазе выше отсекающего диагностического значения и/или уровень тиротропного

гормона (ТТГ) более 5,0 мМЕ/мл, наличие сонографических признаков узлового зоба или аутоиммунного тиреоидита, тяжелый соматический статус пациентов, затрудняющий анкетирование и проведение антропометрических измерений, отсутствие согласия на проведение молекулярно-генетического исследования и интерпретацию индивидуальных результатов в медицинских публикациях. Случаи сочетанных с диабетом заболеваний щитовидной железы и нарушений ее функции в данной работе не рассматривали. Этнические азиаты в исследование не вошли.

Группу СД2 составил 91 пациент с длительностью заболевания менее 10 лет, не получающий заместительной инсулинотерапии. Случаи латентного аутоиммунного диабета взрослых в данное исследование не вошли. Из пероральных глюкозокорректирующих средств применяли производные сульфонилмочевины (СМ) – гликлазид, глибенкламид, ингибиторы DPP-4 (вилдаглиптин, линаглиптин), конкурентный ингибитор натрийзависимого транспортера глюкозы 2-го типа (SGLT2) – эмпаглифлозин (6 пациентов). Согласно принятому в стране протоколу лечения, у всех пациентов с диагнозом СД2 в схеме лечения присутствовал бигуанид метформин (86 пациентов получали его в суточной дозе 2000 мг, для 5 человек доза метформина была ниже рекомендуемой из-за диспепсических явлений).

Все участники проходили клинический осмотр врачом-эндокринологом с оценкой клинических и антропометрических характеристик. Антропометрические измерения выполняли в соответствии с требованиями WHO (ВОЗ) и IDF. Рост измеряли с точностью до 0,1 см, массу тела – с точностью до 0,1 кг с помощью напольных биоимпедансных весов (анализатор состава тела) Tanita (TF-780, Japan) с анализатором процента распределения жировой ткани. Измерение окружности талии (ОТ) проводили по стандартной методике ВОЗ с точностью до 0,1 см. Артериальное давление (АД) измеряли на обеих руках в положении сидя спустя 5 мин отдыха, для анализа бралось среднее систолическое (САД) и среднее диастолическое АД (ДАД). Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле: $ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост (м)}^2$ [11].

Для исследования метаболических и гормональных показателей утром после 12-часового голодания выполняли забор крови объемом 7–9 мл в вакуумные гелевые пробирки типа «вакутайнер». Для получения сыворотки крови применяли холодовую центрифугу EVA-12R (Германия). До выполнения лабораторных исследований образцы цельной крови и сыворотки крови хранили в криостате, поддерживающем постоянную температуру ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

ТТГ, свободный тироксин (сТ4), антитела к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО) определяли с помощью наборов ELISA (DRG, США). Исследовали параметры гликемии, липидные показатели (общий холестерол (ОХ), фракции ApoA1, ApoB, триацилглицеролы (ТГ)), уровни АлАТ, АсАТ. Величины гликированного гемоглобина A1c (HbA1c) определяли с помощью прибора BIORAD (США). Ультразвуковое исследование щитовидной железы выполняли с использованием ультразвукового сканера высокого класса LogiqE (GE, США).

Оценку ИМТ производили согласно общепринятым критериям [12] ($<18,5$ – ниже нормального веса, $\geq 18,5$ – <25 – нормальный вес, ≥ 25 – <30 – избыточный вес, ≥ 30 – <35 – ожирение I степени, ≥ 35 – <40 – ожирение II степени, ≥ 40 – ожирение III степени).

По результатам клинических и лабораторных исследований были оценены антропометрические, биохимические и гормональные параметры пациентов, вошедших в контрольную и основные группы.

В дальнейшем обследованные добровольцы были разделены на три группы: 1-я – лица контрольной группы ($n = 108$); 2-я (СД1) – пациенты с СД 1-го типа ($n = 42$); 3-я (СД2) – пациенты с СД 2 типа ($n = 91$).

Исходя из целей исследования, задачей клинико-лабораторного обследования пациентов являлось подтверждение их разделения на две основные группы (пациенты с СД 1-го и 2-го типа) с учетом действующих критериев верификации данных диагнозов [8, 10]. Количество лиц, получающих липидкорректирующую терапию (статины), было сопоставимо в группах СД1 и СД2.

Группа контроля была сформирована из практически здоровых женщин и мужчин без тиреоидной патологии и нарушений тиреоидного статуса (ТТГ = 2,26 [1,67; 2,80] мМЕ/л), с нормальной массой тела или превышающей рекомендуемые величины, но при ИМТ $< 27\text{ кг/м}^2$ и отсутствии повышения процентного содержания внутреннего жира выше отсекающего значения нормы

(13 %), не имевших диагностических критериев диагноза предиабета или метаболического синдрома на момент обследования и включения в контрольную группу. Средний возраст лиц контрольной группы – 34,9 [30,2; 40,6] года. Клиническая и лабораторная характеристика обследованных лиц приведена в табл. 1. Пациенты мужского и женского пола были объединены для увеличения количества случаев в группах диабета и контроля с целью анализа молекулярно-генетических характеристик. Оценка гендерных различий в метаболических показателях при СД 1-го и 2-го типа, а также различий в приверженности пациентов разного пола самоконтролю диабета и его лечению не входили в задачи данной работы.

В ходе исследования был выполнен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК пациентов из групп наблюдения и контроля.

Выделение ДНК проводили с помощью набора «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь). Для проведения молекулярно-генетического тестирования были отобраны 12 полиморфных вариантов генов рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPARs): rs2076167, rs6902123, rs2267668, rs2016520 гена *PPARD*, rs3856806, rs1801282, rs1175543, rs709158, rs4684847 гена *PPARG*, rs2970847, rs8192678 гена *PPARGC1A*, rs135551, rs4253778 гена *PPARA*.

Генотипирование полиморфных вариантов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции с зондами TaqMan (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для детекции флуоресценции, а также для первичной обработки результатов использовали программное обеспечение CFX Manager 3.1 прибора CFX96, BIO-RAD (США).

Известно, что судить о характере возможных молекулярно-генетических и метаболических ассоциаций можно лишь на основании массовых эпидемиологических исследований с отбором лиц, которые не получают корректирующего лечения, но имеют предиабет или СД. В нашем исследовании молекулярно-генетические характеристики лиц с СД 1-го и 2-го типа, проживающих на территории Республики Беларусь, был ограничен набором добровольцев в течение достаточно короткого временного интервала, что не позволило достичь численности случаев, представленных в популяционных работах из Китая [13].

Статистический анализ выполняли с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0. С целью определения характера распределения полученных данных проводили их проверку на нормальность с помощью теста Шапиро–Уилка [14]. Анализ распределения результатов исследования показал, что часть данных имеет нормальное распределение ($p \geq 0,05$), часть – отличное от нормального ($p < 0,05$). В связи с этим были использованы методы непараметрической статистики. Для оценки центральной тенденции были использованы медиана (Me) и межквартильный интервал (q25 %; q75 %). Для анализа статистической значимости различий в двух несвязанных группах применяли критерий Манна–Уитни (критерий *U*). Влияние полиморфизмов на риск развития заболевания оценивали с помощью отношения шансов (OR) с учетом 95 %-ного доверительного интервала (95 % CI). Результаты анализа считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. *Клинико-лабораторная характеристика пациентов обследованных групп.* Метаболические и клинические показатели для диагностической характеристики лиц с СД 1-го и 2-го типа оценивали согласно действующим критериям [10] (табл. 1).

Как следует из табл. 1, превышение верхней границы нормы в содержании триацилглицеролов ($\leq 1,7$ ммоль/л) в сыворотке крови имело место у 60 % обследованных группы СД2 (2,0 [1,5; 2,6] ммоль/л), что отражало метаболические нарушения, характерные для лиц с СД 2-го типа при отсутствии достижения адекватной компенсации заболевания [15]. Нарушений тироидного статуса у пациентов всех групп не наблюдалось, что соответствовало выполнению критериев включения. Исходя из задач данного исследования, случаи сочетанной тироидной патологии и диабета не рассматривались (они проанализированы нами в другом исследовании).

Среднее содержание АлАТ в сыворотке крови обследованных всех групп находилось в пределах нормы, хотя индивидуальные величины в группах СД превышали верхние границы данного показателя у 15 из 91 пациента с СД 2-го типа. Максимальные индивидуальные значения были менее 65 ммоль/л, что не потребовало изменения схемы лечения.

Т а б л и ц а 1. Клиническая и лабораторная характеристика обследованных пациентов

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the examined patients

Показатель	Контрольная группа (n = 108)	СД 1-го типа (n = 42)	СД 2-го типа (n = 91)
Возраст, лет	34,9 [30,2; 40,6]	36,5 [30,5; 44,9]	52,9 [48,2; 56,2]
ИМТ, кг/м ²	24,6 [21,5; 27,6]	22,9 [21,2; 26,4]	31,5 [27,6; 37,9]
Холестерол, ммоль/л	4,5 [3,9; 5,0]	5,3 [4,3; 5,8]	5,2 [4,6; 5,9]
ТГ, ммоль/л	0,8 [0,6; 1,2]	1,3 [1,0; 1,7]	2,0 [1,5; 2,6]
Аро А1, г/л	1,26 [1,01; 1,36]	1,2 [1,1; 1,3]	1,2 [1,1; 1,3]
Аро В, г/л	0,67 [0,60; 0,72]	0,8 [0,7; 0,8]	1,0 [0,9; 1,3]
Аро В/Аро А1	0,56 [0,49; 0,62]	0,65 [0,63; 0,68]	0,80 [0,72; 1,04]
Глюкоза, ммоль/л	5,0 [4,5; 5,4]	13,2 [12,5; 17,8]	13,6 [9,2; 19,3]
АлАТ, Ед/л: мужчины женщины	15,1 [10,9; 18,1] 14,0 [11,6; 17,0]	16,7 [14,5; 20,4] 16,3 [13,1; 20,0]	21,8 [17,2; 26,6] 20,0 [16,0; 22,9]
АсАТ, Ед/л: мужчины женщины	19,3 [17,1; 25,0] 20,9 [17,8; 23,1]	25,7 [21,8; 29,2] 22,1 [19,5; 28,2]	28,4 [23,4; 33,8] 25,1 [20,6; 28,9]
ТТГ, мкМЕ/мл	2,3 [1,7; 2,8]	1,9 [1,3; 2,4]	2,7 [1,8; 3,3]
НbA1c, %	–	9,4 [8,4; 10,2]	9,6 [8,4; 10,5]
Инсулинотерапия	–	42/42	0/91
СМ	–	0/42	43/91
Метформин	–	4/42	91/91

У всех пациентов, включенных в группы 2 и 3, величины НbA1c были выше рекомендуемых международными стандартами оказания диабетологической помощи (7,0–7,5) [10, 15]. Так, в группе СД1 данный показатель достигал 9,4 [8,4; 10,2] %, в группе СД2 – 9,6 [8,4; 10,5] %, что свидетельствовало о неадекватном гликемическом контроле заболевания у обследованных нами добровольцев. Отсутствие рекомендуемого снижения массы тела после верификации диагноза СД 2-го типа на фоне ожирения или избыточной массы тела имело место у 35 из 47 женщин данной группы и у 39 из 44 мужчин. Случаев «беспричинного» снижения массы тела у пациентов, вошедших в данную группу, не наблюдалось, что использовало в дифференциальной диагностике типа диабета. У пациентов с СД 2-го типа (3-я группа) отмечались высокие средние величины триацилглицеролемии, гликемии и НbA1c относительно референсных нормативных значений.

В сыворотке крови пациентов группы контроля имели место оптимальные величины базальной гликемии (5,0 [4,5; 5,4] ммоль/л) и липидных параметров, что отражало критерии их включения в данную группу.

Молекулярно-генетические характеристики пациентов обследованных групп. При отборе пациентов для включения в исследование лиц с подозрением (по анамнестической и клинико-лабораторной картине) на моногенные варианты диабета не было. Учитывая полигенный и мультифакториальный генез наиболее распространенного СД 2-го типа, из известных локусов, выявленных в ходе GWAS-ассоциированных исследований, наше внимание привлекли гены рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPARs) [16, 17].

Рецепторы PPARs представляют собой подсемейство лиганд-активируемых факторов транскрипции. Они играют решающую роль в регуляции большого количества генов, которые, в свою очередь, регулируют энергетический гомеостаз, метаболизм триацилглицеролов, параметры гликемии и липопротеинов крови, липогенез *de novo*, метаболизм жирных кислот, процессы пролиферации клеток, воспаления и функции сосудистой стенки. В настоящее время выделяют три типа рецепторов – PPAR α , PPAR δ и PPAR γ [16]. Ряд используемых в диабетологии лекарственных средств реализуют свое действие именно через указанные рецепторы. Фенофибрат, применяемый для коррекции гипертриацилглицеролемии и снижения темпов формирования диабетической нейропатии, ретинопатии, нефропатии, ангиопатии, воздействует на PPAR α [16, 17]. Молекулы глитазонов реализуют свои многочисленные позитивные плейотропные эффекты через PPAR γ .

Несмотря на случаи гепатотоксичности, пиоглитазон по-прежнему входит в международные протоколы лечения СД 2-го типа, особенно в США [10, 18]. Разрабатываются воздействующие на PPAR δ молекулы, с которыми связывают большие надежды на достижение успеха в лечении ожирения и инсулинорезистентности [19–21].

В ходе исследования нами выполнен анализ образцов ДНК пациентов групп наблюдения и контроля по 12 полиморфным вариантам генов рецепторов PPARs.

Распределение генотипов исследуемых полиморфных вариантов в контрольной группе соответствовало ожидаемому равновесию Харди–Вайнберга.

Результаты генотипирования образцов ДНК лиц контрольной группы и пациентов с СД2 представлены в табл. 2.

Как следует из табл. 2, наибольшие различия между группами наблюдались для полиморфного варианта rs2267668 гена PPAR δ ($p = 0,006$). При этом в группе пациентов с СД2 не было ни одного носителя генотипа G/G, а гетерозиготные генотипы A/G встречались в 1,4 раза реже, чем в контрольной группе (20,9 и 29,6 % соответственно). Представленные в литературе исследования не выявили связи полиморфного варианта rs2267668 с риском развития СД 2-го типа, однако было показано, что у носителей минорного аллеля наблюдалось меньшее снижение объема жировой ткани в ответ на изменение образа жизни и увеличение физической активности [22]. Кроме того, имеются данные о высокой степени неравновесного сцепления с полиморфным вариантом rs2016520, который влияет на уровень транскрипции PPAR δ и, соответственно, метаболизм липопротеинов [23], а также снижает риск ожирения, которое имеет место у большинства пациентов со стартом СД 2-го типа [3, 10].

Рецепторы PPAR δ , кодируемые геном PPAR δ , экспрессируются во всех тканях. Наиболее важна их роль в катаболизме жирных кислот, создании жировых депо в адипоцитах и скелетных мышцах, контроле процессов периферической инсулинорезистентности, продукции миокинов и адипокинов. Новые разработки в клинической диабетологии учитывают, что рецептор PPAR δ снижает опосредованное макрофагами хроническое воспаление, участвует в регуляции массы тела и физической выносливости, чувствительности к инсулину, контроле метаболизма липопротеинов и триацилглицеролов [17, 24].

Наиболее существенное увеличение риска развития СД2 было отмечено нами у носителей минорных генотипов G/G полиморфных вариантов rs1175543 и rs709158 гена PPAR γ (OR = 3,47 (1,25–9,64) и OR = 3,31 (1,18–9,30) соответственно).

Известно, что рецепторы PPAR γ представлены в адипоцитах, тонком кишечнике, макрофагах и эндотелии, в меньшей степени – в скелетных мышцах, сердце, печени и др. С клинических позиций важно, что PPAR γ играют критическую роль в дифференцировке адипоцитов (увеличивают количество малых форм, менее активных в образовании провоспалительных адипокинов), создании жировых депо, перераспределении жировой ткани. Активация PPAR γ в макрофагах подавляет продукцию провоспалительных цитокинов и улучшает чувствительность к инсулину [25].

Исследование, проведенное на значительной выборке китайской популяции, выявило связь минорного генотипа rs709158 со случаями повышенного уровня холестерина ЛПНП, что рассматривалось авторами как фактор риска развития метаболических заболеваний, включая СД 2-го типа [26, 27].

Проведенный нами анализ распределения частот генотипов полиморфного варианта rs135551 гена PPAR α выявил существенное различие в протестированных группах. Частота гетерозигот A/G в группе пациентов с СД 2-го типа оказалась в 1,5 раза выше, чем в контрольной, и составила 53,9 % (OR = 2,20 (1,22–3,95)).

Основная часть представленных в литературе исследований посвящена ассоциации данного полиморфного варианта с процессами органоспецифической аутоагрессии в тироидологии. Так, Janusz Przemyslaw с соавт. [28] проанализировали роль PPARs в генезе болезни Грейвса (БГ) и аутоиммунной офтальмопатии (АИО). Было доказано, что активация данных рецепторов демонстрирует противовоспалительную и иммуномодулирующую активность. Аномальная экспрессия PPAR α и/или функция может подавлять воспалительный ответ путем прямой регуляции

генов, отвечающих за противовоспалительный ответ. Три SNP в гене *PPARα* (rs135551 (с.127 + 5148A > G), rs1800206 (с.484C > G), (Leu162Val) и rs4253766 (с.712-3784C > T)) были исследованы у 276 пациентов с БГ из Польши. Авторы обнаружили специфический гаплотип rs135551 (G)/rs1800206 (G)/rs4253766 (C), который в 3,47 раза увеличивал риск тяжелой АИО ($\chi^2 = 5,10, p = 0,02$), тогда как гаплотип rs135551 (A)/rs1800206 (G)/rs4253766 (C) значительно снижал риск серьезных глазных проявлений АИО (OR = 0,013, $\chi^2 = 4,43, p = 0,04$).

Т а б л и ц а 2. Распределение частот генотипов изученных полиморфных вариантов в группе СД2 и в контрольной группе

T a b l e 2. Frequency distribution of genotypes of the studied polymorphic variants in the DM2 group and in the control group

Ген	Полиморфизм	Генотип	Частота		OR (95 % CI)	p
			Контроль	СД2		
<i>PPARα</i>	rs2076167	T/T	65 (60,2 %)	59 (64,8 %)	1,00	0,19
		C/T	37 (34,3 %)	31 (34,1 %)	0,92 (0,51–1,67)	
		C/C	6 (5,6 %)	1 (1,1 %)	0,18 (0,02–1,57)	
	rs6902123	T/T	91 (84,3 %)	80 (87,9 %)	1,00	0,46
		C/T	16 (14,8 %)	11 (12,1 %)	0,78 (0,34–1,78)	
		C/C	1 (0,9 %)	0 (0 %)	0,00 (0,00–NA)	
	rs2267668	A/A	70 (64,8 %)	72 (79,1 %)	1,00	0,006
		A/G	32 (29,6 %)	19 (20,9 %)	0,58 (0,30–1,11)	
		G/G	6 (5,6 %)	0 (0 %)	0,00 (0,00–NA)	
	rs2016520	T/T	65 (60,2 %)	66 (73,3 %)	1,00	0,15
		C/T	41 (38 %)	23 (25,6 %)	0,55 (0,30–1,02)	
		C/C	2 (1,8 %)	1 (1,1 %)	0,49 (0,04–5,56)	
<i>PPARγ</i>	rs3856806	C/C	86 (79,6 %)	72 (80 %)	1,00	0,68
		C/T	19 (17,6 %)	17 (18,9 %)	1,07 (0,52–2,21)	
		T/T	3 (2,8 %)	1 (1,1 %)	0,40 (0,04–3,91)	
	rs1801282	C/C	77 (72 %)	67 (73,6 %)	1,00	0,7
		G/C	29 (27,1 %)	22 (24,2 %)	0,87 (0,46–1,66)	
		G/G	1 (0,9 %)	2 (2,2 %)	2,30 (0,20–25,92)	
	rs1175543	A/A	61 (56,5 %)	44 (48,4 %)	1,00	0,041
		A/G	41 (38 %)	32 (35,2 %)	1,08 (0,59–1,98)	
		G/G	6 (5,6 %)	15 (16,5 %)	3,47 (1,25–9,64)	
	rs709158	A/A	61 (56,5 %)	43 (47,2 %)	1,00	0,06
		A/G	41 (38 %)	34 (37,4 %)	1,18 (0,65–2,14)	
		G/G	6 (5,6 %)	14 (15,4 %)	3,31 (1,18–9,30)	
	rs4684847	C/C	81 (75 %)	66 (73,3 %)	1,00	0,75
		C/T	26 (24,1 %)	22 (24,4 %)	1,04 (0,54–2,00)	
		T/T	1 (0,9 %)	2 (2,2 %)	2,45 (0,22–27,67)	
<i>PPARγC1A</i>	rs2970847	C/C	77 (71,3 %)	66 (74,2 %)	1,00	0,86
		C/T	26 (24,1 %)	20 (22,5 %)	0,90 (0,46–1,75)	
		T/T	5 (4,6 %)	3 (3,4 %)	0,70 (0,16–3,04)	
	rs8192678	G/G	53 (49,1 %)	39 (43,3 %)	1,00	0,11
		A/G	42 (38,9 %)	46 (51,1 %)	1,49 (0,83–2,68)	
		A/A	13 (12 %)	5 (5,6 %)	0,52 (0,17–1,59)	
<i>PPARα</i>	rs135551	G/G	63 (58,3 %)	36 (39,6 %)	1,00	0,028
		A/G	39 (36,1 %)	49 (53,9 %)	2,20 (1,22–3,95)	
		A/A	6 (5,6 %)	6 (6,6 %)	1,75 (0,53–5,83)	

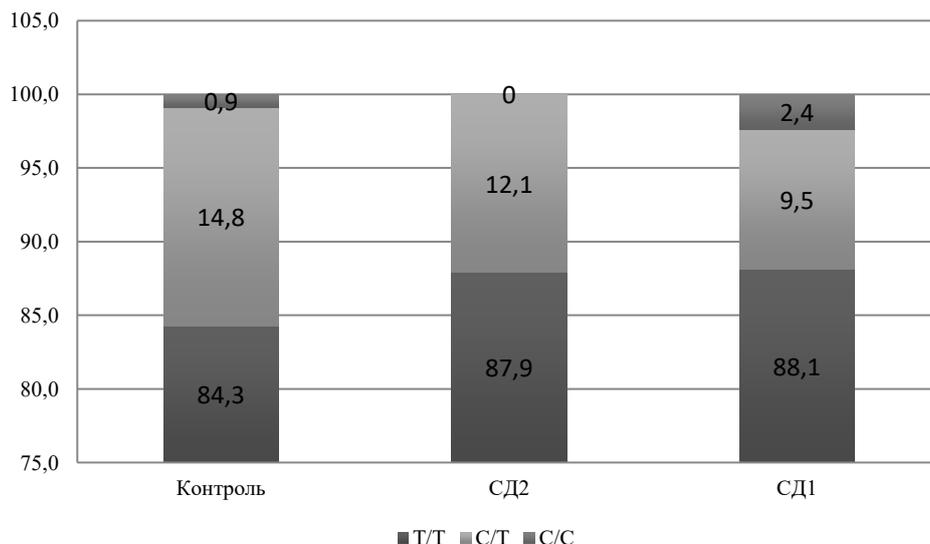
В табл. 3 представлены результаты генотипирования группы пациентов с СД1 в сравнении с лицами контрольной группой.

Как следует из табл. 3, наиболее значимые различия наблюдались в распределении частот генотипов полиморфных вариантов rs2267668 и rs2016520 гена *PPARD*. Полученные нами данные указывают на протекторный эффект гетерозиготного генотипа данных полиморфизмов (OR = 0,44 (0,18–1,09) и OR = 0,32 (0,13–0,78) соответственно), при этом минорных гомозигот в группе пациентов с СД1 не обнаружено.

Т а б л и ц а 3. Распределение частот генотипов изученных полиморфных вариантов в группе лиц с СД1 и в контрольной группе

Table 3. Frequency distribution of genotypes of the studied polymorphic variants in the group of persons with DM1 and in the control group

Ген	Полиморфизм	Генотип	Частота		OR (95 % CI)	p
			Контроль	СД1		
<i>PPARD</i>	rs2076167	T/T	65 (60,2 %)	30 (71,4 %)	1,00	0,37
		C/T	37 (34,3 %)	11 (26,2 %)	0,64 (0,29–1,43)	
		C/C	6 (5,6 %)	1 (2,4 %)	0,36 (0,04–3,13)	
	rs6902123	T/T	91 (84,3 %)	37 (88,1 %)	1,00	0,56
		C/T	16 (14,8 %)	4 (9,5 %)	0,61 (0,19–1,96)	
		C/C	1 (0,9 %)	1 (2,4 %)	2,46 (0,15–40,37)	
	rs2267668	A/A	70 (64,8 %)	35 (83,3 %)	1,00	0,023
		A/G	32 (29,6 %)	7 (16,7 %)	0,44 (0,18–1,09)	
		G/G	6 (5,6 %)	0 (0 %)	0,00 (0,00–NA)	
	rs2016520	T/T	65 (60,2 %)	35 (83,3 %)	1,00	0,014
		C/T	41 (38 %)	7 (16,7 %)	0,32 (0,13–0,78)	
		C/C	2 (1,8 %)	0 (0 %)	0,00 (0,00–NA)	
<i>PPARG</i>	rs3856806	C/C	86 (79,6 %)	30 (76,9 %)	1,00	0,8
		C/T	19 (17,6 %)	7 (17,9 %)	1,06 (0,40–2,76)	
		T/T	3 (2,8 %)	2 (5,1 %)	1,91 (0,30–12,00)	
	rs1801282	C/C	77 (72 %)	29 (69 %)	1,00	0,38
		G/C	29 (27,1 %)	11 (26,2 %)	1,01 (0,45–2,28)	
		G/G	1 (0,9 %)	2 (4,8 %)	5,31 (0,46–60,82)	
	rs1175543	A/A	61 (56,5 %)	22 (52,4 %)	1,00	0,44
		A/G	41 (38 %)	15 (35,7 %)	1,01 (0,47–2,18)	
		G/G	6 (5,6 %)	5 (11,9 %)	2,31 (0,64–8,34)	
	rs709158	A/A	61 (56,5 %)	21 (50 %)	1,00	0,24
		A/G	41 (38 %)	15 (35,7 %)	1,06 (0,49–2,30)	
		G/G	6 (5,6 %)	6 (14,3 %)	2,90 (0,84–9,99)	
	rs4684847	C/C	81 (75 %)	28 (68,3 %)	1,00	0,32
		C/T	26 (24,1 %)	11 (26,8 %)	1,22 (0,54–2,79)	
		T/T	1 (0,9 %)	2 (4,9 %)	5,79 (0,50–66,29)	
<i>PPARGCIA</i>	rs2970847	C/C	77 (71,3 %)	27 (67,5 %)	1,00	0,67
		C/T	26 (24,1 %)	12 (30 %)	1,32 (0,58–2,97)	
		T/T	5 (4,6 %)	1 (2,5 %)	0,57 (0,06–5,10)	
	rs8192678	G/G	53 (49,1 %)	26 (61,9 %)	1,00	0,087
		A/G	42 (38,9 %)	15 (35,7 %)	0,73 (0,34–1,55)	
		A/A	13 (12 %)	1 (2,4 %)	0,16 (0,02–1,26)	
<i>PPARA</i>	rs135551	G/G	63 (58,3 %)	16 (38,1 %)	1,00	0,067
		A/G	39 (36,1 %)	21 (50 %)	2,12 (0,99–4,55)	
		A/A	6 (5,6 %)	5 (11,9 %)	3,28 (0,89–12,13)	



Распределение частот генотипов полиморфного варианта rs6902123 в группах, %
Frequency distribution of rs6902123 polymorphic variant genotypes in groups, %

Еще одним полиморфизмом гена *PPARD*, изучаемым в качестве маркера риска развития метаболических нарушений, является вариант rs6902123. Так, в исследовании популяции китайской ханьской выборки [29] было показано, что аллель *C* данного полиморфного варианта связан с более высоким уровнем гликемии натощак, HbA1c, а также с повышенным риском СД 2-го типа. Более того, были получены убедительные доказательства ассоциаций между 25(OH)D, генотипом по полиморфизму rs6902123 *PPARD* и величинами HbA1c [30].

В нашем исследовании выявлены единичные генотипы *CC* rs6902123 в группах контроля и СД1 (см. рисунок), а различия в распределении частот генотипов полиморфного варианта rs6902123 гена *PPARD* в протестированных нами группах не были статистически значимыми ($p = 0,56$, $p = 0,46$ для групп СД1 и СД2 соответственно).

Согласно данным литературы, полиморфизм Gly482Ser (rs8192678) является наиболее распространенным, потенциально функциональным полиморфизмом коактиватора рецептора- γ , активируемого пролифератором пероксисом 1- α (PPARGC1A), который рассматривается как ключевой фактор транскрипции, вовлеченный в контроль метаболических процессов и энергетического гомеостаза, потенциальный маркер риска развития метаболического синдрома, предиабета, СД 2-го типа. Между тем ассоциативные исследования его полиморфизма дали противоречивые результаты, что может отражать этнические различия. Проведенный F. Du с соавт. [31] мета-анализ продемонстрировал связь полиморфного варианта rs8192678 с риском развития СД2 (OR = 1,249, 95 % CI – 1,099–1,419, $p = 0,001$). В то же время мета-анализ, проведенный P. Bhatta с соавт. [32], продемонстрировал, что у носителей генотипа A/A неазиатского происхождения уровни гликемии натощак и ОХ были существенно ниже в сравнении с другими генотипами, а носители генотипа G/G азиатской группы имели более высокие цифры ИМТ, что авторами рассматривалось как возможный фактор риска метаболических заболеваний. В нашем исследовании частота гомозигот A/A в группе пациентов с СД 1-го типа была в 5 раз ниже, чем в контрольной группе, и составила 2,4 %, однако наблюдаемые нами различия в распределении частот генотипов полиморфного варианта rs8192678 в группе пациентов с СД 1-го типа по сравнению с контрольной группой не достигли необходимого уровня статистической значимости ($p = 0,087$).

Для оценки клинической значимости и повышения диагностической эффективности нами проведен анализ сочетания аллелей с целью выявления наиболее информативных гаплотипов, ассоциированных с метаболической патологией. Так, наилучший эффект достигался при анализе результатов генотипирования 7 полиморфных вариантов, включающих rs2267668, rs2016520 гена *PPARD*, rs1175543, rs709158, rs4684847 гена *PPARG*, rs8192678 гена *PPARGC1A*, rs135551 гена *PPARA* (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Варианты сочетания аллелей, ассоциированных с метаболическими заболеваниями

Table 4. Variants of the combination of alleles associated with metabolic diseases

Тип СД	rs2267668	rs8192678	rs2016520	rs1175543	rs709158	rs4684847	rs135551	Частота	OR (95 % CI)	p
СД1	A	G	T	A	A	C	G	0,2225	1,00	–
	A	G	T	A	A	C	A	0,1198	8,70 (1,73–43,74)	0,0096
	A	G	T	G	G	C	G	0,078	5,89 (1,20–28,92)	0,03
	A	G	T	A	A	T	G	0,0773	4,64 (1,05–20,63)	0,046
СД2	A	G	T	G	G	C	G	0,0933	3,35 (1,11–10,06)	0,033
	A	A	T	A	A	C	A	0,0414	6,71 (1,33–33,86)	0,022

Как следует из табл. 4, гаплотипы A/G/T/A/A/C/A и A/G/T/A/A/T/G ассоциированы со значительным увеличением риска развития СД 1-го типа (OR = 8,70 (1,73–43,74) и OR = 4,64 (1,05–20,63) соответственно), носительство гаплотипа A/A/T/A/A/C/A увеличивает риск развития СД 2-го типа (OR = 6,71 (1,33–33,86)), а гаплотип A/G/T/G/G/C/G значительно чаще встречается в группах пациентов как СД2, так и СД1 по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, проведение молекулярно-генетического тестирования по полиморфным вариантам rs2267668, rs2016520 гена *PPARD*, rs1175543, rs709158, rs4684847 гена *PPARG*, rs8192678 гена *PPARGC1A*, rs135551 гена *PPARA* может быть использовано в качестве диагностического критерия при определении групп риска развития СД как 2-го, так 1-го типа. Данное положение не находится в противоречии с совершенно новыми, «революционными» трактовками СД как гетерогенной группы заболеваний [33–35]. Такой взгляд на проблему СД не отражен пока в действующих международных стандартах диагностики и лечения, по-прежнему выделяющих СД 1-го и 2-го типа без деления на подтипы [10, 15], ввиду полифакториальности формирования таких сложных и разнородных по этиологии заболеваний, как СД 1-го и 2-го типа, группы которых, согласно последним исследованиям, также неоднородны [36, 37]. Анализ единичных полиморфных вариантов, ассоциированных с выявленной патологией, менее эффективен, чем анализ комплекса генов для определения риска патологии с целью проведения корректной и своевременной профилактики.

Интересным представляется дальнейший анализ ассоциации полиморфного варианта rs135551 гена *PPARA* с прогнозом и рисками прогрессирования диабетических осложнений при СД 1-го и 2-го типа. Учитывая обсуждаемую в последние несколько лет проблему гетерогенности СД не только 2-го, но и 1-го типа, распространенность разных вариантов аутоиммунных форм диабета взрослых как одного из кластеров СД 2-го типа, сочетание аутоиммунного инсулита и инсулинорезистентности в случае ряда форм СД 1-го типа, полученные нами данные, по-видимому, не исключают возможный вклад иммунных механизмов в формирование инсулинорезистентности, многообразие подтипов диабета внутри традиционных групп СД1 и СД2 [38, 39].

Мировая практика идет в направлении использования веерных тест-панелей, оценивающих ОНП во множестве генов, что свидетельствует о формировании так называемого «морбидного генотипа». Это позволяет сузить группу лиц для профилактического наблюдения, своевременной превенции и ранней коррекции метаболических и иных нарушений [19, 40, 41].

Дальнейшая работа по сопоставлению генетических детерминант с клинически проявленными фенотипами сохраняет свою актуальность в направлении поиска путей оптимизации первичной и вторичной превенции метаболических заболеваний и ассоциированных с ними болезней. Несмотря на отсутствие изменений в действующих классификациях диабета, полученные нами результаты определяют целесообразность поисковых клинических и молекулярно-генетических исследований с целью совершенствования критериев выделения подтипов СД среди традиционных групп СД 1-го и 2-го типа, что позволит рационализировать подходы к профилактике и ее коррекции в будущем.

Выводы

1. Среди обследованных нами пациентов наиболее четко ассоциированным с СД 1-го и 2-го типа оказался однонуклеотидный полиморфизм rs135551 гена *PPARA*, что может отражать обсуждаемую в мире проблему гетерогенности СД внутри традиционно выделяемых типов и поиск оптимальных диагностических критериев, разработку новых классификаций. Наиболее существ-

венное увеличение риска развития СД 2-го типа наблюдалось у носителей минорных генотипов G/G полиморфных вариантов rs1175543 и rs709158 гена *PPARG* (OR = 3,47 (1,25–9,64) и OR = 3,31 (1,18–9,30) соответственно).

2. Наибольшая ассоциация была выявлена при анализе результатов генотипирования 7 полиморфных вариантов (rs2267668, rs2016520 гена *PPARD*; rs1175543, rs709158, rs4684847 гена *PPARG*; rs8192678 гена *PPARGC1A*; rs135551 гена *PPARA*), что позволило выделить два гаплотипа, ассоциированных с СД 1-го типа (A/G/T/A/A/C/A и A/G/T/A/A/T/G (OR = 8,70 (1,73–43,74) и OR = 4,64 (1,05–20,63)), один гаплотип, ассоциированный с СД 2-го типа (A/A/T/A/A/C/A (OR = 6,71 (1,33–33,86)), и гаплотип A/G/T/G/G/C/G, ассоциированный с СД как 1-го, так и 2-го типа.

3. Ввиду выраженной полифакториальности формирования метаболических заболеваний большинство определяемых ОНП показывает статистически значимые ассоциации между особенностями генотипа и изучаемой патологией лишь при наличии больших когорт, что объясняет полученные нами результаты и определяет целесообразность планирования долговременных эпидемиологических обследований с созданием больших объемов выборок, формированием базы данных клинических случаев предиабета, СД и ассоциированной с ними эндокринной патологии. Полученные нами данные подтверждают перспективность молекулярно-генетических и клинических исследований для разработки эффективных диагностических панелей, направленных на выявление индивидуумов с высоким риском развития и прогрессирования диабета, для совершенствования превентивных и лечебных технологий.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках задания 6.1 «Разработать ДНК-технологии выявления генетического риска эндокринных заболеваний» научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства».

Acknowledgements. The study was carried out as part of task 6.1 “Develop DNA technology for identifying the genetic risk of endocrine diseases” of the scientific and technical program of the Union State “Development of innovative genogeographic and genomic technologies for identifying a person and individual characteristics of a person based on studying the gene pools of the regions of the Union State”.

Список использованных источников

1. Association of diabetes type and chronic diabetes complications with early exit from the labour force: register-based study of people with diabetes in Finland / O. Kurkela [et al.] // *Diabetologia*. – 2021. – Vol. 64, N 4. – P. 795–804. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05363-6>
2. Частота абдоминального ожирения и ассоциированных с ним метаболических нарушений у детей 7–13 лет / Е. Г. Вайнилович [и др.] // *Проблемы эндокринологии*. – 2011. – Т. 57, № 5. – С. 15–23.
3. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity / A. E. Locke [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 518, N 7538. – P. 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature14177>
4. The trans-ancestral genomic architecture of glycemic traits / J. Chen [et al.] // *Nat. Genet.* – 2021. – Vol. 53, N 6. – P. 840–860. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00852-9>
5. Goodarzi, M. O. Genetics insights in the relationship between type 2 diabetes and coronary heart disease / M. O. Goodarzi, J. I. Rotter // *Circ. Res.* – 2020. – Vol. 126, N 11. – P. 1526–1548. <https://doi.org/10.1161>
6. Large-scale genome-wide meta-analysis of polycystic ovary syndrome suggests shared genetic architecture for different diagnosis criteria / F. Day [et al.] // *PLOS Genetics*. – 2018. – Vol. 14, N 12. – P. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007813>
7. Groop, L. New approaches beyond genetics: towards precision medicine in diabetes / L. Groop // *Diabetologia*. – 2016. – Vol. 59, N 12. – P. 2495–2496. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4014-4>
8. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2019 abridged for primary care providers // *Clin. Diabetes*. – 2019. – Vol. 37, N 1. – P. 11–34. <https://doi.org/10.2337/cd18-0105>
9. Pollanen, P. M. Dynamics of islet autoantibodies during prospective follow-up from birth to age 15 years / P. M. Pollanen, S. J. Ryhanen, J. Toppari // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 105, N 12. – P. e4638–e4651. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa624>
10. American Diabetes Association Professional Practice Committee. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care of diabetes-2022. *Diabetes care* / B. Draznin [et al.]. – 2022. – Vol. 45, suppl. 1. – P. S17–S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
11. Alberti, K. G. Metabolic syndrome – a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation / K. G. Alberti, P. Zimmet, J. Shaw // *Diabet. Medicine*. – 2006. – Vol. 23, N 5. – P. 469–480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491>
12. Khosla, T. Indices of obesity derived from body weight and height / T. Khosla, C. R. Lowe // *J. Epid. Commun. Health*. – 1967. – Vol. 21, N 3. – P. 122–128. <https://doi.org/10.1136/jech.21.3.122>
13. Risk assessment of type 2 diabetes in northern China based on the logistic regression model / C. Li [et al.] // *Technol. Health Care*. – 2021. – Vol. 29, N S1. – P. S351–S358. <https://doi.org/10.3233/THC-218033>

14. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиасфера, 2002. – 305 с.
15. Consensus report: definition and interpretation of remission in type 2 diabetes / M. C. Riddle [et al.] // *Diabetologia*. – 2021. – Vol. 64, N 11. – P. 2359–2366. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05542-z>
16. PPAR agonists and metabolic syndrome: an established role? / M. Botta [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 4. – Art. 1197. <https://doi.org/10.3390/ijms19041197>
17. Mirza, A. Z. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: physiological importance and clinical implications / A. Z. Mirza, I. I. Althagafi, H. Shamshad // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 166. – P. 502–513 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>
18. Guo, Z. Current progress in pharmacogenomics of type 2 diabetes: a systemic overview / Z. Guo, R. Priefer // *Diabetes Metab. Syndr.* – 2021. – Vol. 15, N 5. – P. 20, 102239. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102239>
19. Exploration and development of PPAR modulators in health and disease: an update of clinical evidence / H. S. Cheng [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 20. – Art. 5055. <https://doi.org/10.3390/ijms20205055>
20. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review / L. Wang [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 92, N 1. – P. 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>
21. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ / L. Han [et al.] // *Future Cardiol.* – 2017. – Vol. 13, N 3. – P. 279–296. <https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019>
22. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis / V. Dubois [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2017. – Vol. 127, N 4. – P. 1202–1214. <https://doi.org/10.1172/JCI88894>
23. Muzio, G. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and oxidative stress in physiological conditions and in cancer / G. Muzio, G. Barrera, S. Pizzimenti // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, N 11. – Art. 1734. <https://doi.org/10.3390/antiox10111734>
24. Variations in PPAR δ determine the change in body composition during lifestyle intervention: a whole-body magnetic resonance study / C. Thamer [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 93, N 4. – P. 1497–1500. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1209>
25. West of Scotland Coronary Prevention Study. Peroxisome proliferator activated receptor delta genotype in relation to cardiovascular risk factors and risk of coronary heart disease in hypercholesterolaemic men / J. Skogsberg [et al.] // *J. Int. Med.* – 2003. – Vol. 254, N 6. – P. 597–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2003.01236.x>
26. Association of peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\delta/\gamma$ with obesity, and gene-gene interaction, in the Chinese Han population / W. Luo [et al.] // *J. Epidemiol.* – 2013. – Vol. 23, N 3. – P. 187–194. <https://doi.org/10.2188/jea.je20120110>
27. Association and interaction of PPAR α , δ , and γ gene polymorphisms with low-density lipoprotein-cholesterol in a Chinese Han population / W. Fan [et al.] // *Gen. Test Mol. Biomarkers.* – 2015. – Vol. 19, N 7. – P. 379–386. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2015.0002>
28. The role of peroxisome proliferator-activated receptors α polymorphisms in Graves' disease and orbitopathy / J. P. Przemyslaw [et al.] // *Endocrine Abstracts*. – 2014. – Vol. 35. – Art. P1028. <https://doi.org/10.1530/endoabs.35.P1028>
29. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism and obesity on type 2 diabetes in a Chinese Han population / X. Lv [et al.] // *Diabetol. Metab. Syndr.* – 2017. – Vol. 19. – Art. 7. <https://doi.org/10.1186/s13098-017-0205-5>
30. Associations of type 2 diabetes with common variants in PPAR δ and the modifying effect of vitamin D among middle-aged and elderly Chinese / L. Lu [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, N 4. – P. e34895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034895>
31. Du, F. Correlation between PPAR δ gene rs8192678 G>A polymorphism and susceptibility to type-2 diabetes / F. Du, K.-J. Yang, L.-S. Piao // *Open Life Sci.* – 2019. – Vol. 14, N 1. – P. 43–52. <https://doi.org/10.1515/biol-2019-0006>
32. Meta-analysis demonstrates Gly482Ser variant of PPAR δ is associated with components of metabolic syndrome within Asian populations / P. Bhatta [et al.] // *Genomics*. – 2020. – Vol. 112, N 2. – P. 1795–1803. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.011>
33. Ahlqvist, E. Subtypes of type 2 diabetes determined from clinical parameters / E. Ahlqvist, R. B. Prasad // *Diabetes*. – 2020. – Vol. 69, N 10. – P. 2086–2093. <https://doi.org/10.2337/dbi20-0001>
34. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity / T. Tuomi [et al.] // *Lancet*. – 2014. – Vol. 383, N 9922. – P. 1084–1094. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62219-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62219-9)
35. Pearson, E. R. Type 2 diabetes: a multifaceted disease / E. R. Pearson // *Diabetologia*. – 2019. – Vol. 62. – P. 1107–1112. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4909-y>
36. Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment / R. D. Leslie [et al.] // *Diabetologia*. – 2016. – Vol. 59, N 1. – P. 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3789-z>
37. Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks? / S. J. Cleland [et al.] // *Diabetologia*. – 2013. – Vol. 56. – P. 1462–1470. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2904-2>
38. Two decades since the fetal insulin hypothesis: what have we learned from genetics? / A. E. Hughes [et al.] // *Diabetologia*. – 2021. – Vol. 64, N 3. – P. 717–726. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05386-7>
39. Wolosowicz, M. The causes of insulin resistance in type 1 diabetes mellitus: is there a place for quaternary prevention? / M. Wolosowicz, B. Lukaszuk, A. Chabowski // *Int. J. Environ. Res. Publ. Health*. – 2020. – Vol. 17, N 22. – Art. 8651. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228651>
40. Franks, P. W. Gene-lifestyle interplay in type 2 diabetes / P. W. Franks, J. Merino // *Curr. Opin. Gen. Dev.* – 2018. – Vol. 50, N 6. – P. 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.02.001>
41. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity / L. P. Mayoral [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 2020. – Vol. 151, N 1. – P. 11–21. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1768_17

References

1. Kurkela O., Forma L., Ilanne-Parikka P., Nevalainen J., Rissanen P. Association of diabetes type and chronic diabetes complications with early exit from the labour force: register-based study of people with diabetes in Finland. *Diabetologia*, 2021, vol. 64, no. 4, pp. 795–804. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05363-6>
2. Vainilovich E. G., Lushchik M. L., Sretenskaya Zh. L., Zapol'skii S. A., Danilova L. I. Frequency of abdominal obesity and associated metabolic disorders in children 7–13 years old. *Problemy endokrinologii* [Endocrinology problems], 2011, vol. 57, no. 5, pp. 15–23 (in Russian).
3. Locke A. E., Kahali B., Berndt S. I., Justice A. E., Pers T. H., Day F. R. [et al.] Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity. *Nature*, 2015, vol. 518, no. 7538, pp. 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature14177>
4. Chen J., Spracklen C. N., Marenne G., Varshney A., Corbin L. J., Luan J. [et al.] The trans-ancestral genomic architecture of glycemic traits. *Nature Genetics*, 2021, vol. 53, no. 6, pp. 840–860. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00852-9>
5. Goodarzi M. O., Rotter J. I. Genetics insights in the relationship between type 2 diabetes and coronary heart disease. *Circulation Research*, 2020, vol. 126, no. 11, pp. 1526–1548. <https://doi.org/10.1161>
6. Day F., Karaderi T., Jones M. R., Meun C., Chunyan He, Drong A. [et al.] Large-scale genome-wide meta-analysis of polycystic ovary syndrome suggests shared genetic architecture for different diagnosis criteria. *PLOS Genetics*, 2018, vol. 14, no. 12, pp. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007813>
7. Groop L. New approaches beyond genetics: towards precision medicine in diabetes. *Diabetologia*, 2016, vol. 59, no. 12, pp. 2495–2496. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4014-4>
8. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2019 abridged for primary care providers. *Clinical Diabetes*, 2019, vol. 37, no. 1, pp. 11–34. <https://doi.org/10.2337/cd18-0105>
9. Pollanen P. M., Ryhanen S. J., Toppari J. Dynamics of islet autoantibodies during prospective follow-up from birth to age 15 years. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2020, vol. 105, no. 12, pp. e4638–e4651. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa624>
10. Draznin B., Aroda V. R., Bakris G., Benson G., Brown F. M., Freeman R. [et al.]. American Diabetes Association Professional Practice Committee. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care of diabetes-2022. *Diabetes Care*, 2022, vol. 45, suppl. 1, pp. S17–S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
11. Alberti K. G., Zimmet P., Shaw J. Metabolic syndrome – a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, 2006, vol. 23, no. 5, pp. 469–480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491>
12. Khosla T., Lowe C. R. Indices of obesity derived from body weight and height. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 1967, vol. 21, no. 3, pp. 122–128. <https://doi.org/10.1136/jech.21.3.122>
13. Li C., Liu M., An Y., Tian Y., Di Guan, Wu H., Pei Z. Risk assessment of type 2 diabetes in northern China based on the logistic regression model. *Technology and Health Care*, 2021, vol. 29, no. S1, pp. S351–S358. <https://doi.org/10.3233/THC-218033>
14. Rebrova O. Yu. *Statistical analysis of medical data. Using the STATISTICA Application Package*. Moscow, Mediasfera Publ., 2002. 305 p. (in Russian).
15. Riddle M. C., Cefalu W. T., Evans P. H., Gerstein H. C., Nauck M. A., Oh W. K. [et al.]. Consensus report: definition and interpretation of remission in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2021, vol. 64, no. 11, pp. 2359–2366. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05542-z>
16. Botta M., Audano M., Sahebkar A., Sirtori C. R., Mitro N., Ruscica M. PPAR agonists and metabolic syndrome: an established role? *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 4, art. 1197. <https://doi.org/10.3390/ijms19041197>
17. Mirza A. Z., Althagafi I. I., Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: physiological importance and clinical implications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, vol. 166, pp. 502–513. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>
18. Guo Z., Priefer R. Current progress in pharmacogenomics of type 2 diabetes: a systemic overview. *Diabetes and Metabolic Syndrome*, 2021, vol. 15, no. 5, p. 20, 102239. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102239>
19. Cheng H. S., Tan W. R., Low Z. S., Marvalim Ch., Hao Lee J. Y., Tan N. S. Exploration and development of PPAR modulators in health and disease: an update of clinical evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 20, art. 5055. <https://doi.org/10.3390/ijms20205055>
20. Wang L., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E. M., Blunder M., Liu X., Malainer C. [et al.]. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochemical Pharmacology*, 2014, vol. 92, no. 1, pp. 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>
21. Han L., Shen W. J., Bittner S., Kraemer F. B., Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiology*, 2017, vol. 13, no. 3, pp. 279–296. <https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019>
22. Dubois V., Eeckhoutte J., Lefebvre P., Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 2017, vol. 127, no. 4, pp. 1202–1214. <https://doi.org/10.1172/JCI88894>
23. Muzio G., Barrera G., Pizzimenti S. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and oxidative stress in physiological conditions and in cancer. *Antioxidants (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 11, art. 1734. <https://doi.org/10.3390/antiox10111734>
24. Thamer C., Machann J., Stefan N., Schäfer S. A., Machicao F., Staiger H. [et al.]. Variations in PPAR δ determine the change in body composition during lifestyle intervention: a whole-body magnetic resonance study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2008, vol. 93, no. 4, pp. 1497–500. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1209>
25. Skogsberg J., McMahon A. D., Karpe F., Hamsten A., Packard C. J., Ehrenborg E. West of Scotland Coronary Prevention Study. Peroxisome proliferator activated receptor delta genotype in relation to cardiovascular risk factors and risk

of coronary heart disease in hypercholesterolaemic men. *Journal of Internal Medicine*, 2003, vol. 254, no. 6, pp. 597–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2003.01236.x>

26. Luo W., Guo Z., Wu M., Hao C., Hu X., Zhou Z., Zhou Z., Yao X., Zhang L., Liu J. Association of peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\delta/\gamma$ with obesity, and gene-gene interaction, in the Chinese Han population. *Journal of Epidemiology*, 2013, vol. 23, no. 3, pp. 187–194. <https://doi.org/10.2188/jea.je20120110>

27. Fan W., Shen C., Wu M., Zhou Z. Y., Guo Z. R. Association and interaction of PPAR α , δ , and γ gene polymorphisms with low-density lipoprotein-cholesterol in a Chinese Han population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2015, vol. 19, no. 7, pp. 379–386. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2015.0002>

28. Janusz P., Pawlak-Adamska E., Bolanowski M., Daroszewski J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors α polymorphisms in Graves' disease and orbitopathy. *Endocrine Abstracts*, 2014, art. P1028. <https://doi.org/10.1530/endoabs.35.P1028>

29. Lv X., Zhang L., Sun J., Cai Z., Gu Q., Zhang R., Shan A. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism and obesity on type 2 diabetes in a Chinese Han population. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 2017, vol. 19, art. 7. <https://doi.org/10.1186/s13098-017-0205-5>

30. Lu L., Wu Y., Qi Q., Liu C., Gan W., Zhu J. [et al.] Associations of type 2 diabetes with common variants in PPAR δ and the modifying effect of vitamin D among middle-aged and elderly Chinese. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 4, p. e34895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034895>

31. Du F., Yang K.-J., Piao L.-S. Correlation between PPARGC1A gene rs8192678 G>A polymorphism and susceptibility to type-2 diabetes. *Open Life Sciences*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. 43–52. <https://doi.org/10.1515/biol-2019-0006>

32. Bhatta P., Bermano G., Williams H. C., Knott R. M. Meta-analysis demonstrates Gly482Ser variant of PPARGC1A is associated with components of metabolic syndrome within Asian populations. *Genomics*, 2020, vol. 112, no. 2, pp. 1795–1803. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.011>

33. Ahlqvist E., Prasad R. B. Subtypes of type 2 diabetes determined from clinical parameters. *Diabetes*, 2020, vol. 69, no. 10, pp. 2086–2093. <https://doi.org/10.2337/dbi20-0001>

34. Tuomi T., Santoro N., Caprio S., Cai M., Weng J., Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*, 2014, vol. 383, no. 9922, pp. 1084–1094. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62219-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62219-9)

35. Pearson E. R. Type 2 diabetes: a multifaceted disease. *Diabetologia*, 2019, vol. 62, pp. 1107–1112. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4909-y>

36. Leslie R. D., Palmer J., Schloot N. C., Lernmark A. Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. *Diabetologia*, 2016, vol. 59, no. 1, pp. 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3789-z>

37. Cleland S. J., Fisher B. M., Colhoun H. M., Sattar N., Petrie J. R. Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks? *Diabetologia*, 2013, vol. 56, pp. 1462–1470. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2904-2>

38. Hughes A. E., Hattersley T. A., Flanagan S. E., Freathy R. M. Two decades since the fetal insulin hypothesis: what have we learned from genetics? *Diabetologia*, 2021, vol. 64, no. 3, pp. 717–726. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05386-7>

39. Wolosowicz M., Lukaszuk B., Chabowski A. The causes of insulin resistance in type 1 Diabetes Mellitus: is there a place for quaternary prevention? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, vol. 17, no. 22, art. 8651. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228651>

40. Franks P. W., Merino J. Gene-lifestyle interplay in type 2 diabetes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2018, vol. 50, no. 6, pp. 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.02.001>

41. Mayoral L. P., Andrade G. M., Mayoral E. P., Huerta T. H., Canseco S. P., Rodal Canales F. J. [et al.]. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian Journal of Medical Research*, 2020, vol. 151, no. 1, pp. 11–21. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1768_17

Информация об авторах

Луцшчк Максим Леонидович – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровка, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: maxim.lushchik@gmail.com

Амельянович Максим Дмитриевич – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: M.Ameliyanovich@igc.by

Тузова Анна Александровна – ст. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровка, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tuzava@yahoo.com

Моссе Ирма Борисовна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: I.Mosse@igc.by

Данилова Лариса Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровка, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Larisa.dan@gmail.com

Information about the authors

Maxim L. Lushchik – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: maxim.lushchik@gmail.com

Maxim D. Ameliyanovich – 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.Ameliyanovich@igc.by

Hanna A. Tuzava – Senior Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tuzava@yahoo.com

Irma B. Mosse – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: I.Mosse@igc.by

Larisa I. Danilova – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Larisa.dan@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 576.895.132.2: 599.735.31

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-172-180>

Поступила в редакцию 15.02.2022

Received 15.02.2022

П. Ю. Лобановская, Л. Н. Акимова, Е. Э. Хейдорова

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

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА *ASHWORTHIOUS SIDEMI* SCHULZ, 1933 (NEMATODA, TRICHOSTRONGYLIDAE) У ДИКИХ КОПЫТНЫХ В БЕЛАРУСИ

Аннотация. В период с 2018 по 2021 г. было проведено неполное вскрытие внутренних органов зубров европейских, оленей благородных, косуль европейских и лосей. Проведена морфологическая и молекулярно-генетическая идентификация обнаруженных гельминтов. Молекулярно-генетический анализ 16 консервативных последовательностей 4-й субъединицы НАДН-дегидрогеназы (*ND4*) мДНК у нематод вида *Ashworthius sidemi* показал низкий уровень генетического разнообразия обнаруженных гельминтов, что может свидетельствовать об их расселении по территории Беларуси из единого источника.

Ключевые слова: *Ashworthius sidemi*, нематоды, гельминты, 4-я субъединица НАДН-дегидрогеназы (*ND4*), молекулярно-генетическая идентификация

Для цитирования: Лобановская, П. Ю. Распространение и характеристика *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 (Nematoda, Trichostrongylidae) у диких копытных в Беларуси / П. Ю. Лобановская, Л. Н. Акимова, Е. Э. Хейдорова // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 172–180. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-172-180>

Palina Y. Lobanovskaya, Ludmila N. Akimova, Ekaterina E. Kheidorova

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

DISTRIBUTION AND CHARACTERISTICS OF *ASHWORTHIOUS SIDEMI* SCHULZ, 1933 (NEMATODA, TRICHOSTRONGYLIDAE) IN WILD UNGULATES IN BELARUS

Abstract. The material was collected during the period 2018–2021 by dissection of internal organs of European bisons, red deers, European roe deers and elks. The found helminths were identified morphologically and using molecular genetic tools. Analysis of 16 *ND4* mRNA sequences of *A. sidemi* revealed low level of genetic diversity which may indicate that *Ashworthius sidemi* in Belarus spread from one source.

Keywords: *Ashworthius sidemi*, nematodes, helminths, 4th subunit of NADH dehydrogenase (*ND4*), molecular genetic identification

For citation: Lobanovskaya P. Y., Akimova L. N., Kheidorova E. E. Distribution and characteristics of *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ungulates in Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 172–180 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-172-180>

Введение. Кровососущая нематода *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 (Nematoda, Trichostrongylidae) паразитирует в сычуге диких и домашних копытных, являющихся в большинстве своем ценными сельскохозяйственными и ресурсными видами животных, что и обуславливает практическую значимость проводимых исследований, так как данный вид гельминта наносит значительный вред организму хозяина, а при массовой инвазии у молодняка может приводить к его гибели [1].

Первое описание вида нематод было сделано по экземплярам, обнаруженным у пятнистого оленя (*Cervus nippon* Temminck, 1838), обитавшего на Дальнем Востоке [2]. Предполагается, что вид *A. sidemi* был завезен в Европу из Азии при интродукции пятнистого оленя во второй половине XIX в. За последние десятилетия он распространился среди диких копытных (у пятнистого оленя, благородного оленя (*Cervus elaphus*), косули европейской (*Capreolus capreolus*), лося

(*Alces alces*), лани (*Dama dama*), серны (*Rupicapra rupicapra*), зубра европейского (*Bison bonasus*), индийского замбара (*Cervus unicolor*), крупного рогатого скота (*Bos taurus*) во многих странах – России, Франции, Швеции, Украине, Вьетнаме, Польше и др. [3–7].

В Беларуси нематода *A. sidemi* впервые зарегистрирована у зубра европейского на территории Национального парка «Беловежская пуща» в 1999 г. [8]. В 2016–2017 гг. данный вид нематод отмечался в сычуге оленя благородного, обитавшего на территории вольера в Свислочском районе Гродненской области [3]. Мониторинг за распространением ашвортиоза у копытных осложняется тем, что в жизненном цикле *A. sidemi* с осени до весны наблюдается пауза в развитии [7], что затрудняет морфологическую диагностику гельминта и требует применения молекулярно-генетических методов видовой идентификации на основе консервативных участков генома [4].

Цель исследований – проведение молекулярно-генетической верификации видового определения *A. sidemi*, обнаруженных у различных видов копытных, и оценка распространенности ашвортиоза на территории Беларуси.

Объекты и методы исследования. В период с 2018 по 2021 г. было проведено неполное гельминтологическое вскрытие 20 зубров европейских, 20 оленей благородных, 20 косуль европейских и 9 лосей. Обнаруженных гельминтов подсчитывали, промывали физиологическим раствором, отбирали самок и самцов для измерения и проведения морфологической идентификации, а оставшихся фиксировали в 70 %-ном этиловом спирте. Идентификация до вида проводилась на основе морфологических признаков, представленных в литературе [5, 9, 10]. Всего для молекулярно-генетического анализа было отобрано 209 экземпляров нематод рода *Ashworthius* (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Информация об исследованных экземплярах *Ashworthius sidemi*

Table 1. Information about examined *Ashworthius sidemi*

Место отбора материала	№ п/п	Вид хозяина	Год отбора материала	Кол-во обнаруженных экз.	Кол-во отобранных экз.	Маркировка проб
ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз»	1	<i>Bison bonasus</i>	2018	171	6 (3 ♀ + 3 ♂)	1ZA(1-6)
	2	<i>Bison bonasus</i>	2018	842	6 (3 ♀ + 3 ♂)	2ZA(1-6)
	3	<i>Bison bonasus</i>	2018	79	6 (3 ♀ + 3 ♂)	3ZA(1-6)
	4	<i>Bison bonasus</i>	2019	9	6 (3 ♀ + 3 ♂)	4ZA(1-6)
	5	<i>Bison bonasus</i>	2019	252	6 (3 ♀ + 3 ♂)	5ZA(1-6)
	6	<i>Bison bonasus</i>	2019	215	6 (3 ♀ + 3 ♂)	6ZA(1-6)
	7	<i>Bison bonasus</i>	2019	238	6 (3 ♀ + 3 ♂)	7 ZA(1-6)
	8	<i>Bison bonasus</i>	2020	221	6 (3 ♀ + 3 ♂)	8ZA(1-6)
	9	<i>Bison bonasus</i>	2020	711	6 (3 ♀ + 3 ♂)	9ZA(1-6)
	10	<i>Bison bonasus</i>	2021	152	6 (3 ♀ + 3 ♂)	10ZA(1-6)
	11	<i>Bison bonasus</i>	2021	368	6 (3 ♀ + 3 ♂)	11ZA(1-6)
	12	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	7	6 (5 ♀ + 1 ♂)	1KA(1-6)
	13	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	1475	30 (15 ♀ + 15 ♂)	2KA(1-30)
НП «Припятский»	1	<i>Bison bonasus</i>	2020	168	30 (15 ♀ + 15 ♂)	12ZA(1-30)
ГЛХУ «Дятловский лесхоз»	1	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	51	30 (15 ♀ + 15 ♂)	3KA(1-30)
	2	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	2	2 (1 ♀ + 1 ♂)	4KA(1-2)
	3	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	5	2 (1 ♀ + 1 ♂)	5KA(1-2)
	4	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	5	2 (1 ♀ + 1 ♂)	6KA(1-2)
	5	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	19	10 (5 ♀ + 5 ♂)	7KA(1-10)
	6	<i>Capreolus capreolus</i>	2020	6	6 (2 ♀ + 4 ♂)	8KA(1-6)
	7	<i>Capreolus capreolus</i>	2021	1	–	–
	8	<i>Capreolus capreolus</i>	2021	39	–	–
	9	<i>Capreolus capreolus</i>	2021	5	–	–
	10	<i>Cervus elaphus</i>	2020	1	1 (♂)	10A1
	11	<i>Cervus elaphus</i>	2021	12	12 (7 ♀ + 5 ♂)	20A(1-12)
	12	<i>Alces alces</i>	2020	3	3 (♂)	1LA(1-3)
	13	<i>Alces alces</i>	2020	2	2 (♂)	2LA(1-2)

Из представленных в табл. 1 нематод рода *Ashworthius* были выделены образцы ДНК с использованием коммерческого набора Genomic DNA – Solution Kits: Animal and Fungi DNA Preparation Kit – solution-based компании Jena Bioscience (Германия). Выделение ДНК осуществляли только из средней части тела гельминта. Передний и задний концы тела паразитов помещали в пробирку с 96 %-ным спиртом для дальнейшего хранения в Генетическом банке дикой фауны ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» на базе лаборатории молекулярной зоологии. Качество и количество выделенной ДНК оценивали с помощью NanoPhotometer P 330UV/Vis (IMPLEN, Германия).

В качестве молекулярно-генетического маркера для видовой идентификации выбран участок 4-й субъединицы НАДН-дегидрогеназы (*ND4*) митохондриальной ДНК, для амплификации которого использовали праймеры, представленные в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Праймеры, использованные для амплификации участка гена *ND4* [5]
Table 2. Primers used for *ND4* gene amplification [5]

Наименование	Последовательность
ASHMIT1	5'-GCTTTTATCATTAAGGTTGATAT-3'
ASHMITR2	5'-TGAATAATAAAAAGCAACTAA-3'
НАЕМИТ1	5'-ATTATTGTCTTTAATTTTATAA-3'
НАЕМИТ2	5'-TGAGAGTCARAAAATATTRTAC-3'

Одновременное использование специфичных праймеров ASHMIT, разработанных для идентификации вида *A. sidemi*, и праймеров НАЕМИТ, сконструированных для выявления морфологически схожего вида – *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1802) [5], позволило максимально точно диагностировать обнаруженных гельминтов до вида. ПЦР-амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, в состав которой входили: 2,5 мкл 10× буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 мкл 10× смеси dNTPs, 1 мкл MgCl_2 , по 2 мкл праймеров 5 пмоль/мкл, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 2 мкл ДНК исследуемых образцов, ddH₂O добавляли до полного объема смеси.

Температурный и временной режимы проведения ПЦР на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США): 1 цикл: 94 °C – 2 мин; 40 циклов: 94 °C – 30 с, 49 °C – 30 с, 68 °C – 45 с; 1 цикл: 68 °C – 10 мин.

Результаты ПЦР-анализа визуализировали в 1,5 %-ном агарозном геле. Секвенирование отобранных образцов осуществляли на базе Института биоорганической химии НАН Беларуси на секвенаторе Applied Biosystems.

Дальнейший анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA 10. Для сравнительного анализа были привлечены последовательности *ND4* мДНК из базы NCBI: *Ashworthius sidemi* (KT613923.1; KT613961.1:5-336; KT614001.1:5-336) и *Haemonchus contortus* (KJ724483.1:382-730).

Филогенетическое дерево по методу максимального правдоподобия было построено при помощи модели Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) с высоким количеством реплик (равным 500). В качестве внешней группы были выбраны депонированные в GenBank нуклеотидные последовательности *ND4* нематод *Trichostrongylus axei* – HM745134.1 и HM745133.1:103-352.

Результаты и их обсуждение. По результатам исследования у 11 зубров и 2 косуль, обитавших на территории ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз», 1 зубра из НП «Припятский» и 9 косуль, 2 лосей и 2 оленей из ГЛХУ «Дятловский лесхоз» были зарегистрированы нематоды *A. sidemi* (рис. 1). Впервые на территории Беларуси вид *A. sidemi* зарегистрирован у косули и лося.

Из обнаруженных экземпляров *A. sidemi* 145 были отнесены к ювенильным формам (рис. 2) на основании признаков, описанных в литературе [10]. На рис. 2 представлены крючковидный неодонт в щечной полости, типичные для вида спикеры и дорсальный луч бурсы, которые позволяют дифференцировать нематод *A. sidemi* от морфологически близкого вида *Haemonchus contortus*.

Неодонт треугольной формы, загнут вверх дорсально (рис. 2, а). Дорсальная доля бурсы редуцирована и расположена симметрично. Удлиненный дорсальный луч разветвляется и окан-

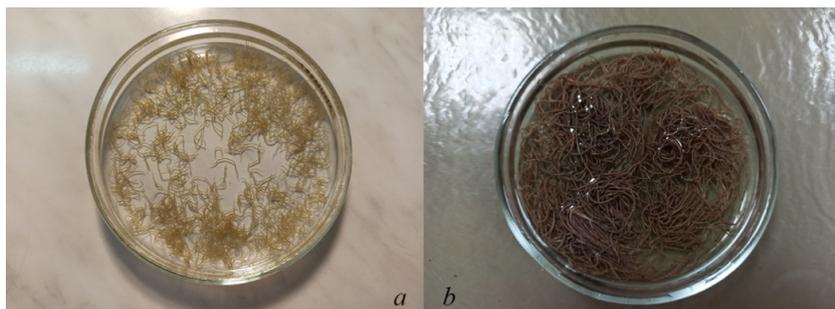


Рис. 1. Внешний вид нематод *Ashworthius sidemi* ювенильной (a) и половозрелой (b) стадий
 Fig. 1. General morphology of *Ashworthius sidemi* of juvenile (a) and adult (b) stages

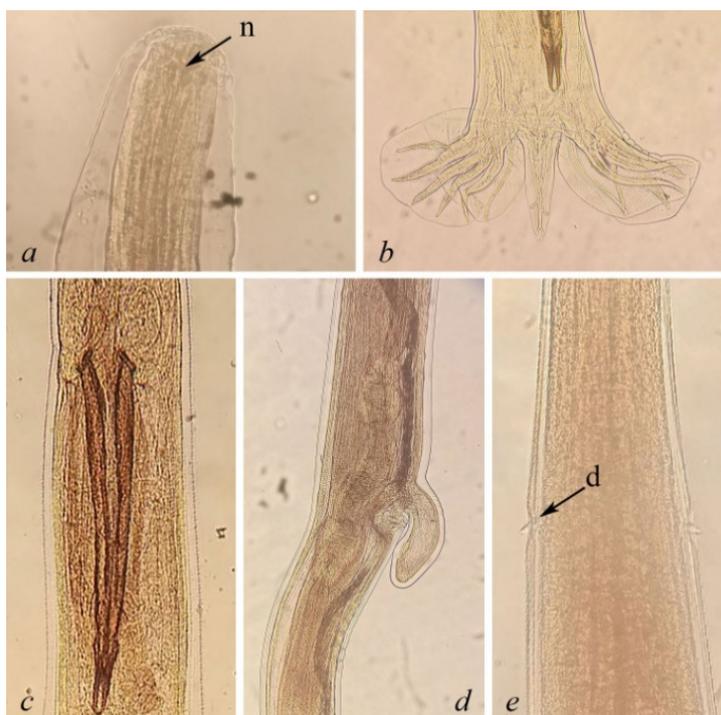


Рис. 2. Строение тела нематоды ювенильной стадии *Ashworthius sidemi*: a – передний конец тела (n – неодонт), b – половая бурса самца, c – спикула самца, d – вульва самки, e – передний конец тела с дейридами (d)
 Fig. 2. Morphology of *Ashworthius sidemi* juvenile: a – anterior end (n – neodont), b – copulatory bursa of male, c – male spicule, d – female vulva, e – anterior part with deirids (d)

чивается дистально четырьмя короткими ветвями (рис. 2, b). Узкие и удлиненные спикулы сходятся в дистальной трети (рис. 2, c). В наших исследованиях у всех самцов *A. sidemi* ювенильной стадии наблюдалось ограниченное развитие латеральных долей копулятивной сумки, а у всех самок матка была развита слабо и содержала небольшое количество яиц. Размеры особей также были значительно меньше, чем известные для половозрелых гельминтов.

Оставшиеся 64 экземпляра были отнесены к половозрелой стадии *A. sidemi* (рис. 3). У самцов отсутствует дорсальная доля, направленная влево (рис. 3, c), сложные спикулы общей длиной 500 мкм не имеют шипиков на конце и губернакума, характерного для гемонхусов (рис. 3, d). У самцов и самок неодонт и дейриды соответствовали характерным для *Ashworthius sidemi* (рис. 3, e).

В табл. 3 приведены размерные характеристики самцов и самок нематод *A. sidemi*, паразитирующих у различных видов копытных из географически удаленных популяций.

Как видно из табл. 3, размер самок ювенильной стадии составлял от 1,5 до 2,2 см, размер самцов – от 1,4 до 2 см, но попадались единичные экземпляры, достигавшие 2,4; 2,7; 3 (♀) и 2,3 (♂) см. Размеры половозрелых стадий *A. sidemi* составили: от 2,8 до 4 см для самок, от 2 до 2,5 см для самцов.

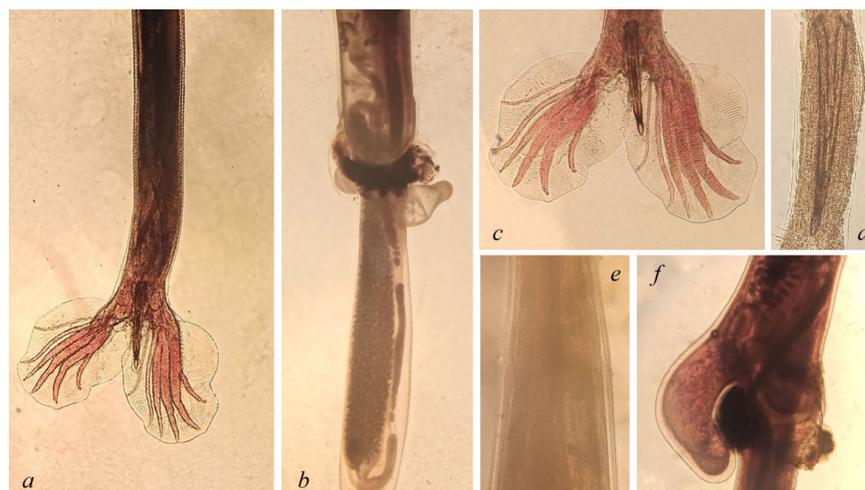


Рис. 3. Строение тела половозрелой стадии нематоды *Ashworthius sidemi*: *a* – задний конец тела самца, *b* – задний конец тела самки, *c* – половая бурса самца, *d* – спикула самца, *e* – передний конец тела с дейридами, *f* – вульва самки

Fig. 3. Morphology of *Ashworthius sidemi* adult: *a* – posterior end of the male, *b* – posterior end of the female, *c* – copulatory bursa of male, *d* – male spicule, *e* – anterior part with deirids, *f* – female vulva

Диапазон размеров обнаруженных экземпляров соответствует данным, приведенным в литературных источниках [11]. При этом зависимости размеров тела ашвортий от численности их инфрапопуляций, видовой принадлежности и места обитания хозяина отмечено не было.

В результате проведения видовой ПЦР-диагностики было получено 209 фрагментов *ND4* мДНК длиной 330 п. н., что подтвердило правильность определения нематод как *Ashworthius sidemi* [6]. Из них для установления гаплотипического разнообразия и филогеографических связей исследуемых гельминтов были отобраны 16 ПЦР-образцов (6 последовательностей *ND4* мДНК ашвортий от зубра европейского, 3 – от косули европейской Осиповичского лесхоза, 2 – от зубра припятской субпопуляции, 4 – от косули и 1 – от лося Дятловского лесхоза).

Т а б л и ц а 3. Данные о встречаемости, хозяевах, количестве и размерах исследованных нематод *Ashworthius sidemi*

T a b l e 3. Data on occurrence, hosts, number and size of *Ashworthius sidemi*

Место отбора материала	№ п/п	Вид хозяина	Стадия развития гельминта	Кол-во экз.	Кол-во ♀	Диапазон значений длины тела ♀, см (max)	Кол-во ♂	Диапазон значений длины тела ♂, см (max)
ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз»	1	<i>Bison bonasus</i>	juv	171	125	1,5–2	46	1,4–1,8
	2	<i>Bison bonasus</i>	juv	842	655	2–2,2	187	1,5–1,6
	3	<i>Bison bonasus</i>	juv	79	55	1,8–2,1	24	1,7–1,8
	4	<i>Bison bonasus</i>	juv	9	6	1,8–9	3	1,4–1,55
	5	<i>Bison bonasus</i>	juv	252	161	1,8–2,2	91	1,5–1,65
	6	<i>Bison bonasus</i>	juv	215	144	1,7–2,1	71	1,6–1,9
	7	<i>Bison bonasus</i>	juv	238	142	1,8–2,1 (3)	96	1,5–1,85
	8	<i>Bison bonasus</i>	juv	221	165	1,8–2,2 (2,4)	56	1,5–2
	9	<i>Bison bonasus</i>	juv	711	411	1,8–2,2 (2,7)	300	1,5–1,85 (2,3)
	10	<i>Bison bonasus</i>	juv	152	85	1,9–2,1	67	1,6–1,8
	11	<i>Bison bonasus</i>	juv	368	269	1,8–2,2	99	1,5–1,9
	12	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	7	5	1,9–2,1	2	1,6
	13	<i>Capreolus capreolus</i>	ad	1475	840	3,4–4	635	1,8–2,4
НП «Припятский»	1	<i>Bison bonasus</i>	juv	168	123	1,8–2,2	45	1,6–1,9

Окончание табл. 3

Место отбора материала	№ п/п	Вид хозяина	Стадия развития гельминта	Кол-во экз.	Кол-во ♀	Диапазон значений длины тела ♀, см (max)	Кол-во ♂	Диапазон значений длины тела ♂, см (max)
ГЛХУ «Дятловский лесхоз»	1	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	21	12	1,8–2,2	9	1,6–1,8
			ad	30	20	2,8–3,6	10	2–2,5
	2	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	2	2	2–2,1	–	–
	3	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	5	3	1,9–2,2	2	1,65
	4	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	5	1	2,1	4	1,6–1,7
	5	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	19	6	1,8–2,2	13	1,4–1,8
	6	<i>Capreolus capreolus</i>	ad	6	2	3,1–3,4	4	2–2,1
	7	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	1	–	–	1	1,6
	8	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	39	24	1,7–2,2	15	1,5–1,8
	9	<i>Capreolus capreolus</i>	juv	5	4	1,8–2	1	1,65
	10	<i>Cervus elaphus</i>	juv	1	1	2,2	–	–
	11	<i>Cervus elaphus</i>	juv	12	8	1,8–2,1	4	1,6–1,7
	12	<i>Alces alces</i>	ad	3	–	–	3	2,3–2,4
13	<i>Alces alces</i>	ad	2	–	–	2	2,1–2,5	

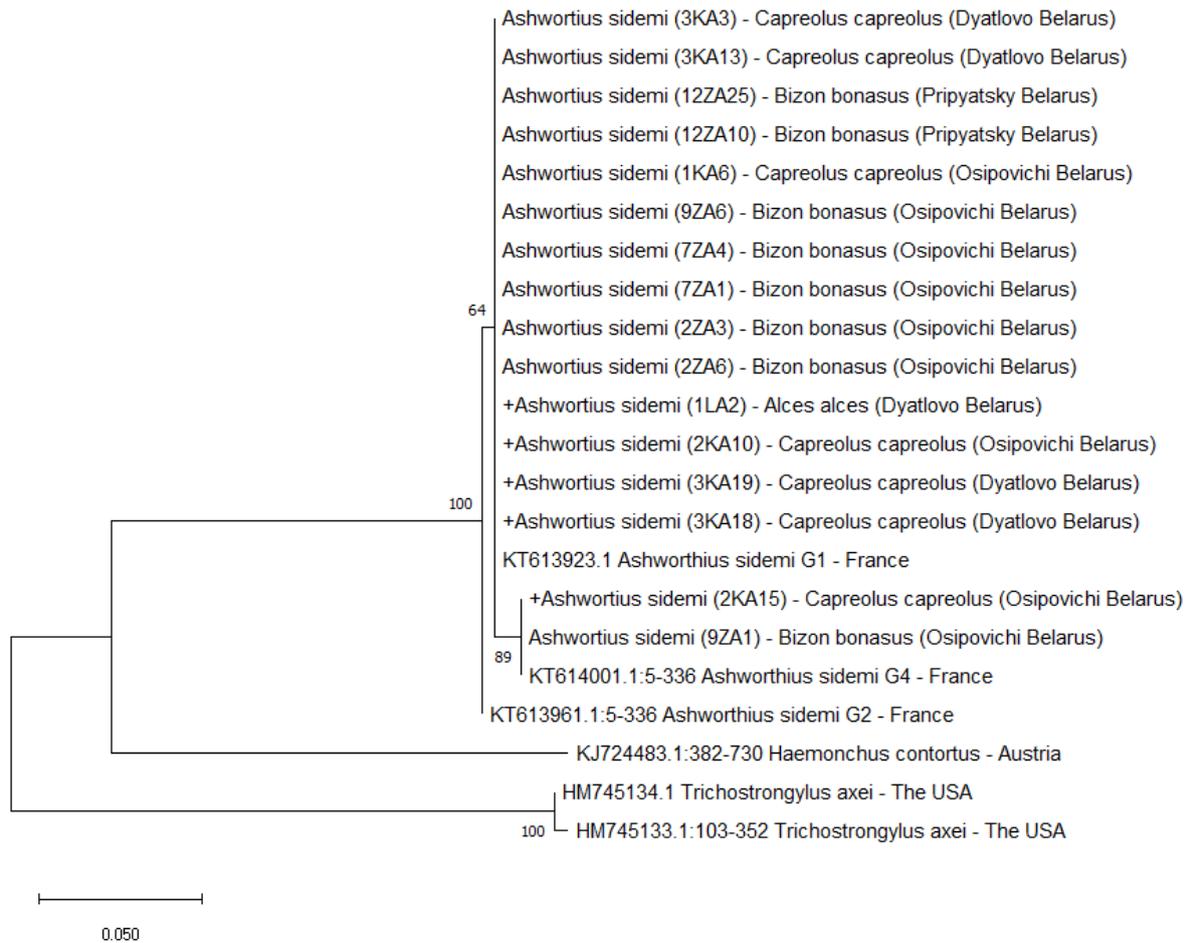


Рис. 4. Филогенетическое дерево генетических различий нематод *Ashworthius sidemi*, паразитирующих у диких копытных Беларуси, построенное по методу максимального правдоподобия по данным анализа последовательности *ND4* (250 п. н.) (знаком «+» отмечены половозрелые экземпляры)

Fig. 4. Maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed using *ND4* gene (250 b. p.) of *Ashworthius sidemi* parasitizing in wild ungulates from Belarus (“+” – adult specimens)

На основании сравнения 16 последовательностей фрагмента гена *ND4* длиной 250 п. н. установлено наличие двух гаплотипов, отличающихся между собой двумя нуклеотидами в позициях 235 (A-G) и 247 (T-C) и идентичных депонированным в GenBank последовательностям ашвортий из Франции – KT613923.1 и KT614001.1-5-336. По результатам анализа было установлено 100 %-ное совпадение 14 сиквенсов между собой и с последовательностью KT613923.1. Последовательности фрагмента гена *ND4* ашвортий 9ZA1 от зубра европейского и 2KA15 от косули европейской, обитавших на территории Осиповичского лесхоза, были идентичны последовательности KT614001.1-5-336. Таким образом, представленность двух гаплотипов по гену *ND4* у ашвортий в Беларуси составила 87,5 и 12,5 %. Следует особо отметить, что нематода 9ZA1 отличалась от остальных ювенильных экземпляров более крупным размером (3 см), но вопрос, является ли этот признак характерным для ашвортий данного гаплотипа, остается невыясненным и требует дальнейшего изучения. На рис. 4 представлено филогенетическое дерево генетических различий нематод *Ashworthius sidemi* по данным анализа последовательности *ND4*.

Анализ представленного на рис. 4 филогенетического дерева показал наличие невысокого гаплотипического разнообразия по гену *ND4* у ашвортий в Беларуси (2 гаплотипа; $h = 12,5\%$), что может объясняться недавней историей появления данного вида нематод в гельминтофауне копытных нашей страны. При этом значительное преобладание в генетической структуре вида одного из двух гаплотипов (87,5 и 12,5 %) может являться закономерным отражением искусственного расселения вида *A. sidemi* из одной инвазивной популяции. Так как ранее данный гельминт регистрировался у зубра европейского только на территории НП «Беловежская пуца», дальнейшее распространение нематод может быть связано с расселением диких копытных из национального парка. В нашем исследовании паразит регистрировался на территории ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз», НП «Припятский» и ГЛХУ «Дятловский лесхоз», что говорит о значительном увеличении района паразитирования у диких копытных данного вида гельминта на территории Беларуси. Ввиду того, что недавние исследования показывают динамичное распространение *A. sidemi* среди диких жвачных [3–5], другие виды копытных, обитающие на территории исследованных охотхозяйств, потенциально также могут быть заражены *A. sidemi*.

Заключение. В период с 2018 по 2021 г. на основании морфологических критериев и молекулярно-генетической верификации видового определения подтверждено паразитирование нематод *A. sidemi* у 4 ресурсных видов диких копытных (зубра европейского, оленя благородного, лося и косули) на территории ООПТ и охотничьих хозяйств трех областей республики – Гродненской, Гомельской и Могилевской. При этом паразитирование ашвортий у косули и лося регистрируется в Беларуси впервые. Выявлено наличие у ашвортий в Беларуси двух гаплотипов по гену *ND4*, один из которых занимает доминирующее положение по степени представленности, что может быть следствием проводимого искусственного расселения диких копытных по территории Беларуси из НП «Беловежская пуца».

Ввиду того, что *A. sidemi* – типичный паразит оленьих, паразитирование данной нематоды у новых видов хозяев (зубра) может вызывать инвазии большой интенсивности и серьезные физиологические расстройства, особенно у молодых животных. Следует также учитывать, что существует возможность заражения ашвортиями крупного рогатого скота на пастбищах, используемых также дикими жвачными животными, а растущие популяции диких копытных могут способствовать дальнейшему распространению гельминта по территории Беларуси. Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости более масштабных исследований ашвортиоза на территории Беларуси.

Благодарности. Работа выполнена в рамках диссертационного исследования «Видовой состав и изменчивость гельминтов диких копытных Беларуси на примере модельных охотхозяйств» (2019–2021 гг.) при поддержке гранта НАН Беларуси для аспирантов, докторантов и соискателей в 2021 г. (№ 2021-28-176 «Молекулярно-генетическая диагностика нематод семейства Trichostrongylidae, паразитирующих у диких копытных (на примере представителей родов *Haemonchus* и *Ashworthius*)»).

Acknowledgements. The work was implemented within the dissertation program, entitled: “Species composition and the variability of helminths in wild ungulates in Belarus in model hunting farmers” (2019–2021), financially supported by the National Academy of Sciences of Belarus, PhD grant No. 2021-28-176 “Molecular genetic diagnosis of nematodes of the family Trichostrongylidae, parasitizing in wild ungulates (representatives of the genera *Haemonchus* and *Ashworthius*)”.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Самойловская, Н. А. Факторы, влияющие на формирование паразитофауны у диких копытных в лесных экосистемах Центрального региона России / Н. А. Самойловская // Рос. паразитол. журн. – 2014. – № 1. – С. 40–43.
2. Schulz, R. S. *Ashworthius sidemi* n. sp. (Nematoda, Trichostrongylidae) aus einem Hirsch (*Pseudaxis hortulorum*) / R. S. Schulz // Ztschr. Parasitenkunde, 1933. – Bd. 5. – S. 735–739.
3. Нематоды *Ashworthius sidemi* у диких жвачных Беларуси и Европейской России / Д. Н. Кузнецов [и др.] // Современные проблемы паразитологии и экологии. Чтения, посвященные памяти С. С. Шульмана : материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием (Тольятти, 15–17 мая 2018 г.) / отв. ред. : А. А. Кириллов, Н. Ю. Кириллова. – Тольятти, 2018. – С. 201–206.
4. Kuznetsov, D. The first detection of *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Russia / D. Kuznetsov, N. Romashova, B. Romashov // Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports. – 2018. – Vol. 14. – P. 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.11.003>
5. *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 and *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) in cervids in France: integrative approach for species identification / V. Lehrter [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2016. – Vol. 46. – P. 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.027>
6. Expansion of *Ashworthius sidemi* in red deer and roe deer from the lower silesian wilderness and its impact on infection with other gastrointestinal nematodes / A. W. Demiaszkiewicz [et al.] // Acta Parasitol. – 2017. – Vol. 62, N 4. – P. 853–857. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0103>
7. Drozd, J. Materials contributing to the knowledge of the helminth fauna of *Cervus (Rusa) unicolor* Kerr and *Muntjac muntjak* Zimm. of Vietnam, including two new nematode species: *Oesophagostomum labiatum* sp.n. and *Trichocephalus muntjaci* sp.n. // Acta Parasitologica. – 1973. – Vol. 21. – P. 465–474.
8. Кочко, Ю. П. Итоги исследований гельминтофауны зубров в Беловежской пушче в XX веке / Ю. П. Кочко // Беловежская пушча: исследования. – Брест, 2003. – Вып. 11. – С. 205–223.
9. Ferte, H. Redescription d' *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 et d' *A. gagarini* Kostyaev, 1969 (Nematoda, Trichostrongyloidea) parasites de Cervidae / H. Ferte, M. C. Durette-Deset // Bull. Mus. Nat. Hist. Nat. Sect. A. – 1989. – Vol. 11. – P. 69–77.
10. Drozd, J. *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) a new parasite of the European bison *Bison bonasus* (L.) and the question of independence of *A. gagarini* / J. Drozd, A. W. Demiaszkiewicz, J. Lachowicz // Acta Parasitol. – 1998. – Vol. 43. – P. 75–80.
11. Дгебуадзе, Ю. Ю. Самые опасные инвазионные виды России (ТОП-100) / Ю. Ю. Дгебуадзе, В. Г. Петросян, Л. А. Хляп. – М. : Т-во науч. изд. КМК, 2018. – 687 с.

References

1. Samoilovskaya N. A. Parasites of wild ungulates in ecosystems of the Central region of Russia. *Rossiiskii parazitologicheskii zhurnal* [Russian journal of parasitology], 2014, no. 1, pp. 40–43 (in Russian).
2. Schulz R. S. *Ashworthius sidemi* n. sp. (Nematoda, Trichostrongylidae) aus einem Hirsch (*Pseudaxis hortulorum*). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1933, Bd. 5, S. 735–739.
3. Kuznetsov D. N., Aksenov A. P., Poloz S. V., Anisimova E. I., Romashova N. B., Romashov B. V. *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in Belarus and European Russia. *Sovremennye problemy parazitologii i ekologii. Chteniya, posvyashchennye pamyati S. S. Shul'mana: materialy Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (Tol'yatti, May 15–17, 2018)* [Modern problems of parasitology and ecology. Readings dedicated to the memory of S. S. Shulman: materials of the All-Russian scientific conference with international participation (Tolyatti, May 15–17, 2018)]. Tolyatti, 2018, pp. 201–206 (in Russian).
4. Kuznetsov D., Romashova N., Romashov B. The first detection of *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Russia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 2018, vol. 14, pp. 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.11.003>
5. Lehrter V., Jouet D., Liénard E., Decors A., Patrelle C. *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 and *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) in cervids in France: integrative approach for species identification. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, vol. 46, pp. 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.027>
6. Demiaszkiewicz A. W., Merta D., Kobielski J., Filip K. J., Pyziel A. M. Expansion of *Ashworthius sidemi* in red deer and roe deer from the lower silesian wilderness and its impact on infection with other gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitologica*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 853–857. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0103>
7. Drozd J. Materials contributing to the knowledge of the helminth fauna of *Cervus (Rusa) unicolor* Kerr and *Muntjac muntjak* Zimm. of Vietnam, including two new nematode species: *Oesophagostomum labiatum* sp. n. and *Trichocephalus muntjaci* sp. n. *Acta Parasitologica*. 1973, vol. 21, pp. 465–474.
8. Kochko Ju. P. Results of research on the helminth fauna of bison in Belovezhskaya Pushcha in the 20th century. *Belovezhskaya pushcha: issledovaniya. Vypusk 11* [Belovezhskaya Pushcha: research. Iss. 11]. Brest, 2003, pp. 205–223 (in Russian).
9. Ferte H., Durette-Deset M.C. Redescription d' *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 et d' *A. gagarini* Kostyaev, 1969 (Nematoda, Trichostrongyloidea) parasites de Cervidae. *Bulletin du museum national d'histoire naturelle. Section A.*, 1989, vol. 11, pp. 69–77.

10. Drozd J., Demiaszkiewicz A. W., Lachowicz J. *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) a new parasite of the European bison *Bison bonasus* (L.) and the question of independence of *A. gagarini*. *Acta Parasitologica*, 1998, vol. 43, pp. 75–80.

11. Dgebuadze Yu. Yu., Petrosyan V. G., Khlyap L. A. *The most dangerous invasive species of Russia (TOP-100)*. Moscow, Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2018. 687 p. (in Russian).

Информация об авторах

Лобановская Полина Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lobanovskaya_polina@inbox.ru

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

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

Information about the authors

Palina Y. Lobanovskaya – Junior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lobanovskaya_polina@inbox.ru

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

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

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.175.1: 57.085
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-181-189>

Поступила в редакцию 14.12.2021
Received 14.12.2021

Я. В. Хомюк¹, Р. П. Литвиновская², А. П. Колбас¹

¹Брестский государственный университет имени А. С. Пушкина, Брест, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ЭПИБРАССИНОЛИДА И ЕГО ЭФИРОВ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПОДСОЛНЕЧНИКА *HELIANTHUS ANNUUS* L. СОРТА ГЕЛИОС

Аннотация. Проведено поэтапное исследование биологической активности 24-эпибрассинолида (ЭБ) и его натриевых солей эфиров с серной кислотой (натрий 2-, 3-, 22- и 23-моносulfаты и динатрий 2,3-дисulfат ЭБ) в опытах по влиянию на ростовые параметры и урожайность подсолнечника однолетнего *Helianthus annuus* L. (сорт Гелиос) в зависимости от условий выращивания.

В опытах на беспочвенной среде действие sulfатов ЭБ на рост и развитие растений в концентрации 10^{-11} – 10^{-9} М оказалось незначительным (за исключением динатрий 2,3-дисulfата ЭБ), в большей степени активность изученных соединений проявилась в лабораторном опыте в почвенной культуре. Наибольшее влияние на рост и развитие отмечено в условиях полевых опытов. Показано, что наиболее эффективным и универсальным эфиром по исследуемым параметрам для двух типов обработки (замачивание семян и опрыскивание растений) является динатрий 2,3-дисulfат ЭБ.

Ключевые слова: *Helianthus annuus* L., брассиностероиды, 24-эпибрассинолид, эфиры ЭБ с серной кислотой, ростстимулирующая активность, урожайность

Для цитирования: Хомюк, Я. В. Влияние эпибрассинолида и его эфиров с серной кислотой на морфометрические параметры подсолнечника *Helianthus annuus* L. сорта Гелиос / Я. В. Хомюк, Р. П. Литвиновская, А. П. Колбас // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 181–189. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-181-189>

Yana V. Khamiuk¹, Raisa P. Litvinovskaya², Aliaksandr P. Kolbas¹

¹Brest State A. Pushkin University, Brest, Republic of Belarus

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

THE EFFECT OF EPIBRASSINOLIDE AND ITS SULFURIC ACID ESTERS ON THE MORPHOMETRIC PARAMETERS OF SUNFLOWER *HELIANTHUS ANNUUS* L. (cv. HELIOS)

Abstract. A step-by-step study of the biological activity of 24-epibrassinolide (EB) and its sodium salts of esters with sulfuric acid (sodium 2-, 3-, 22- and 23-monosulfates and disodium 2.3-disulfate EB) was carried out in experiments on the effect on the growth parameters and crop yield of annual sunflower *Helianthus annuus* L. (Helios variety) depending on growing conditions.

In experiments on a groundless medium, the effect of epibrassinolide sulfuric acid esters on primary plant growth at concentrations of 10^{-11} – 10^{-9} M turned out to be insignificant (with the exception of disodium 2.3-disulfate EB), to a greater extent the activity of the studied compounds was marked in laboratory experiment in soil culture. The greatest effect on growth and development plant was noted in field experiments. It is shown that the most effective and universal compound according to the studied parameters for two types of treatment (soaking seeds and spraying plants) is disodium 2.3-disulfate EB.

Keywords: *Helianthus annuus* L., brassinosteroids, 24-epibrassinolide, esters of EB with sulfuric acid, growth stimulating activity, crop yield

For citation: Khamiuk Ya. V., Litvinovskaya R. P., Kolbas A. P. The effect of epibrassinolide and its sulfuric acid esters on the morphometric parameters of sunflower *Helianthus annuus* L. (cv. Helios). *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 181–189 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-181-189>

Введение. Наблюдаемые тенденции в изменении климата указывают на усиление экстремальных условий при возделывании сельскохозяйственных культур, в связи с чем возникает острая необходимость в применении вспомогательных адаптогенных средств. Одним из таких подходов является применение экологически безопасных веществ – брассиностероидов (БС), которые

в малых дозировках обладают физиологическими эффектами на растения на разных фазах развития, благоприятно воздействуя на них в условиях биотического и абиотического стресса [1]. Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) является одной из основных масличных культур в мире. В последние годы на территории Белорусского Полесья [2] стало возможным выращивание этой перспективной для Республики Беларусь культуры. Одним из подходящих сортов для возделывания является районированный масличный раннеспелый сорт Гелиос.

Ранее проведенные немногочисленные лабораторные исследования показали, что в условиях негативного воздействия на подсолнечник потенциально токсичных металлов, хлоридного засоления и других абиотических и биотических стресс-факторов окружающей среды защитное действие оказывает эпибрасинолид (ЭБ) [3–5]. Однако биологическое действие его метаболитов до настоящего времени не изучалось. Одним из метаболических превращений БС считается их сульфатирование сульфотрансферазами [6], которое предполагает инактивацию БС [7] или, наоборот, является необходимым этапом для проявления биологического эффекта [8]. В связи с этим интересным представлялось изучение биологической активности ряда сульфопроизводных соединений ЭБ, у которых гидроксильные группы в различных положениях фитогормона защищены в виде сложных эфиров.

Целью исследования являлось изучение рострегулирующего действия эпибрасинолида и его производных с серной кислотой в наиболее эффективных концентрациях на ростовые показатели и урожайность подсолнечника однолетнего.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи: 1) определить наиболее активные вещества и их концентрации в различных типах опытов; 2) определить наиболее эффективный способ внесения ЭБ и его производных для продуктивного использования их в лабораторных и полевых условиях; 3) оценить изменение ростовых параметров подсолнечника под действием ЭБ и его сульфопроизводных в лабораторных и полевых условиях; 4) оценить изменение урожайности подсолнечника под действием исследуемых соединений.

Материалы и методы исследования. 24-ЭБ, его натриевые соли 2-, 3-, 22- и 23-моносulfатов и 2,3-дисulfата ЭБ (конъюгаты) синтезированы в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси [9].

Семена подсолнечника однолетнего (сорт Гелиос) предоставлены Республиканским научным дочерним унитарным предприятием «Полесский институт растениеводства» (г. Мозырь).

Определение эффективных концентраций ЭБ и его эфиров с серной кислотой, а также воздействия их на всхожесть семян и длину проростков подсолнечника однолетнего в лабораторных условиях. Изучение морфометрических параметров подсолнечника проводили, согласно ГОСТ 12038–84 [10], в термостате при 25 °С в темноте, с фиксированием параметров энергии прорастания и всхожести семян, длины подземной и надземной частей подсолнечника [11]. Обработку исследуемыми веществами осуществляли однократно в виде замачивания семян на 5 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге. По истечении 3 сут определяли энергию прорастания семян, через 5 сут – всхожесть, среднюю длину корней и гипокотилей проростков. Изучен диапазон наиболее характерных для БС концентраций: 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} М.

В результате проведенных опытов были отобраны наиболее эффективные концентрации ЭБ и каждого из его сульфатов для дальнейших исследований.

Определение воздействия ЭБ и его эфиров с серной кислотой на подсолнечник однолетний в вегетационном лабораторном эксперименте при различных способах обработки. При предпосевной обработке семена замачивали в растворах ЭБ и его сульфатов на 5 ч, после чего высаживали в пластиковые контейнеры размером 9×9×10 см на универсальный почвогрунт («Хозяин, Карио», РБ, в состав которого входили: азот общий – 5795 мг/кг, калий общий – 3223 мг/кг, фосфор общий – 1838 мг/кг, Cu – 6,15 мкг/кг, Zn – 24 мкг/кг) и выращивали в лабораторных условиях [12, 13] в течение месяца.

При внекорневой обработке семена высаживали в контейнеры без предварительной обработки. Внекорневую обработку путем опрыскивания растений исследуемыми соединениями проводили дважды – на стадии всходов растений (10-е сутки) и на стадии второй пары настоящих листьев (16-е сутки). Временные рамки при выращивании подсолнечника в условиях лабораторного вегетационного опыта были установлены нами опытным путем. В качестве контроля использовали

растения, обработанные дистиллированной водой. Фиксировали значения длины подземной и надземной частей подсолнечника однолетнего.

Определение воздействия ЭБ и его эфиров с серной кислотой на подсолнечник однолетний в полевым эксперименте при различных способах обработки. Исследование в полевых условиях проводили на экспериментальном участке отдела агробиологии Центра экологии (г. Брест) с определенным составом почвы (азот общий – 0,058 %, калий – 82 мг/кг, фосфор – 355,81 мг/кг, Рb – 13,4 мкг/кг, Cu – 10,1 мкг/кг, Zn – 86,2 мкг/кг, Ni – 3,9 мкг/кг, Mn – 113,3 мкг/кг).

Обработку исследуемыми веществами проводили аналогично вегетационному лабораторному опыту (замачивание семян при предпосевной обработке и двукратное опрыскивание растений при внекорневой обработке). Внесение исследуемых веществ при внекорневой обработке осуществляли на стадии сформированной второй пары настоящих листьев (для увеличения способности конкурировать с сорными растениями на начальных этапах роста) и в стадии бутонизации (для наиболее эффективного воздействия на цветение и образование семян). В данных условиях фиксировали значения длины стеблей, массы сухих стеблей с листьями, корзинок с семенами, массы семян подсолнечника.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel и *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Результаты лабораторного опыта по подбору оптимальных концентраций тестируемых веществ показали (см. таблицу), что наибольший положительный эффект относительно контроля на среднюю длину подземной части (корней) оказывают ЭБ в концентрациях 10^{-9} М ($p \leq 0,1$) (увеличение на 22,1 %), динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрациях 10^{-11} М ($p \leq 0,05$) и 10^{-9} М (увеличение на 32,9 и 18,4 % соответственно). Положительное влияние оказали также ЭБ в концентрациях 10^{-10} М, натрий 2-моносульфат ЭБ в концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М, натрий 3-моносульфат ЭБ в концентрации 10^{-11} М (увеличение на 10,6; 6,0; 3,3 и 7,5 % соответственно). Относительно ЭБ наиболее выраженное положительное действие оказывал динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрации 10^{-11} М (увеличение длины корня на 44,4 %) (рис. 1).

Влияние ЭБ и его сульфатов на среднюю длину корней и побегов подсолнечника в лабораторных условиях на беспочвенной среде

Effect of EB and its sulfates on the average length of sunflower roots and shoots in laboratory conditions

Вариант обработки	Средняя длина, см	
	подземной части	надземной части
К	1,84 ± 0,12	0,94 ± 0,07
ЭБ 10^{-11}	1,69 ± 0,17	0,73 ± 0,06
ЭБ 10^{-10}	2,03 ± 0,15	0,99 ± 0,05
ЭБ 10^{-9}	2,25 ± 0,15	0,98 ± 0,05
2-нс 10^{-11}	1,54 ± 0,17	0,78 ± 0,09
2-нс 10^{-10}	1,95 ± 0,17	1,02 ± 0,11
2-нс 10^{-9}	1,90 ± 0,19	0,80 ± 0,04
2,3-дндс 10^{-11}	2,44 ± 0,21	1,05 ± 0,10
2,3-дндс 10^{-10}	1,74 ± 0,18	0,78 ± 0,06
2,3-дндс 10^{-9}	2,18 ± 0,19	1,14 ± 0,11
3-нс 10^{-11}	1,98 ± 0,21	0,96 ± 0,08
3-нс 10^{-10}	1,72 ± 0,16	0,71 ± 0,07
3-нс 10^{-9}	1,76 ± 0,15	0,86 ± 0,09
22-нс 10^{-11}	1,66 ± 0,17	0,96 ± 0,08
22-нс 10^{-10}	1,85 ± 0,19	0,86 ± 0,07
22-нс 10^{-9}	1,86 ± 0,18	0,88 ± 0,10
23-нс 10^{-11}	1,53 ± 0,17	0,77 ± 0,08
23-нс 10^{-10}	1,84 ± 0,14	1,01 ± 0,10
23-нс 10^{-9}	1,60 ± 0,12	0,88 ± 0,10

Примечание. 2-, 3-, 22-, 23-нс – натрий 2-, 3-, 22-, 23-моносульфат 24-ЭБ, 2,3-дндс – динатрий 2,3-дисульфат 24-ЭБ.

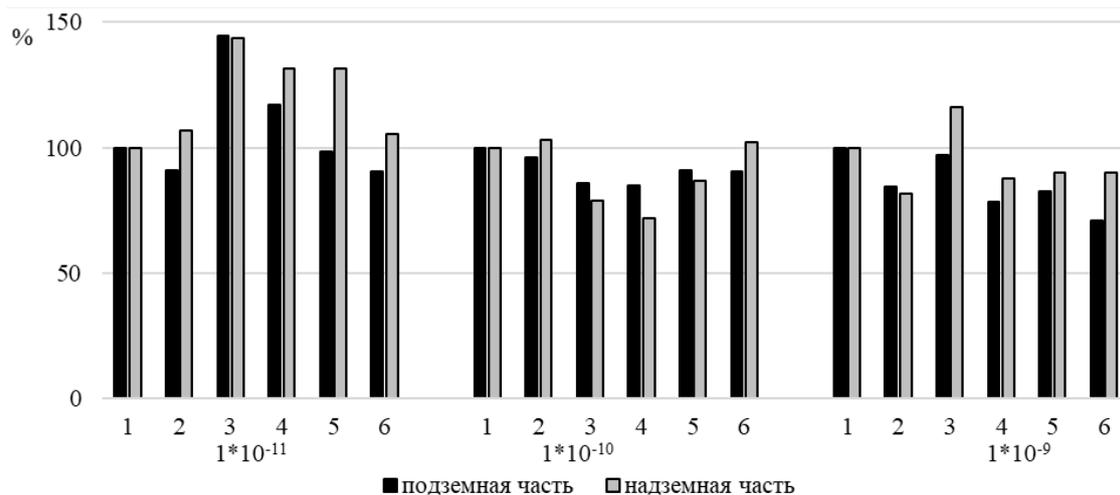


Рис. 1. Влияние эфиров ЭБ с серной кислотой на среднюю длину подсолнечника, выращенного в результате вегетационного опыта в лабораторных условиях (относительно ЭБ). 1 – ЭБ, 2 – 2-нс ЭБ, 3 – 2,3-дндс ЭБ, 4 – 3-нс ЭБ, 5 – 22-нс ЭБ, 6 – 23-нс ЭБ

Fig. 1. The effect of esters EB on the average length of sunflower grown as a result of a growing experiment in laboratory conditions in relation to EB. 1 – EB, 2 – 2-ss EB, 3 – 2.3-dsds EB, 4 – 3-ns EB, 5 – 22-ss EB, 6 – 23-ss EB

На величину средней длины надземной части (гипокотилей) подсолнечника наибольший положительный эффект относительно контроля оказали динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрациях 10^{-11} М ($p \leq 0,05$) и 10^{-9} М (увеличение на 11,2 и 21,2 %). Положительное влияние оказали также ЭБ в концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М (увеличение на 5,0 и 3,4 %), натрий 2-моносulfат ЭБ в концентрации 10^{-10} М (увеличение на 7,6 %) и натрий 23-моносulfат ЭБ в концентрации 10^{-10} М (увеличение на 6,5 %). Относительно ЭБ наиболее выраженное положительное действие оказывал динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрациях 10^{-11} и 10^{-9} М (увеличение на 43,8 и 16,3 %), натрий 3-моносulfат ЭБ в концентрации 10^{-11} М (увеличение на 31,5 %), натрий 22-моносulfат ЭБ в концентрации 10^{-11} М (увеличение на 31,5 %).

По результатам лабораторного опыта можно сделать вывод, что сульфопроизводные 24-ЭБ в концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М в основном проявляют более низкую активность по отношению к ЭБ, но в ряде случаев в концентрации 10^{-11} М оказывают положительное воздействие на ростовые параметры проростков подсолнечника на начальных этапах роста и развития. Наиболее выраженную активность как относительно контроля, так и относительно ЭБ проявляет динатрий 2,3-дисульфат ЭБ.

Вегетационный лабораторный эксперимент. По итогам лабораторных опытов в беспочвенной среде отобраны наиболее активные вещества (ЭБ, 2,3-дисульфо, 3- и 23-сульфопроизводные ЭБ) и эффективные концентрации для следующего этапа исследования, на котором изучалось их влияние на морфометрические параметры подсолнечника в лабораторном вегетационном эксперименте в почвенной культуре.

При предпосевной обработке зафиксировано (рис. 2) повышение двух ростовых параметров – средней длины подземной и надземной частей растения относительно контроля для 2,3-дисульфата ЭБ в концентрациях 10^{-11} М (увеличение по 13,5 %) и 10^{-9} М (увеличение на 37,8 и 31,4 %, $p \leq 0,1$), а также для 23-моносulfата ЭБ в концентрации 10^{-10} М (увеличение на 35,1 и 19,9 %, $p \leq 0,1$). Положительное воздействие по одному исследованному параметру относительно контроля зафиксировано для длины подземной части при воздействии ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 13,5 %) и 2-моносulfата ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 10,8 %), а также для длины надземной части при воздействии 3-моносulfата ЭБ в концентрации 10^{-11} М (увеличение на 12,2 %). Относительно ЭБ наиболее выраженное влияние на длину подземной и надземной частей оказывает динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 21,4 и 30,6 %).

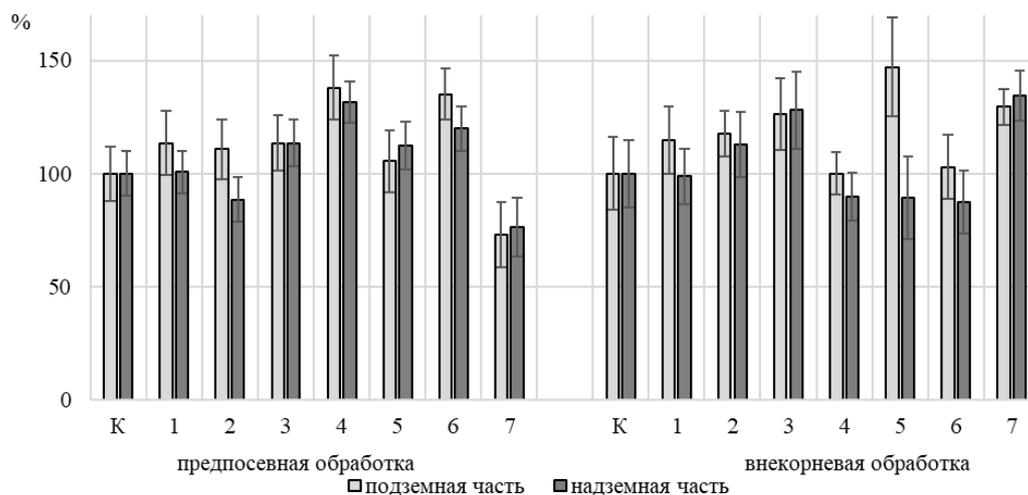


Рис. 2. Влияние ЭБ и его эфиров с серной кислотой на среднюю длину подсолнечника, выращенного в результате вегетационного опыта в лабораторных условиях. К – контроль, 1 – ЭБ в концентрации 10^{-9} М; 2 – 2-нс ЭБ в концентрации 10^{-9} М; 3, 4 – 2,3-дндс ЭБ в концентрациях 10^{-11} и 10^{-9} М; 5 – 3-нс ЭБ 10^{-11} М; 6, 7 – 23-нс ЭБ в концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М

Fig. 2. The effect of EB and its esters on the average length of sunflower grown as a result of a growing experiment in laboratory conditions. K – control, 1 – EB at a concentration of 10^{-9} M; 2 – 2-ns EB at a concentration of 10^{-9} M; 3, 4 – 2,3-dnds EB at concentrations of 10^{-11} and 10^{-9} M; 5 – 3-ns EB 10^{-11} M; 6, 7 – 23-ns EB at concentrations of 10^{-10} and 10^{-9} M

При внекорневой обработке растений отмечено повышение двух ростовых параметров относительно контроля для 2-моносульфата ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 17,6 и 12,7 %), 2,3-дисульфата ЭБ в концентрации 10^{-11} М (увеличение на 26,5 и 28,0 %) и 23-моносульфата ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 29,4 и 34,4 %). Положительное воздействие по одному исследованному параметру относительно контроля зафиксировано для длины подземной части для ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 14,7 %) и для 3-моносульфата ЭБ в концентрации 10^{-11} М (увеличение на 47,1 %). Относительно ЭБ наиболее выраженное влияние на длину подземной и надземной частей оказывает натрий 23-моносульфат ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 12,8 и 36,1 %).

В ряде опытов отмечено подавление роста растений под действием сульфатов. Так, для 23-сульфопроизводного в концентрации 10^{-9} М наблюдалось значительное понижение роста как подземной, так и надземной части растений подсолнечника относительно контроля (35,7 и 24,2 %) при предпосевной обработке. Как и в лабораторном опыте на беспочвенной среде, 2,3-дисульфопроизводное показало лучшие результаты, достоверно стимулируя рост подсолнечника в концентрациях 10^{-11} и 10^{-9} М по сравнению с контролем и ЭБ.

Полевой эксперимент. По результатам вегетационного лабораторного опыта по влиянию ЭБ и его эфиров с серной кислотой в почвенной культуре были заложены опыты в полевых условиях. Оценивали следующие параметры подсолнечника: полевую всхожесть семян, сохранность (долю растений в конце вегетационного периода по отношению к взошедшим), высоту надземной части, биомассу зеленых частей растения и урожайность семян.

В сравнении с результатами, полученными в лабораторном эксперименте, полевая всхожесть семян закономерно понижалась при предпосевной обработке, что может быть связано с торможением развития зародыша семени в естественной среде (рис. 3). Отмечено, что в полевых опытах в большинстве вариантов при предпосевной обработке семян изучаемыми соединениями возшло больше растений (по сравнению с контролем), а сохранилось и развилось больше при внекорневой обработке практически во всех случаях, что может быть связано с внесением веществ в двух фазах созревания растений.

К концу вегетационного периода эффект от воздействия предпосевной обработки семян ЭБ и его сульфатами на ростовые показатели растений нивелировался (рис. 4). В то же время при внекорневой обработке зафиксировано повышение роста растений для всех изученных соединений.

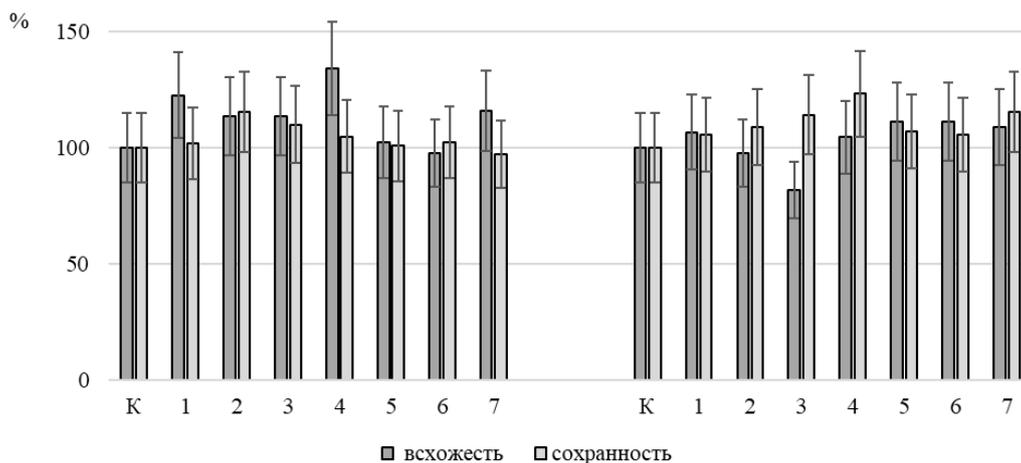


Рис. 3. Влияние ЭБ и его эфиров с серной кислотой на всхожесть и сохранность подсолнечника однолетнего в полевых условиях. Обозначения как на рис. 2

Fig. 3. The effect of EB and its esters on the germination and preservation of annual sunflower in the field. Notation as in Fig. 2

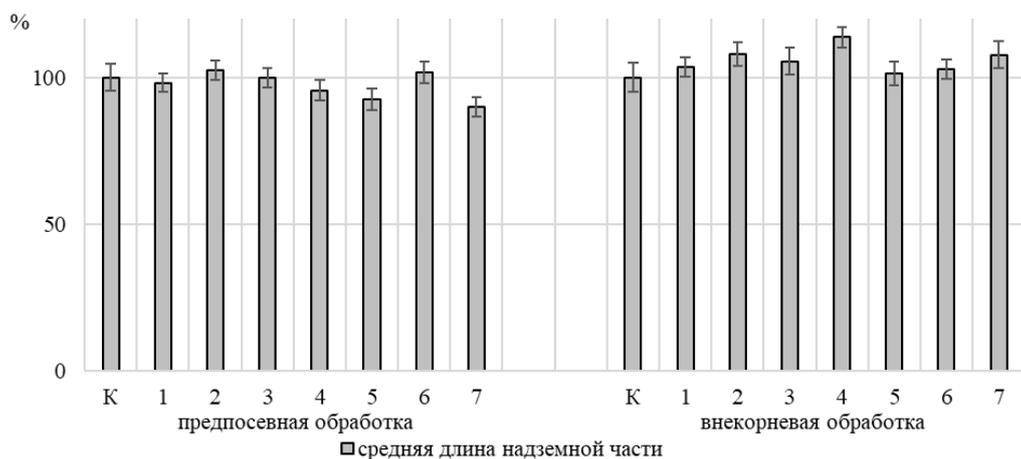


Рис. 4. Влияние ЭБ и его эфиров с серной кислотой на рост подсолнечника однолетнего в конце вегетационного периода в полевых условиях. Обозначения как на рис. 2

Fig. 4. The effect of EB and its esters on the growth of annual sunflower at the end of the growing season in the field relative to the control. Notation as in Fig. 2

Наилучший результат был получен для динатрий 2,3-дисульфата ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 113,7 % относительно контроля, $p \leq 0,05$, и на 9,7 % относительно ЭБ). Таким образом, для увеличения длины надземной части подсолнечника наиболее эффективно использование внекорневого способа внесения фитогормонов.

Интересные данные получены при исследовании воздействия изучаемых соединений на вегетативные и генеративные органы растений. Установлена обратно пропорциональная зависимость влияния ЭБ и его сульфопроизводных на вегетативные и генеративные органы растений, т. е. при увеличении зеленой биомассы уменьшается урожайность семян, и наоборот (рис. 5). При предпосевной обработке семян данная особенность замечена для большинства исследуемых веществ, за исключением 3-моносulfата ЭБ в концентрации 10^{-11} М и 23-моносulfата ЭБ в концентрации 10^{-9} М. В концентрации 10^{-9} М для ЭБ зарегистрировано повышение средней массы семян относительно контроля на 22,8 %, для 2-моносulfата ЭБ – на 6,2, для 2,3-дисulfата ЭБ – на 8,9 %. При опрыскивании растений данная закономерность менее выражена, исключением является динатрий 2,3-дисulfат ЭБ в концентрации 10^{-9} М, обработка которым приводит к повышению как биомассы (на 53,8 %), так и урожайности семян (на 39,4 %) относи-

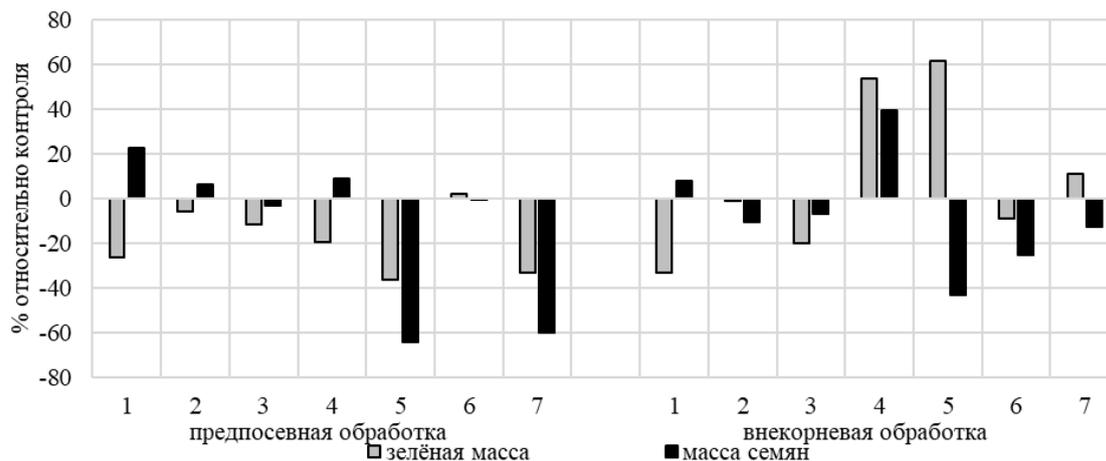


Рис. 5. Влияние ЭБ и его эфиров с серной кислотой на массу семян и зеленую массу растений подсолнечника однолетнего в полевых условиях. 1 – ЭБ в концентрации 10^{-9} М; 2 – 2-нс в концентрации 10^{-9} М; 3, 4 – 2,3-дндс в концентрациях 10^{-11} и 10^{-9} М; 5 – 3-нс 10^{-11} М; 6, 7 – 23-нс в концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М

Fig. 5. The effect of EB and its esters on the mass of seeds and the green mass of annual sunflower plants in the field 1 – EB at a concentration of 10^{-9} M; 2 – 2-ns at a concentration of 10^{-9} M; 3, 4 – 2,3-dsds at concentrations of 10^{-11} and 10^{-9} M; 5 – 3-ns 10^{-11} M; 6, 7 – 23-ns at concentrations of 10^{-10} and 10^{-9} M

тельно контроля и к увеличению урожайности семян на 29,3 % относительно ЭБ. Положительное влияние относительно контроля на урожайность семян оказывает также ЭБ в концентрации 10^{-9} М (увеличение на 7,8 %). Следует отметить, что ранее нами уже фиксировалась такого рода особенность действия некоторых БС (24- ЭБ, 28-гомобрассинолида и 24-эпикастастерона) при изучении их влияния на рост и урожайность подсолнечника однолетнего сорта Лакомка [14].

Таким образом, наиболее эффективным и универсальным сульфопроизводным 24-ЭБ для повышения урожайности семян подсолнечника для двух типов обработки является 2,3-дисульфат динатрия в концентрации 10^{-9} М.

Заключение. Проведено поэтапное исследование воздействия 24-ЭБ и его эфиров с серной кислотой в контролируемых лабораторных условиях, а также в полевых опытах, характеризующихся широким спектром экологических факторов. В лабораторных условиях на беспочвенной среде наиболее выраженное влияние на длину подземной (корни) и надземной (гипокотили) частей подсолнечника относительно контроля и 24-ЭБ оказывает динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрации 10^{-11} М.

В лабораторном вегетационном опыте при предпосевной обработке семян значительную активность относительно контроля и ЭБ на длину подземной и надземной частей оказывает также динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрации 10^{-9} М, эффективность выявлена для натрий 23-моносульфата ЭБ в концентрации 10^{-10} М. При внекорневой обработке выраженную активность относительно контроля и ЭБ оказывают динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрации 10^{-11} М и натрий 23-моносульфат ЭБ в концентрации 10^{-9} М.

В полевых условиях к концу вегетационного периода на длину надземной части подсолнечника значительное влияние оказала только внекорневая обработка динатрий 2,3-дисульфатом ЭБ в концентрации 10^{-9} М. Отмечена обратно пропорциональная зависимость влияния на вегетативные и генеративные органы – при увеличении зеленой биомассы уменьшается урожайность семян. Исключение составляет динатрий 2,3-дисульфат ЭБ в концентрации 10^{-9} М при внекорневой обработке подсолнечника.

В результате проведенных исследований показано, что введение одной или нескольких сульфогрупп в молекулу 24-ЭБ, как правило, не инактивирует действие последнего. Образовавшиеся сульфаты (в виде натриевых солей) действуют в характерных для каждого концентрациях, сопоставимых с концентрацией исходного БС, а ростстимулирующий эффект зависит от способа их внесения. Наиболее эффективным и универсальным сульфопроизводным 24-ЭБ по влиянию на морфологические параметры подсолнечника для двух типов обработки является динатриевая соль 2,3-дисульфата 24-ЭБ.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках НИР «Оценка влияния фитогормонов стероидной природы и их производных на структурные и функциональные параметры некоторых сельскохозяйственных и фиторемедиационных культур» (2019–2020) в рамках ГПНИ на 2016–2020 годы «Химические технологии и материалы», подпрограмма 3 «Биорегуляторы растений». Грант № 20193099 от 30.12.19.

Выражаем благодарность за любезно предоставленные семена подсолнечника Республиканскому научному дочернему унитарному предприятию «Полесский институт растениеводства» (г. Мозырь).

Acknowledgements. The study was carried out as part of the research work “Assessment of the influence of phytohormones of a steroid nature and their derivatives on the structural and functional parameters of some agricultural and phytoremediation crops” (2019–2020) as part of the SPNI for 2016–2020 “Chemical technologies and materials”, subprogram 3 “Plant bioregulators”. Grant No. 20193099 dated 12/30/19.

We express our gratitude for the kindly provided sunflower seeds to the Republican Scientific Subsidiary Unitary Enterprise “Polesye Institute of Plant Growing” (Mozyr).

Список использованных источников

1. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormones / ed. : S. Hayat, A. Ahmad. – Dordrecht : Springer, 2011. – 462 p.
2. Данилович, И. С. Современные изменения климата Белорусского Полесья: причины, следствия, прогнозы / И. С. Данилович, В. И. Мельник, Б. Гейер // Журн. Бел. гос. ун-та. География. Геология. – 2020. – № 1. – С. 3–13.
3. Gornik, K. Application of phytohormones during seed hydropriming and heat shock treatment on sunflower (*Helianthus annuus* L.) chilling resistance and changes in soluble carbohydrates / K. Gornik, L. Lahuta // Acta Physiol. Plant. – 2017. – Vol. 39, N 5. – Art. 118. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2413-x>
4. Алиева, З. М. Протекторное действие эпибрассинолида на черенки различных культур в условиях засоления / З. М. Алиева, Л. Д. Прусакова, А. Г. Юсуфов // Агрехимия. – 2004. – № 9. – С. 68–74.
5. Волотович, А. А. Влияние 24-эпибрассинолида на продуктивность подсолнечника *Helianthus annuus* L. / А. А. Волотович, О. А. Кудряшова, Н. Б. Хрипач // Химия, структура и функция биомолекул : тез. II Междунар. конф., Минск, 3–5 окт. 2006 г. / Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: Н. Б. Хрипач [и др.]. – Минск, 2006. – С. 18.
6. Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus* / M. Rouleau [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 30. – P. 20925–20930. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20925>
7. Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis – cellular localization, expression pattern and functional analysis / D. Fietz [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, N 5. – P. e62638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062638>
8. Dawson, P. A. The biological roles of steroid sulfonation / P. A. Dawson // From Physiol. to Clin. Med. – 2012. – Vol. 36, N 5. – P. 45–64. <https://doi.org/10.5772/52714>
9. Synthesis of sulfated brassinosteroids / H. Zhylitskaya [et al.] // Steroids. – 2017. – N 117. – P. 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.06.006>
10. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести : ГОСТ 12038–84. Введ. 01.07.86. – М. : Стандартинформ, 2011. – 29 с.
11. Методика определения силы роста семян кормовых культур / В. И. Карпин [и др.]. – М. : Изд-во РГАУ–МСХА, 2012. – 15 с.
12. Phenotypic seedling responses of a metal-tolerant mutant line of sunflower growing on a Cu-contaminated soil series: potential uses for biomonitoring of Cu exposure and phytoremediation / A. Kolbas [et al.] // Plant Soil. – 2014. – Vol. 376. – P. 377–397. <http://doi.org/10.1007/s11104-013-1974-8>
13. Агрехимические методы исследований : учеб.-метод. пособие / В. Н. Дышко [и др.]. – Смоленск : ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. – 197 с.
14. Арчибасова, Я. В. Влияние брассиностероидов на морфометрические показатели *Helianthus annuus* в полевых условиях / Я. В. Арчибасова, А. П. Колбас // Весн. Брэсц. ун-та, сер. 5. Хімія. Біялогія. Навукі аб Зямлі. – 2020. – № 1. – С. 20–27.

References

1. Hayat S., Ahmad A. (eds.). *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormones*. Dordrecht, Springer Publ., 2011. 462 p.
2. Danilovich I. S., Mel'nik V. I., Geier B. The current climate changes in Belarusian Polesje region: factors, consequences, projections. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Geografiya. Geologiya = Journal of the Belarusian State University. Geography and Geology*, 2020, no. 1, pp. 3–13 (in Russian).
3. Gornik K., Lahuta L. Application of phytohormones during seed hydropriming and heat shock treatment on sunflower (*Helianthus annuus* L.) chilling resistance and changes in soluble carbohydrate. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, vol. 39, no. 5, art. 118. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2413-x>
4. Alieva Z. M., Prusakova L. D., Yusufov A. G. The protective effect of epibrassinolide on cuttings of different plants under salinization conditions. *Agrokhimiya* [Agrochemistry], 2004, no. 9, pp. 68–74 (in Russian).
5. Volotovich A. A., Kudryashova O. A., Khripach N. B. Effect of 24-epibrassinolide on the productivity of sunflower *Helianthus annuus* L. *Khimiya, struktura i funktsiya biomolekul : tezisy II Mezhdunarodnoi konferentsii (Minsk, 3–5 oktyabrya 2006)* [Chemistry, structure and function of biomolecules: abstracts of II Int. conference (Minsk, October 3–5, 2006)]. Minsk, 2006, p. 18 (in Russian).

6. Rouleau M., Marsolais F., Richard M., Voigt B., Adam G., Varin L. Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, no. 30, pp. 20925–20930. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20925>
7. Fietz D., Bakhaus K., Wapelhorst B., Grosser G., Günther S., Alber J. [et al.]. Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis – cellular localization, expression pattern and functional analysis. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 5, p. e62638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062638>
8. Dawson P. A. The biological roles of steroid sulfonation. *From Physiology to Clinical Medicine*, 2012, vol. 36, no. 5, pp. 45–64. <https://doi.org/10.5772/52714>
9. Zhylitskaya H., Chashchina N., Litvinovskaya R., Zavadskaya M., Zhabinskii V., Khripach V. Synthesis of sulfated brassinosteroids. *Steroids*, 2017, no. 117, pp. 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.06.006>
10. *State Standard 12038-84. Seeds of crops. Methods for determination of germination*. Moscow, Standartinform Publ., 1985. 29 p. (in Russian).
11. Karpin V. I. *The method of determining the growth strength of seeds of fodder crops*. Moscow, Publishing house of the Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K. A. Timiryazev, 2012. 15 p. (in Russian).
12. Kolbas A., Marchand L., Herzig R., Nehnevajova E., Mench M. Phenotypic seedling responses of a metal-tolerant mutant line of sunflower growing on a Cu-contaminated soil series: potential uses for biomonitoring of Cu exposure and phytoremediation. *Plant and Soil*, 2014, vol. 376, pp. 377–397. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1974-8>
13. Dyshko V. N., Dyshko, V. V., Romanenko P. V., Sluchenkova N. V. *Agrochemical research methods*. Smolensk, Federal State Educational Institution of Higher Professional Education “Smolensk State Agricultural Academy”, 2014. 197 p. (in Russian).
14. Archibasova Ya. V., Kolbas A. P. Effects of brassinosteroids on morphometric parameters *Vesnik Brestskaga universiteta. Seriya 5. Khimiya. Biyalogiya. Navuki ab zyamli* [Bulletin of Brest University. Series 5. Chemistry. Biology. Earth Sciences], 2020, no. 1, pp. 20–27 (in Russian).

Информация об авторах

Хомюк Яна Валерьевна – аспирант. Брестский государственный университет имени А. С. Пушкина (бульвар Космонавтов, 21, 224016, г. Брест, Республика Беларусь). E-mail: archibasovayana@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-5740-7341>

Литвиновская Раиса Павловна – д-р хим. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: litvin@iboch.by. <https://orcid.org/0000-0002-9657-0790>

Колбас Александр Петрович – канд. биол. наук, доцент, начальник Центра экологии (бульвар Космонавтов, 21, 224016, г. Брест, Республика Беларусь). E-mail: kolbas77@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-4722-2930>

Information about the authors

Yana V. Khamiuk – Postgraduate student. Brest State A. S. Pushkin University (21, Kosmonavtov Boulevard, 224016, Brest, Republic of Belarus). E-mail: archibasovayana@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-5740-7341>

Raisa P. Litvinovskaya – D. Sc. (Chem.), Chief Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: litvin@iboch.by. <https://orcid.org/0000-0002-9657-0790>

Aliaksandr P. Kolbas – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, director of Ecology center. Brest State A. S. Pushkin University (21, Kosmonavtov Boulevard, 224016, Brest, Republic of Belarus). E-mail: kolbas77@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-4722-2930>

Т. А. Пилипчук, А. Э. Охремчук, Э. И. Коломиец

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ *PSEUDOMONAS PHAGE* БИМ BV-45 Д

Аннотация. Проведен анализ полной нуклеотидной последовательности бактериофага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д – компонента биопестицида «Мультифаг» для защиты сельскохозяйственных культур от болезней, вызванных фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae*. Показано, что геном фага представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 40 383 п. н. (среднее содержание ГЦ-пар составило 58 %), имеет 46 открытых рамок считывания, в том числе 13, описанных в геномах близкородственных фагов. Кроме того, выявлено 4 регуляторные последовательности, характерные для бактериальных генов, узнавание которых обеспечивается сигма-фактором (σ^{70}) РНК-полимеразы, специфических фаговых промоторов не обнаружено. Установлена идентичность большинства аминокислотных последовательностей белков фага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д с белками известного фага *Pseudomonas phage* Andromeda (на 95–100 %), вместе с тем последовательность белка ДНК-эндонуклеазы (ген 22) имеет сходство (на 63 %) с аналогичным белком фага *Pseudomonas phage* PollyC. Полученные данные позволяют предположить, что мозаичная структура генома фага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д обусловлена рекомбинационными перестройками между вышеупомянутыми фагами.

Ключевые слова: геном, бактериофаг, секвенирование нового поколения, фитопатогенные бактерии *Pseudomonas syringae*, биопестицид «Мультифаг»

Для цитирования: Пилипчук, Т. А. Особенности молекулярно-генетической организации *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д / Т. А. Пилипчук, А. Э. Охремчук, Э. И. Коломиец // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 190–196. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-190-196>

Tatsiana A. Pilipchuk, Artur E. Akhremchuk, Emilia I. Kalamiyets

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

MOLECULAR-GENETIC STRUCTURE OF *PSEUDOMONAS PHAGE* БИМ BV-45 D

Abstract. Full nucleotide sequence of bacteriophage *Pseudomonas phage* BIM BV-45 D – active component of biopesticide Multiphage intended for control of crop bacterial diseases caused by *Pseudomonas syringae* was analyzed. It was found that phage genome is represented by linear double-stranded DNA sized 40383 b. p. (average GC contents equals 58 %), comprising 46 open reading frames, including 13 described in genomes of closely related phages. 4 control sequences typical for bacterial genes recognized by sigma factor (σ^{70}) of RNA polymerase were detected, specific phage promoters were not localized. The identity was established of the majority of protein amino acid sequences of the *Pseudomonas phage* BIM BV-45 D with the proteins of the known *Pseudomonas phage* Andromeda (95–100 %), at the same time, the sequences of the DNA endonuclease protein (gene 22) are similar (63 %) to the corresponding protein of *Pseudomonas phage* PollyC. The obtained data suggest that the mosaic structure of *Pseudomonas phage* BIM BV-45 D genome is due to recombinant rearrangements between the afore-mentioned phages.

Keywords: genome, bacteriophage, next generation sequencing, phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae*, biopesticide “Multiphage”

For citation: Pilipchuk T. A., Akhremchuk A. E., Kalamiyets E. I. Molecular-genetic structure of *Pseudomonas phage* BIM BV-45 D. *Vesti Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 190–196 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-190-196>

Введение. В настоящее время ведущими научными коллективами всего мира проводится активное изучение бактериофагов, поэтому количество публикаций о биологии и практическом использовании фагов для разработки ряда современных передовых технологий постоянно возрастает [1]. В связи с увеличением доступности методов секвенирования нового поколения количество секвенированных геномов бактериофагов растет в геометрической прогрессии.

Большинство публикаций посвящено медицинским аспектам использования бактериофагов, тем не менее их применение в качестве основы средств защиты от бактериозов в растениеводстве, животноводстве, рыбоводстве, при хранении пищевых продуктов также представляется весьма актуальным. Так, в Институте микробиологии НАН Беларуси создано новое направление по изоляции и изучению бактериофагов фитопатогенных бактерий с целью разработки биологических средств защиты растений и животных от болезней бактериальной этиологии. В рамках указанного направления разработана технология получения биопестицида «Мультифаг» для борьбы с фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae* – возбудителями целого ряда вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур [2].

Целью настоящей работы являлся анализ нуклеотидной последовательности генома бактериофага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д – одного из активных штаммов, входящих в состав биопестицида «Мультифаг».

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлся бактериофаг *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д, выделенный из листьев плодовых растений и депонированный в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Для получения фаголизата использовали питательный бульон на основе гидролизата кильки (ГРМ-бульон). В колбу со свежей стерильной средой вносили 10 % 16–18-часовой культуры индикаторного штамма бактерий *Pseudomonas helmanticensis* БИМ В-582 Д (ОП₅₉₀ – 1,0–1,2) и инкубировали на качалке в течение 1–3 ч для получения культуры в логарифмической стадии роста (ОП₅₉₀ – 0,6–0,7). Далее бактерии заражали бактериофагом *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д с множественностью инфекции 1:100. Через 1,5–2 ч совместного культивирования фага с бактерией происходило просветление культуры (ОП₅₉₀ – 0,2), которое свидетельствовало о размножении фага и лизисе бактериальной культуры. Полученный фаголизат центрифугировали в течение 30 мин при 6000 g для удаления остатков бактерий.

Для выделения ДНК фага очищенный фаголизат центрифугировали при 24 000 g в течение 2 ч для осаждения фаговых частиц. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в SM-буфере и пропускали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (GVS, США). К фильтрату добавляли ДНКазу I и РНКазу А (ThermoFisher Scientific, США), инкубировали 30 мин при 37 °С. После инактивации ферментов в течение 10 мин при 65 °С добавляли 30 %-ный раствор полиэтиленгликоля (M_n = 6000) и оставляли на ночь при 4 °С для лучшего осаждения фаговых частиц. Далее раствор центрифугировали при 12 000 g в течение 5 мин и из полученного осадка с помощью коммерческого набора Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience, Германия) выделяли нуклеиновые кислоты согласно инструкции производителя. Концентрацию выделенной ДНК фага определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometr R P-Class P 330 (Implen GmbH, Германия).

Для приготовления библиотек ДНК использовали набор реактивов NEBNext DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, США). Высокопроизводительное определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на приборе MiSeq (Illumina), используя комплект реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina). Качественный и количественный анализ полученных прочтений проводили с помощью программы FastQC [3]. Для фильтрации полученных на секвенаторе MiSeq fastq-файлов по размеру и длине использовали программу Trimmomatic-0.39 [4], для парного выравнивания последовательностей с целью их сравнения – пакет программ Blast [5] и базу данных GenBank [6]. Прочтения, полученные на приборе MiSeq, собирали до контигов с помощью программы SPAdes 3.14.1 [7]. Для выравнивания прочтений относительно референсной последовательности использовали программу Bowtie2 v2.4.2 [8], для визуализации выровненных прочтений относительно референсной последовательности – программу Tablet v. 1.19.09.03 [9].

Аннотацию нуклеотидной последовательности и сходство аминокислотных последовательностей белков с таковыми других фагов оценивали с помощью программ PHIRE [10], BPROM [11], ARNold [12], Standard Protein BLAST [13], а анализ возможных функций проводили по поиску консервативных доменов с использованием программ InterProScan [14], NCBI Conserved Domain Search [15]. Графическое изображение генетической карты фага получали с помощью программы SnapGene Viewer 3.2.1 [16]. Парное сравнение полных последовательностей геномной ДНК фагов рода *Bifseptivirus* осуществляли с помощью tBLASTx, визуализированных при использо-

вании программы ViPTree [17]. Нуклеотидная последовательность генома фага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д депонирована в ГенБанк Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) под регистрационным номером MT094430.

Результаты и их обсуждение. Бактериофаг *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д изолирован из листьев яблони, характеризуется широким спектром литической активности в отношении бактерий *Pseudomonas caricapapayae* БИМ В-239, *Pseudomonas syringae* БИМ В-240, *Pseudomonas syringae* БИМ В-268, *Pseudomonas syringae* БИМ В-1229, *Pseudomonas syringae* БИМ В-1140, *Pseudomonas syringae* БИМ В-1144, *Pseudomonas fluorescens* БИМ В-147, *Pseudomonas fluorescens* БИМ В-158, *Pseudomonas frederiksbergensis* БИМ В-159, *Pseudomonas putida* БИМ В-1142, *Pseudomonas helmanticensis* БИМ В-582 Д.

Анализ генома показал, что, согласно принятой систематике вирусов, исследуемый фаг относится к роду *Bifseptivirus* семейства *Autographiviridae*, порядка *Caudovirales*, класса *Caudoviricetes*,

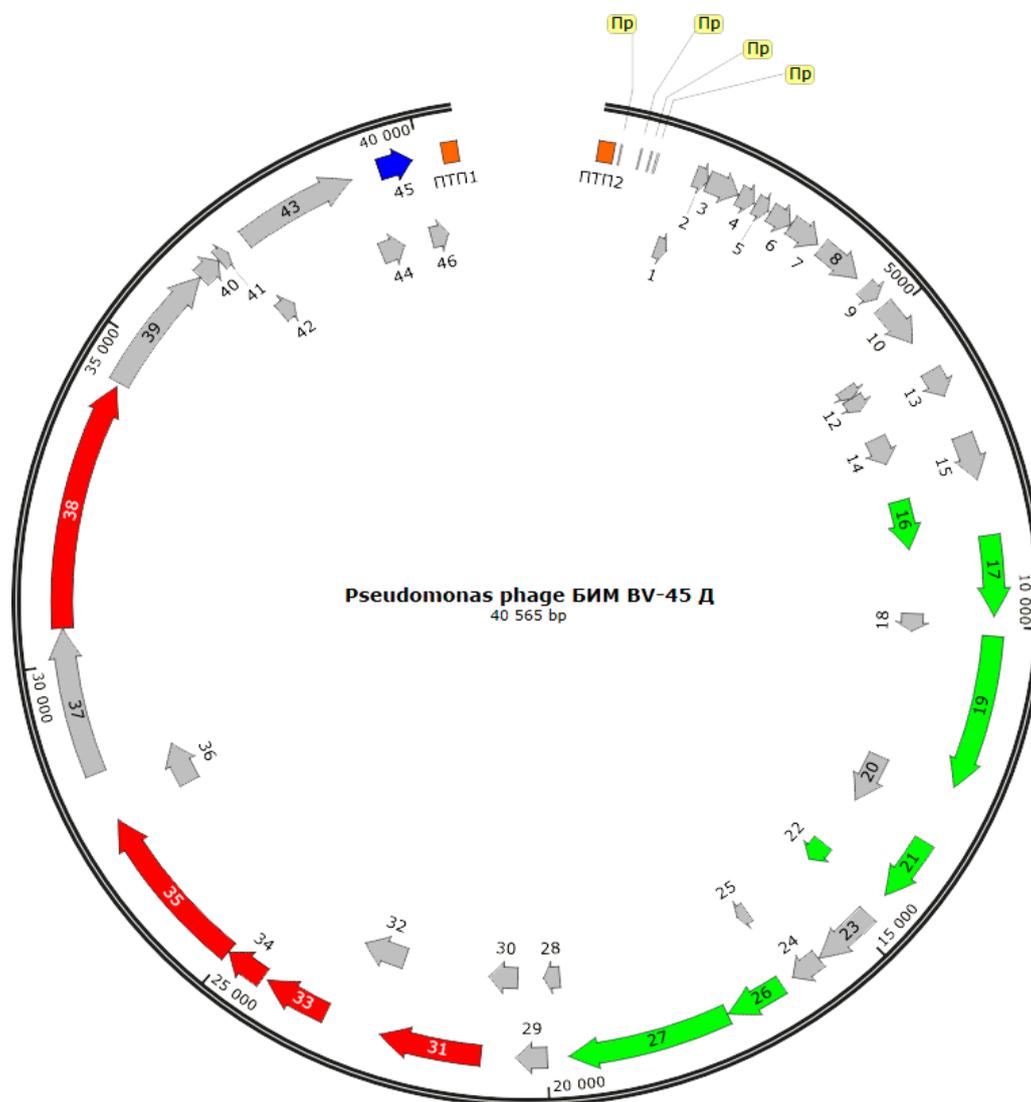


Рис. 1. Геном бактериофага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д: ■ (Pr) – промотор, узнаваемый сигма-фактором (σ^{70}) бактериальной РНК-полимеразой; ■ (DTR) – прямые терминальные повторы; → – белки, отвечающие за копирование вирусного генетического материала; → – составные белки капсида и отростка; → – белки, обеспечивающие лизис клетки-хозяина; → – гипотетические белки

Fig. 1. *Pseudomonas phage* BIM BV-45 D genome: ■ (Pr) – promoter, recognizable sigma factor (σ^{70}) of bacterial RNA polymerase, ■ (DTR) – direct terminal repeats, → – proteins responsible for copying viral genetic material, → – constituent proteins of the capsid and process, → – host cell lysis proteins, → – hypothetical proteins

типа *Uroviricota*, царства *Heunggongvirae*, реалма *Duplodnaviria*. В базе данных Taxonomy Virus NCBI на сегодняшний день зарегистрировано только три бактериофага, относящиеся по таксономии к новому роду *Bifseptivirus*: изучаемый нами фаг *Pseudomonas phage* BIM BV-45 Д и ранее зарегистрированные *Pseudomonas phage* Andromeda и *Pseudomonas phage* Bf7.

Бактериофаг *Pseudomonas phage* Andromeda изолирован ирландскими учеными из р. Лаган (Белфаст, Северная Ирландия), бактерия-хозяин – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall. Выявлено, что геном этого фага представлен двухцепочечной молекулой ДНК размером 40 008 п. н. (содержание ГЦ-пар – 58,23 %) и имеет 46 открытых рамок считывания [18]. Бактериофаг *Pseudomonas phage* Bf7 выделен венгерскими исследователями, бактерия-хозяин – *Pseudomonas tolaasii* LMG 2342^T. Полный геном бактериофага Bf7 составляет 40 058 п. н. (46 открытых рамок считывания) и представлен двуцепочечной ДНК (содержание ГЦ-пар – 58,4 %). Характеризуется широким спектром литической активности в отношении 16 штаммов бактерий рода *Pseudomonas* (*P. tolaasii*, *P. reactans*, *P. agarici*, *P. cichorii*, *P. fluorescens* (II, III и IV биовары), *P. poae*, *P. putida*, *P. rhizosphaerae*) [19].

Изучаемый нами фаг *Pseudomonas phage* BIM BV-45 Д способен лизировать 11 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, его геном представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 40 383 п. н. (среднее содержание ГЦ-пар – 58 %), имеет 46 открытых рамок считывания, в том числе 13, определяющих синтез известных белков, и 33 гипотетических полипептида, выявляемых в геномах близкородственных фагов (рис. 1).

В геноме фага *Pseudomonas phage* BIM BV-45 Д выявлено 4 регуляторные последовательности, характерные для бактериальных генов, узнавание которых обеспечивается сигма-фактором (σ^{70}) РНК-полимеразы. Специфических фаговых промоторов у фага не обнаружено. Анализ генома *Pseudomonas phage* BIM BV-45 Д показал отсутствие известных генов, ответственных за лизогенный цикл, что свидетельствует о литической природе фага.

Сравнение последовательности аминокислотных остатков белков фага *Pseudomonas phage* BIM BV-45 Д с другими геномами выявило сходство на 95–100 % с аминокислотными последовательностями бактериофага *Pseudomonas phage* Andromeda (KX458241, NC_031014) и на 80–97 % – с фагом *Pseudomonas phage* Bf7 (JN991020, NC_016764) (см. таблицу, рис. 2).

Все указанные в таблице предполагаемые белки можно разделить на две группы по степени сходства с фагом *Pseudomonas phage* Andromeda. К первой группе относятся ДНК-хеликаза; ДНК-полимераза; Т3/Т7 РНК-полимераза; белок, соединяющий головку фага с отростком; основной белок капсида; тубулярные белки А и В отростка и внутренний белок вириона (сходство на 98–100 %), к второй – ДНК-праймаза, экзонуклеаза, ДНК-лигаза, лизоцим (сходство на 95–97 %).

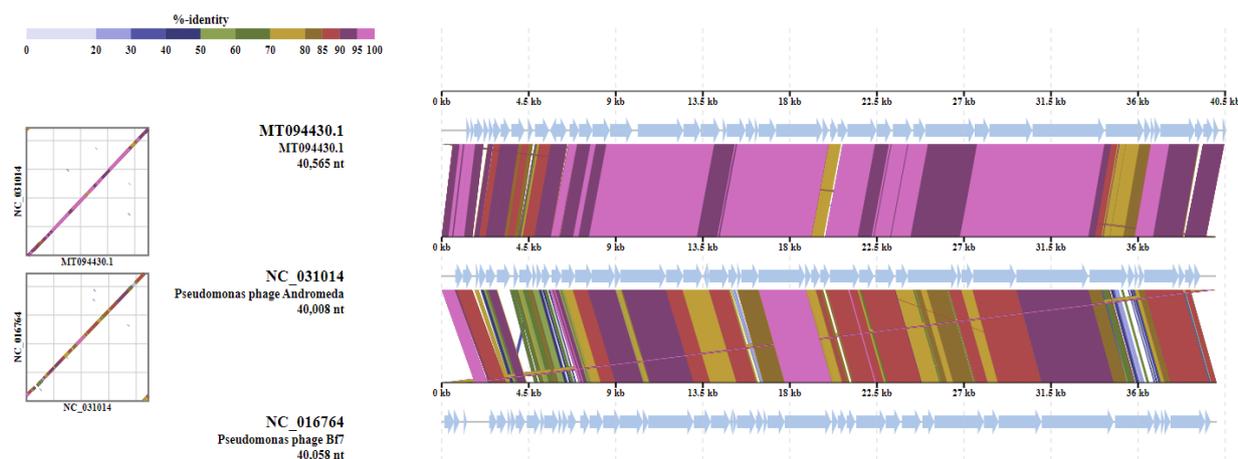


Рис. 2. Попарное сравнение полных последовательностей геномной ДНК фагов рода *Bifseptivirus* с помощью tBLASTx, визуализированных при использовании сервера ViPTree

Fig. 2. Pairwise comparison of complete genomic DNA sequences of phages of the genus *Bifseptivirus* using tBLASTx, visualized with the ViPTree server

Степень сходства генетических детерминант фага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д, определяющих синтез белков с известной функцией с детерминантами фагов из базы данных RefSeq Select proteins NCBI
The degree of similarity of genetic determinants of the *Pseudomonas phage* BIM BV-45 D encoding the synthesis of proteins with a known function, and phage determinants from the RefSeq Select proteins NCBI database

Номер локуса	Предполагаемый белок	Фаги со схожими аминокислотными последовательностями белка	Степень сходства, %
16	ДНК-праймаза	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	96,33
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	86,90
17	ДНК-хеликаза	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	98,75
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	96,25
19	ДНК-полимераза	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	99,49
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	90,26
21	Экзонуклеаза	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	95,45
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	86,06
22	ДНК-эндонуклеаза	<i>Pseudomonas phage</i> Polly C	62,70
		<i>Xanthomonas phage</i> XAJ24	52,38
26	ДНК-лигаза	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	96,63
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	82,15
27	Т3/Т7 РНК полимеразы	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	99,38
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	96,76
31	Белок, соединяющий головку фага с отростком	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	99,60
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	89,60
33	Основной белок капсида	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	98,78
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	91,79
34	Тубулярный белок А отростка	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	99,03
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	91,26
35	Тубулярный белок В отростка	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	100,0
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	94,47
38	Внутренний белок вириона	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	98,79
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	90,24
45	Лизоцим	<i>Pseudomonas phage</i> Andromeda	94,64
		<i>Pseudomonas phage</i> Bf7	79,76

Последовательность аминокислотных остатков ДНК-эндонуклеазы (ген 22) не была идентична последовательностям, описанным для фага *Pseudomonas phage* Andromeda, но имела сходство (на 63 %) с белком фага *Pseudomonas phage* PollyC (MG775261), относящегося к роду *Polyceevirus*. Полученные данные позволяют предположить, что мозаичная структура генома фага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д обусловлена рекомбинационными перестройками между вышеупомянутыми фагами.

Закключение. В результате анализа полной нуклеотидной последовательности бактериофага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д, входящего в состав биопестицида «Мультифаг», установлено, что его геном представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 40 383 п. н. (среднее содержание ГЦ-пар составило 58 %), имеет 46 открытых рамок считывания, в том числе 13, определяющих синтез известных белков, выявляемых в геномах близкородственных фагов. В геноме фага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д также выявлено 4 регуляторные последовательности, характерные для бактериальных генов, узнавание которых обеспечивается сигма фактором (σ^{70}) РНК-полимеразы. Специфических фаговых промоторов не обнаружено. Анализ генома *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д показал отсутствие известных генов, ответственных за лизогенный цикл. Установлена идентичность большинства аминокислотных последовательностей белков фагов *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д и *Pseudomonas phage* Andromeda (на 95–100 %), тогда как аминокислотная последовательность ДНК-эндонуклеазы (ген 22) имеет сходство (на 63 %) с аналогичным белком фага *Pseudomonas phage* PollyC. Полученные данные позволяют предположить, что мозаичная структура генома фага *Pseudomonas phage* БИМ BV-45 Д обусловлена рекомбинационными перестройками между вышеупомянутыми фагами.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20Р-078).

Выражаем благодарность за помощь в работе канд. биол. наук Леониду Николаевичу Валентовичу.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant B 20R-078).

We express sincere gratitude for assistance our studies provided by Ph. D. (Biol.) Leonid Valentovich.

Список использованных источников

1. Бактериофаги: биология и практическое применение : пер. с англ. / Х. В. Аккерман [и др.] ; под ред. Э. Катгер, А. Сулаквелидзе ; науч. ред. А. В. Летаров. – М. : Науч. мир, 2012. – 636 с.
2. Биопестицид «Мультифаг» на основе фагов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* и *Pseudomonas fluorescens* для использования в сельском хозяйстве в качестве средства борьбы с болезнями растений / Т. А. Пилипчук [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / отв. ред. : Э. И. Коломиец, А. Г. Лобанок. – Минск, 2015. – Т. 7. – С. 197–219.
3. Babraham Bioinformatics – FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. – Дата доступа : 30.11.2019.
4. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinform. Oxf. J.* – 2014. – Vol. 30, N 15. – P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
5. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 215, N 3. – P. 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
6. GenBank / D. A. Benson [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – Vol. 33, suppl. 1. – P. D34–D38. <https://doi.org/10.1093/nar/gki063>
7. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich [et al.] // *J. Comput. Mol. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 19, N 5. – P. 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
8. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nat. Meth.* – 2012. – Vol. 9, N 4. – P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
9. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data / I. Milne [et al.] // *Brief. Bioinform.* – 2013. – Vol. 14, N 2. – P. 193–202. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>
10. Lavigne, R. PHIRE, a deterministic approach to reveal regulatory elements in bacteriophage genomes / R. Lavigne, W. D. Sun, G. Volckaert // *Bioinformatics.* – 2004. – Vol. 20, N 5. – P. 629–635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg456>
11. Solovyev, V. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In *metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies* / V. Solovyev, A. Salamov // *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* / ed. W. Li. – New York, 2011. – P. 61–78.
12. ARNold, finding terminators at IGM – Web Server [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>. – Дата доступа : 09.11.2016.
13. Standard Protein BLAST [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>. – Дата доступа : 09.11.2021.
14. InterProScan – InterPro [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>. – Дата доступа : 09.11.2021.
15. NCBI Conserved Domain Search [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>. – Дата доступа : 09.11.2021.
16. SnapGene Viewer 6.0.2 Crack Plus Activation Code [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://hardcracked.com/previous/snapgene-viewer/85873/27>. – Дата доступа : 21.02.2022.
17. ViPTree: the viral proteomic tree server / Y. Nishimura [et al.] // *Bioinformatics.* – 2017. – Vol. 33, N 15. – P. 2379–2380. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx157>
18. Magill, D. J. Genomic hypervariability of phage Andromeda is unique among known dsDNA viruses / D. J. Magill, T. A. Skvortsov, L. A. Kulakov // *bioRxiv* [Electronic resource]. – 2019. – Mode of access : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/619015v4.full.pdf+html>. – Date of access : 09.11.2021.
19. Isolation of new *Pseudomonas tolaasii* bacteriophages and genomic investigation of the lytic phage BF7 / E. Sajben-Nagy [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol. 332, N 2. – P. 162–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02592.x>

References

1. Katter E., Sulakvelidze A. (eds.). *Bacteriophages: biology and application*. Moscow, Nauchnyi mir Publ., 2012. 636 p. (in Russian).
2. Pilipchuk T. A., Gerasimovich A. D., Anan'eva I. N., Kolomiets E. I., Popov F. A., Novik G. I. Biopesticide 'Multiphage' based on phages of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas fluorescens* used in agriculture to control plant diseases. *Mikrobnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 7* [Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific works. Vol. 7]. Minsk, 2015, pp. 197–219 (in Russian).
3. *Babraham Bioinformatics – FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Available at : <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 09.11.2021).

4. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics Oxford Journal*, 2014, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
5. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
6. Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 2005, vol. 33, suppl. 1, pp. D34–D38. <https://doi.org/10.1093/nar/gki063>
7. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S. [et al.] SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 2012, vol. 19, no. 5, pp. 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
8. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 2012, vol. 9, no. 4, pp. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
9. Milne I., Stephen G., Bayer M., Cock P. J. A., Pritchard L., Cardle L., Shaw P. D., Marshall D. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 193–202. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>
10. Lavigne R., Sun W. D., Voleckaert G. PHIRE, a deterministic approach to reveal regulatory elements in bacteriophage genomes. *Bioinformatics*, 2004, vol. 20, no. 5, pp. 629–635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg456>
11. Solov'yev V., Salamov A. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies. *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. New York, 2011, pp. 61–78.
12. ARNold, finding terminators at IGM – Web Server. Available at : <http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/> (accessed 09.11.2021).
13. Standard Protein BLAST. Available at : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> (accessed 09.11.2021).
14. InterProScan – InterPro. Available at : <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/> (accessed 09.11.2021).
15. NCBI Conserved Domain Search. Available at : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (accessed 09.11.2021).
16. SnapGene Viewer 6.0.2 Crack Plus Activation Code. Available at : <http://hardcracked.com/previous/snapgene-viewer/85873/27> (accessed 21.02.2022).
17. Nishimura Y., Yoshida T., Kuronishi M., Uehara H., Ogata H., Goto S. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics*, 2017, vol. 33, no. 15, pp. 2379–2380. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx157>
18. Magill D. J., Skvortsov T. A., Kulakov L. A. Genomic hypervariability of phage Andromeda is unique among known dsDNA viruses. *bioRxiv*. Available at : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/619015v4.full.pdf+html> (accessed 21.02.2022).
19. Sajben-Nagy E., Maróti G., Kredics L., Horváth B., Párducz A., Vágvölgyi C., Manczinger L. Isolation of new *Pseudomonas tolaasii* bacteriophages and genomic investigation of the lytic phage BF7. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, vol. 332, no. 2, pp. 162–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02592.x>

Информация об авторах

Пилипчук Татьяна Андреевна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanya.pilipchuk@tut.by

Охремчук Артур Эдуардович – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: akhremchuk@bio.bsu.by

Коломиец Эмилия Ивановна – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Tatsiana A. Pilipchuk – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 2220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanya.pilipchuk@tut.by

Artur E. Akhremchuk – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 2220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: akhremchuk@bio.bsu.by

Emiliya I. Kalamiyets – Academician, Dr. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 2220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 517.112.3:[611.341.018+611.36.018]:661.852'071.2-092.9

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-197-205>

Поступила в редакцию 31.12.2021

Received 31.12.2021

И. В. Николаева, В. М. Шейбак, Е. М. Дорошенко

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

УРОВЕНЬ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В МИКРОБНО-ТКАНЕВОМ КОМПЛЕКСЕ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА И ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ АЦЕТАТА СВИНЦА

Аннотация. Известно, что инициирующим событием повреждения печени при свинцовой интоксикации является воздействие ацетата свинца на микробном кишечника и метаболический профиль энтероцитов.

Цель исследования – выявление зависимости концентраций свободных аминокислот и их производных в печени от аминокислотного фонда микробно-тканевого комплекса тонкого кишечника в условиях свинцовой интоксикации.

В работе были использованы крысы массой 120–140 г, которым внутривентрикулярно в течение 3 недель с питьевой водой вводили ацетат свинца. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли содержание свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе кишечника и печени.

Установлено, что энтеральное поступление ацетата свинца с питьевой водой изменяет профиль свободных аминокислот и их производных в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника, что коррелирует с нарушением гомеостаза аминокислот в печени. Анализ корреляционных связей определяемых нами показателей указывает на существенную роль азотсодержащих метаболитов аминокислот – этаноламина и фосфоэтанолламина, таурина, а также цистатионина в обеспечении антиоксидантной защиты клеток тканей в условиях свинцовой интоксикации.

Таким образом, направленность корреляционных взаимоотношений между различными азотсодержащими метаболитами микробно-тканевого комплекса и печени можно рассматривать как показатель дискоординации гомеостаза.

Ключевые слова: свободные аминокислоты, азотсодержащие метаболиты, тонкий кишечник, микробно-тканевой комплекс, печень

Для цитирования: Николаева, И. В. Уровень свободных аминокислот и их метаболитов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и печени в условиях введения ацетата свинца / И. В. Николаева, В. М. Шейбак, Е. М. Дорошенко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 197–205. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-197-205>

Irina V. Nikalayeva, Vladimir M. Sheibak, Evgeniy M. Doroshenko

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

AMINO ACID BALANCE OF MICROBIAL-TISSUE COMPLEX IN THE SMALL INTESTINAL AND LIVER UNDER ADMINISTRATION OF LEAD ACETATE

Abstract. It is known that the initiating event of liver damage during lead intoxication is the effect of lead on the intestinal microbiome and the metabolic profile of enterocytes. The aim of the study was to reveal the dependence of the concentrations of free amino acids and their derivatives in the liver on the amino acid pool of the microbial-tissue complex of the small intestine.

We used rats weighing 120–140 g, which were injected intragastrically for three weeks with drinking water with lead acetate. Free amino acids and their nitrogen-containing metabolites in the microbial-tissue complex of the intestine and liver were determined by HPLC.

Enteral intake of lead acetate with drinking water changes the profile of free amino acids and their derivatives in the microbial-tissue complex of the small intestine, which correlates with a violation of amino acid homeostasis in the liver. The analysis of the correlations of the indicators we determined indicates the essential role of nitrogen-containing metabolites of amino acids – ethanolamine and phosphoethanolamine, taurine, and cystathionine.

The direction of the correlation relationship between various nitrogen-containing metabolites of the microbial-tissue complex and the liver can be considered as marker of discoordination of homeostasis.

Keywords: free amino acids, nitrogen-containing metabolites, intestines, microbial-tissue complex of the small intestine, liver

For citation: Nikalayeva I. V., Sheibak V. M., Doroshenko E. M. Amino acid balance of microbial-tissue complex in the small intestinal and liver under administration of lead acetate. *Vesti Natsyyanal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 197–205 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-197-205>

Введение. Среди наиболее опасных техногенных загрязнителей окружающей среды приоритетное положение занимают неорганические и органические соли свинца. Желудочно-кишечный тракт непосредственно подвергается воздействию катионов свинца на этапе их поступления в организм с вдыхаемым воздухом, водой и пищевыми продуктами, заглатываемыми со слюной. Металлокомплекс свинца с белками проникает через основную мембрану в соответствующую слизистую пластинку тонкого кишечника и далее в кровеносные сосуды [1–4]. Затем кровь, содержащая катионы свинца, из тонкого кишечника по воротной вене попадает в печень. Свинец частично метаболизируется, и в гепатоцитах печени образуются сложные соединения с желчью и таурохолевой кислотой. Таким образом, в этой форме он повторно выделяется в просвет тонкого кишечника с током желчи. Часть свинца обычно удаляется вместе с фекалиями, а другая часть снова всасывается, обеспечивая печеночно-кишечную рециркуляцию. Ткань печени является главной мишенью окислительного стресса, вызванного поступлением свинца в организм. При внутрибрюшинном его введении в гепатоцитах уменьшается активность супероксиддисмутазы и каталазы, снижается уровень глутатиона [5].

Печень – центральный метаболический орган, основное место обмена аминокислот и синтеза белков плазмы крови. Свободные аминокислоты поступают в печень по воротной вене из тонкого кишечника, а также по венозной сети из толстого кишечника. Одновременно аминокислотный фонд печени формируют аминокислоты, образующиеся при катаболизме эндогенных белков (в первую очередь белков скелетных мышц), а также собственных белков клеток печени [6, 7].

Цитотоксическое действие соединений свинца обусловлено взаимодействием свинца с карбоксильными и фосфатными группами биополимеров, способностью связывать и блокировать активность ферментов и тиоловых групп аминокислот, азотистыми основаниями и нуклеотидами (особенно цитидином), а также вытеснять из активных центров ферментов двухвалентные катионы. В результате индуцированного катионами свинца окислительного стресса происходит повреждение митохондриальной и плазматической мембран, а также макромолекул, включая ДНК [8]. В развитии мембранотропного действия свинца важны явления «молекулярной мимикрии» (организм распознает свинец как Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} или как одновалентные катионы, например Na^+) [9, 10]. Длительное поступление в организм ацетата свинца, даже в относительно нетоксичных концентрациях, приводит к нарушению функции адаптационных, барьерных, детоксикационных и выделительных систем [11, 12].

Очевидно, что «входными воротами» для токсинов (свинец) является желудочно-кишечный тракт, где важную роль помимо энтероцитов, энтероэндокринных клеток и клеток иммунной системы, пищеварительных ферментов и секретов играет микробиом кишечника. В результате формируется микробно-тканевой комплекс тонкого кишечника, который представляет собой единую морфофункциональную систему, объединяющую кишечную микрофлору, кишечный барьер, муцины, гликокаликс, энтероциты, другие клеточные элементы (в том числе продуцирующие различные гормоны и биологически активные соединения). Эта система функционирует по принципу взаимосвязи «ось кишечник–печень», определяющую направленность регуляции гомеостатических параметров организма [13–15].

Важное значение для физиологии и биохимии кишечного барьера имеют компоненты межклеточного матрикса стромы слизистой оболочки кишечника с питающими ее сосудами, лимфоидными фолликулами, клетками APUD-системы и окончаниями энтеральной нервной системы. Свободные аминокислоты, которые генерирует в том числе микрофлора, поступают в клетки из просвета кишечника в процессе расщепления пищевых и эндогенных белков. Кроме того, воздействуя на окончания энтеральной нервной системы, они обеспечивают прямую связь кишечник–мозг [16].

Свинец, как и другие соли тяжелых металлов, вытесняет эссенциальные микроэлементы и влияет на метаболизм бактерий, что провоцирует возникновение дисбиоза, в результате чего изменяется синтез эссенциальных регуляторных нутриентов – короткоцепочечных жирных кислот (бутирата, пропионата, ацетата), незаменимых аминокислот, некоторых витаминов (в частности, никотиновой кислоты) и других биоактивных соединений. Эти соединения, поступая в кровоток, играют важную роль в формировании гомеостаза хозяина [12, 17].

В результате изменяются структура пула свободных аминокислот в тканях и концентрация отдельных аминокислот в печени (вызванные последующей интенсификацией процессов пищеварения, аутолиза собственных белков, гормональными и метаболическими колебаниями), что, очевидно, оказывает существенное воздействие на интенсивность транспортных и/или метаболических процессов в гепатоцитах [18].

Таким образом, инициирующим событием повреждения печени при свинцовой интоксикации является воздействие ацетата свинца на микробиом кишечника и метаболомику микробно-тканевого комплекса кишечника. От степени и глубины изменений в этом комплексе будет в последующем зависеть скорость и интенсивность поражения ткани печени [19].

Целью исследования являлось выявление зависимости концентраций свободных аминокислот и их производных в печени от изменений аминокислотного фонда микробно-тканевого комплекса тонкого кишечника в условиях свинцовой интоксикации.

Материалы и методы исследования. В эксперименте были использованы 30 беспородных крыс массой 120–140 г. Животные находились на стандартном рационе вивария и имели свободный доступ к пище и воде. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

Животные были разделены на две группы – контрольную и опытную. Крысы опытной группы в течение 3 недель получали с питьевой водой ацетат свинца (в суммарной дозе 420 мг/кг, что составило 65 % от LD_{50}). Декапитацию животных осуществляли через сутки после последнего поступления ацетата свинца в организм. Для анализа использовали печень и микробно-тканевый комплекс тонкого кишечника. Образцы тканей для определения свободных аминокислот забирали и замораживали в жидком азоте. Для количественной и качественной идентификации свободных аминокислот и их дериватов использовали метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм), для определения содержания ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) – метод ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм для триптофана). Все определения осуществляли с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Все полученные данные были подвергнуты статистической обработке. Для анализа данных использовали пакет программ Statistica 6.0.437.0 (серийный номер 31415926535897) и Microsoft Excel 2002 (10.2701.2625) (серийный номер 54521-750-6140064-17384), для корреляционного анализа – коэффициент корреляции (r) Спирмена.

Результаты и их обсуждение. Энтеральное поступление ацетата свинца с питьевой водой существенно не изменяет в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника крыс суммарное содержание протеиногенных аминокислот и азотсодержащих производных. Однако анализ индивидуальных концентраций показал достоверное уменьшение их азотсодержащих метаболитов – гидроксизина ($p = 0,0003$), цистатинина ($p = 0,0003$) и таурина ($p = 0,04$) (табл. 1).

Известно, что таурин играет важную роль в стабилизации клеточных мембран, модуляции внутриклеточного уровня ионов кальция, осморегуляции, детоксикации, клеточной дифференциации и росте. Поэтому очевидно, что снижение его уровня свидетельствует об отвлечении метаболитов от пути транссульфирования (цистеин, цистатинин) для синтеза основного антиоксиданта клеток – глутатиона, т. е. направлено на обеспечение антиоксидантной защиты клеток тканей в условиях свинцовой интоксикации [17, 20, 21]. Еще одной причиной уменьшения количества таурина в энтероцитах может быть торможение транспорта экзогенного таурина вследствие токсического действия катионов свинца на белок-транспортер таурина [20, 21].

Достоверное снижение концентрации цистатинина приводило к повышению метаболического индекса серин/цистатинин ($p = 0,01$), что отражает изменения метаболизма серосодержащих аминокислот-предшественников – метионина и цистеина. Серин является предшественником цистеина (внутриклеточного переносчика серы), а также соединением, активно участвующим в одноуглеродном обмене [22]. Одновременно в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника обнаружено увеличение концентраций глицина ($p = 0,02$), глутатиона ($p = 0,007$)

и цитруллина ($p = 0,05$). Глицин участвует в многочисленных реакциях одноуглеродного обмена, является предшественником глутатиона и одновременно тормозным нейромедиатором для клеток нервной системы [21]. Метаболизм цитруллина в кишечнике тесно сопряжен с образованием аргинина, являющегося предшественником оксида азота [23, 24].

Известно, что при содержании метионина выше физиологической концентрации (несмотря на его незаменимость для организма, он является токсичной аминокислотой вследствие способности образовывать гомоцистеин) скорость метаболических процессов резко изменяется и клетка переключается на превращение избытка метионина в цистеин, а затем в трипептид глутатион [9, 12, 21]. Можно предположить, что это результат истощения компенсаторных механизмов, включающих основные антиоксиданты клетки, принимающие активное участие в защите белков и липидов мембран.

Повышение внутриклеточного пула восстановленного глутатиона можно рассматривать как адаптивный механизм, защищающий плазматические и клеточные мембраны от действия перекисей и свободных радикалов, образующихся в клетках под влиянием ионов свинца [8, 17, 18, 21].

Кроме того, выше контрольных значений регистрировались уровни α -аминомасляной кислоты ($p = 0,05$), которая является продуктом окислительной дегградации некоторых аминокислот [5, 12]. Увеличение концентраций фосфоэтаноламина ($p = 0,04$) и этаноламина ($p = 0,004$) (табл. 1), вероятно, обусловлено воздействием катионов свинца на процессы образования основных мембранных фосфолипидов – фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина в энтероцитах тонкого кишечника. Известно, что повышение продукции фосфоэтаноламина снижает активность кальциевых каналов вследствие изменения электрохимических свойств плазматических мембран, которое может быть направлено на уменьшение негативных последствий поступления ацетата свинца в клетки [22].

Т а б л и ц а 1. Изменение концентраций свободных аминокислот, азотсодержащих метаболитов и метаболических индексов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника крыс, получавших ацетат свинца (суммарная доза 420 мг/кг), нмоль/г, Ме (25 %; 75 %)

T a b l e 1. Change in the concentrations of free amino acids, nitrogen-containing metabolites and metabolic indices in the microbial-tissue complex of the small intestine of rats treated with lead acetate (total dose 420 mg / kg), nmol/g, Iu (25 %; 75 %)

Исследуемый показатель	Контроль	Ацетат свинца
Глицин	768,3 (640,7; 1085)	1199 (1033; 1614)*
Глутатион	1864 (1747; 2021)	3372 (2486; 3713)*
Цитруллин	81,0 (51,34; 114,0)	124,6 (106,4; 169,6)*
Фосфоэтаноламин	588,6 (388,1; 926,7)	897,4 (729,5; 1262)*
Таурин	5858 (5447; 7078)	5405 (4542; 5728)*
α -Аминомасляная кислота	6,0 (4,49; 8,75)	9,3 (8,04; 10,62)*
Этаноламин	285,4 (246,3; 305,9)	357,7 (322,9; 423,7)*
Цистатионин	70,2 (62,21; 74,89)	37,1 (34,66; 45,32)*
Гидроксилизин	201,8 (182,9; 2300)	97,6 (91,15; 99,11)*
Индекс серин/цистатионин	7,6 (6,32; 8,05)	15,7 (14,13; 16,80)*
Индекс аргинин/орнитин	2,0 (1,73; 2,38)	1,5 (1,23; 1,66)*

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Снижение индекса аргинин/орнитин ($p = 0,03$), который в печени отражает катаболизм аргинина в орнитиновом цикле с образованием мочевины (вероятно, вследствие активации синтеза полиаминов как маркеров и регуляторов пролиферации энтероцитов), может свидетельствовать о стимуляции аргиназного пути в клетках тонкого кишечника [23, 24].

В печени в результате длительного поступления ацетата свинца с питьевой водой достоверно увеличивались суммарное количество азотсодержащих производных и метаболитов аминокислот (на 17 %, $p = 0,03$), сумма протеиногенных аминокислот (на 11 %, $p = 0,03$), сумма заменимых

аминокислот (на 10 %, $p = 0,02$), сумма ароматических аминокислот (ААК: тирозин, метионин, триптофан) (на 25 %, $p = 0,04$). Последнее имело место за счет повышения уровня тирозина (на 34 %, $p = 0,01$), что отразилось и на снижении индекса АРУЦ/ААК (на 8 %, $p = 0,01$) (АРУЦ: валин, лейцин, изолейцин – сумма аминокислот с разветвленной углеродной цепью) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Изменение содержания свободных аминокислот и их производных и метаболических индексов, в печени крыс, получавших ацетат свинца (суммарная доза 420 мг/кг), нмоль/г, Ме (25 %; 75 %)

T a b l e 2. Changes in the concentrations of free amino acids, nitrogen-containing metabolites and metabolic indices in the liver of rats treated with lead acetate (total dose 420 mg / kg), nmol/g, Iu (25 %; 75%)

Исследуемый показатель	Контроль	Ацетат свинца
Глутамат	2129 (1829,6; 2288)	2701 (2448,71; 2900,74)*
Аспарагин	53,6 (46,10; 78,89)	93,9 (79,52; 96,93)*
Серин	999,8 (962,1; 1152)	846,8 (639,29; 974,43)*
Глицин	886,8 (758,3; 1271)	1865 (1520,19; 2059,37)*
Сумма заменимых аминокислот	11795 (10914; 12447)	13011 (12575,74; 14272,24)*
Тирозин	66,1 (61,12; 71,07)	88,4 (72,62; 96,76)*
Треонин	469,7 (389,5; 508,6)	209,9 (103,04; 326,74)*
Сумма ароматических аминокислот	168,9 (160,2; 195,4)	210,9 (193,05; 222,02)*
Цистеиновая кислота	11,7 (10,87; 12,26)	14,0 (12,48; 20,33)*
Глутатион	5153 (4464; 5392)	5873,9 (5416,09; 8371,34)*
Фосфоэтаноламин	439,6 (286,4; 692,8)	1034,5 (671,72; 1346,93)*
β-Аминомасляная кислота	3,4 (3,02; 4,03)	5,2 (4,05; 10,42)*
γ-Аминомасляная кислота	38,1 (36,54; 43,69)	51,8 (45,27; 59,44)*
Этаноламин	99,2 (91,98; 101,3)	146,7 (132,05; 153,11)*
Цистатионин	115,3 (106,5; 158,6)	199,3 (130,82; 270,01)*
Гидроксизин	43,1 (37,29; 45,34)	76,8 (71,88; 83,62)*
Сумма азотсодержащих производных	7418 (6560; 8001)	9383 (8663,59; 10838,37)*
Индекс АРУЦ/ААК	2,7 (2,65; 2,87)	2,5 (2,35; 2,61)*
Индекс глутамин/глутамат	0,4 (0,41; 0,45)	0,6 (0,44; 0,72)*

При анализе индивидуальных концентраций свободных аминокислот выявлено повышение уровней протеиногенных заменимых аминокислот аспарагина (на 75 %, $p = 0,01$), глицина (в 2,1 раза, $p = 0,002$), глутамата (на 27 %, $p = 0,006$) и одновременно снижение уровней треонина (на 55 %, $p = 0,004$) и серина (на 15 %, $p = 0,02$).

Глутаминовая кислота участвует, с одной стороны, в процессах переаминирования аланина и аспартата, а с другой – в межорганном транспорте азота, являясь в то же время предшественником основного клеточного антиоксиданта – глутатиона. Увеличение концентрации свободного глицина, вероятно, указывает на нарушение использования этой аминокислоты в фолатном цикле и других реакциях одноуглеродного метаболизма (обмен глицина в клетке тесно сопряжен с метаболизмом серина, а значит, и с обменом серосодержащих аминокислот) [25].

Таким образом, комплексный анализ показателей, характеризующих статус свободных аминокислот в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и печени крыс показывает, что длительное поступление ацетата свинца с питьевой водой различным образом влияет на метаболизм аминокислот и азотсодержащих производных в этих тканях. Воздействие ацетата свинца оказывает существенное влияние на формирование фонда серосодержащих аминокислот и метаболически родственных соединений. В то же время катионы свинца обладают мембранотропным эффектом, повышая концентрации этаноламина и фосфоэтанолamina и, таким образом, изменяя интенсивность синтеза фосфолипидов в энтероцитах тонкого кишечника, что опосредованно влияет на транспорт нутриентов в энтероциты [7, 8].

Очевидно, что поступление ацетата свинца с питьевой водой в организм животных в течение 3 недель в суммарной дозе 420 мг/кг приводит к аминокислотному дисбалансу в гепатоцитах.

В результате повышается общее содержание протеиногенных аминокислот (главным образом за счет повышения уровней заменимых аминокислот глутамата и глицина, а также ароматической аминокислоты – тирозина) и суммы азотсодержащих производных аминокислот. При этом отмечается снижение соотношения протеиногенные/азотсодержащие метаболиты аминокислот ($p = 0,01$) и увеличение индекса АРУЦ/ААК ($p = 0,01$), что свидетельствует о токсическом поражении печени.

Т а б л и ц а 3. Отдельные коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между аминокислотами и их производными, выделенными из микробно-тканевого комплекса тонкого кишечника и печени животных контрольной группы и животных, получавших ацетат свинца с питьевой водой в течение 3 недель (кишечник–печень)

Table 3. Separate coefficients of Spearman's rank correlation between amino acids and their derivatives isolated from the microbial-tissue small intestine complex and the liver of the of the animals of control group and animals treated with lead acetate with drinking water for 3 weeks (intestine–liver)

Контроль	Коэффициент корреляции	Ацетат свинца (через 3 недели)	Коэффициент корреляции
Аспарагин–глутамат	0,81	Глутамат–глицин	–0,82
Аспарагин–аланин	0,75	Аспарагин–глутамин	0,79
Орнитин–фосфоэтанолламин	–0,86	Метионин–треонин	0,82
		Фенилаланин–метионин	0,90
		Фенилаланин–фенилаланин	0,90
		Лизин–тирозин	0,86
		Лизин–валин	0,86
		Лизин–изолейцин	0,86
		Лизин–лейцин	0,86
		Лизин–сумма АРУЦ	0,86
		Сумма серосодержащих аминокислот–цистатионин	0,75
		Таурин–глутатион	0,75
		Таурин–цитруллин	0,75
		Этанолламин–глутатион	0,96
		Этанолламин–цитруллин	0,96

Корреляционный анализ между содержанием протеиногенных аминокислот и азотсодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и гепатоцитах животных контрольной группы показал наличие положительной корреляционной связи между концентрациями аспарагина и глутамата, аспарагина и аланина и отрицательной связи между уровнями орнитина и фосфоэтанолламина (табл. 3). В то же время в опытной группе число корреляций между азотсодержащими соединениями увеличилось в 5 раз, а кроме того, возникла отрицательная корреляционная связь между концентрациями глутамата и глицина. Наблюдаемая нами метаболическая ситуация в исследуемых тканях (микробно-тканевой комплекс тонкого кишечника и печень) после воздействия ацетата свинца указывает на существенные сдвиги, которые, вероятно, инициируются в микробно-тканевом комплексе и находят свое отражение в метаболизме аминокислот в печени. Существенное различие корреляционных взаимосвязей между родственными азотсодержащими субстратами можно рассматривать как показатель дискоординации метаболизма.

Заключение. Длительное поступление ацетата свинца с питьевой водой инициирует статистически значимые изменения азотсодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника, что инициирует последующие изменения аминокислотного обмена в печени.

В условиях длительного поступления катионов свинца через желудочно-кишечный тракт наиболее значимый вклад в формирование аминокислотного дисбаланса в гепатоцитах вносит изменение индивидуальных концентраций аспартата, глицина, глутатиона, фосфоэтанолламина, этанолламина, таурина, цистатинина.

Изменения, регистрируемые в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника, могут быть обусловлены влиянием катионов свинца, нарушающих гидролиз экзогенных белков, транспорт аминокислот из просвета кишечника, а также прямым воздействием метаболитов микробиоты на энтероэндокринные и иммунные клетки кишечника, что модулирует количество аминокислот, достигающих печени.

Список использованных источников

1. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat / M. I. Nabil [et al.] // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* – 2012. – Vol. 2, N 1. – P. 41–46. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)
2. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children / M. Ahamed [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2005. – Vol. 346, N 1–3. – P. 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.019>
3. Garza, A. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity / A. Garza, R. Vega, E. Soto // *Med. Sci. Monit.* – 2006. – Vol. 12, N 3. – P. RA57–RA65.
4. Valko, M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M. T. D. Cronin // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12, N 10. – P. 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
5. De Aguiar Vallim, T. Q. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism / T. Q. De Aguiar Vallim, E. J. Tarling, P. A. Edwards // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 17, N 5. – P. 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013>
6. Hepatic amino-acid metabolism in liver cirrhosis and in the longterm course after liver transplantation. / U. J. Tietge [et al.] // *Trans. Int.* – 2003. – Vol. 16, N 1. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00147-002-0484-z>
7. Aromatic amino acid metabolism during liver failure / C. H. Dejong [et al.] // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137, N 6, suppl. 1. – P. 1579S–1585S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1579S>
8. Flora, S. J. S. Heavy metal induced oxidative stress its possible reversal by chelation therapy / S. J. S. Flora, M. Mittal, A. Mehta // *Indian J. Med. Res.* – 2008. – Vol. 128, N 4. – P. 501–523.
9. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: an update / P. Mitra [et al.] // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2017. – Vol. 54, N 7–8. – P. 506–528. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1408562>
10. Role of DNA methylation and folate metabolism in the development of pathological processes in the human body / T. A. Shumatova [et al.] // *Pacif. Med.* – 2013. – N 4. – P. 39–43.
11. Toxicity of environmental lead and the influence of intestinal absorption in children / L. M. Heath [et al.] // *Rev. Environ. Health.* – 2003. – Vol. 18, N 4. – P. 231–250. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.4.231>
12. Liu, G. Characteristics of intestinal bacteria with fatty liver diseases and cirrhosis / G. Liu, Q. Zhao, H. Wei // *Ann. Hepatol.* – 2019. – Vol. 18, N 6. – P. 796–803. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.06.020>
13. Albillos, A. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy / A. Albillos, A. Gottardi, M. Rescigno // *J. Hepatol.* – 2020. – Vol. 72, N 3. – P. 558–577. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.003>
14. Szabo, G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease / G. Szabo // *Gastroenterology.* – 2015. – Vol. 148, N 1. – P. 30–36. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.042>
15. Yu, L. X. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation / L. X. Yu, R. F. Schwabe // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2017. – Vol. 14, N 9. – P. 527–539. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.72>
16. Wang, S. Role of gut microbiota in neuroendocrine regulation of carbohydrate and lipid metabolism via the microbiota-gut-brain-liver axis / S. Wang, Y. J. Yu, K. Adeli // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8, N 4. – Art. 527. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040527>
17. Hultberg, B. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol / B. Hultberg, A. Andersson, A. Isaksson // *Toxicology.* – 2001. – Vol. 156, N 2–3. – P. 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00331-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00331-0)
18. Effect of dietary sulfur-containing amino acids on growth parameters, intestinal morphology, activity of enzymes and nutrient carriers in weaned piglets / E. Zong [et al.] // *J. Anim. Sci.* – 2018. – Vol. 96, N 3. – P. 1130–1139. <https://doi.org/10.1093/jas/skx003>
19. Fukui, H. Leaky gut and gut-liver axis in liver cirrhosis: clinical studies update / H. Fukui // *Gut Liver.* – 2021. – Vol. 15, N 5. – P. 666–676. <https://doi.org/10.5009/gnl20032>
20. Taurine alleviates intestinal injury by mediating tight junction barriers in diquat-challenged piglet models / C. Wen [et al.] // *Front. Physiol.* – 2020. – Vol. 11, N 449. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00449>
21. Hunaiti, A. Lead concentration and the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in the blood of some occupational workers from Irbid City, Jordan / A. Hunaiti, M. Soud, A. Khalil // *Sci. Total Environ.* – 1995. – Vol. 170, N 1–2. – P. 95–100. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04606-2](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04606-2)
22. Vance, J. E. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells / J. E. Vance, G. Tasseva // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1831, N 3. – P. 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.016>
23. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu [et al.] // *Amino Acids.* – 2009. – Vol. 37, N 1. – P. 153–168. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0210-y>
24. Arginine metabolism and its protective effects on intestinal health and functions in weaned piglets under oxidative stress induced by diquat / P. Zheng [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2017. – Vol. 117, N 11. – P. 1495–1502. <https://doi.org/10.1017/S0007114517001519>
25. Chandel, N. S. Amino acid metabolism / N. S. Chandel // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2021. – Vol. 13, N 4. – Art. a040584. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040584>

References

1. Nabil M. I., Esam A. E., Hossam S. El., Yasmin E. A. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. 41–46. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)
2. Ahamed M., Verma S., Kumar A., Siddiqui M. K. J. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Science of the Total Environment*, 2005, vol. 346, no. 1–3, pp. 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.019>
3. Garza A., Vega R., Soto E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Medical Science Monitor*, 2006, vol. 12, no. 3, pp. RA57–RA65.
4. Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, vol. 12, no. 10, pp. 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
5. De Aguiar Vallim T. Q., Tarling E. J., Edwards P. A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism*, 2013, vol. 17, no. 5, pp. 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013>
6. Tietge U. J., Bahr M. J., Manns M. P., Böker K. H. Hepatic amino-acid metabolism in liver cirrhosis and in the longterm course after liver transplantation. *Trans International*, 2003, vol. 16, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00147-002-0484-z>
7. Dejong C. H., van de Poll M. C., Soeters P. B., Jalan R., Damink Olde S. W. Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *Journal of Nutrition*, 2007, vol. 137, no. 6, suppl. 1, pp. 1579S–1585S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1579S>
8. Flora S. J. S., Mittal M., Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 2008, vol. 128, no. 4, pp. 501–523.
9. Mitra P., Sharma Sh., Purohit P. Sharma P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: an update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2017, vol. 54, no. 7–8, pp. 506–528. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1408562>
10. Shumatova T. A., Prikhodchenko N. G., Odenbakh L. A., Efremova I. V. Role of DNA methylation and folate metabolism in the development of pathological processes in the human body. *Pacific Medical*, 2013, vol. 4, pp. 39–43.
11. Heath L. M., Soole K. L., McLaughlin M. L., McEwan G. T. A., Edwards J. W. Toxicity of environmental lead and the influence of intestinal absorption in children. *Reviews on Environmental Health*, 2003, vol. 18, no. 4, pp. 231–250. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.4.231>
12. Liu G., Zhao Q., Wei H. Characteristics of intestinal bacteria with fatty liver diseases and cirrhosis. *Annals of Hepatology*, 2019, vol. 18, no. 6, pp. 796–803. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.06.020>
13. Hultberg B., Andersson A., Isaksson A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*, 2001, vol. 156, pp. 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.003>
14. Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 2015, vol. 148, no. 1, pp. 30–36. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.042>
15. Yu L. X., Schwabe R. F. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2017, vol. 14, no. 9, pp. 527–539. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.72>
16. Wang S. Y. J. Yu., Adeli K. Role of gut microbiota in neuroendocrine regulation of carbohydrate and lipid metabolism via the microbiota-gut-brain-liver axis. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 4, art. 527. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040527>
17. Hultberg B., Andersson A., Isaksson A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*, 2001, vol. 156, no. 2–3, pp. 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00331-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00331-0)
18. Zong, E. Huang P., Zhang W., Li J., Li Y., Ding X., Xiong X., Yin Y., Yang H. Effect of dietary sulfur-containing amino acids on growth parameters, intestinal morphology, activity of enzymes and nutrient carriers in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 2018, vol. 96, no. 3, pp. 1130–1139. <https://doi.org/10.1093/jas/skx003>
19. Fukui H. Leaky gut and gut-liver axis in liver cirrhosis: clinical studies update. *Gut and Liver*, 2021, vol. 15, no. 5, pp. 666–676. <https://doi.org/10.5009/gnl20032>
20. Wen C., Guo Q., Wang W., Duan Y., Zhang L., Li J., He S., Chen W., Li F. Taurine alleviates intestinal injury by mediating tight junction barriers in diquat-challenged piglet models. *Frontiers in Physiology*, 2020, vol. 11, no. 449. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00449>
21. Hunaiti A., Soud M., Khalil A. Lead concentration and the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in the blood of some occupational workers from Irbid City, Jordan. *Science of the Total Environment*, 1995, vol. 170, no. 1–2, pp. 95–100. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04606-2](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04606-2)
22. Vance J. E., Tasseva G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, vol. 1831, no. 3, pp. 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.016>
23. Wu G., Bazer F. W., Davis T. A., Kim S. W., Li P., Rhoads J. M., Satterfield M. C., Smith S. B., Spencer T. E., Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 2009, vol. 37, no. 1, pp. 153–168. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0210-y>
24. Zheng P., Yu B., He J., Yu J., Mao X., Luo Y., Luo J., Huang Z., Tian G., Zeng Q., Che L., Chen D. Arginine metabolism and its protective effects on intestinal health and functions in weaned piglets under oxidative stress induced by diquat. *British Journal of Nutrition*, 2017, vol. 117, pp. 1495–1502. <https://doi.org/10.1017/S0007114517001519>
25. Chandel N. S. Amino acid metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2021, vol. 13, no. 4, p. a040584. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040584>

Информация об авторах

Николаева Ирина Владимировна – ст. преподаватель. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: nikolayeva_i@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-5715-7963>

Шейбак Владимир Михайлович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vsheibak@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-6829-447X>

Дорошенко Евгений Михайлович – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: dgi03@mail.ru

Information about the authors

Irina V. Nikolayeva – Senior lecturer. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: nikolayeva_i@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-5715-7963>

Vladimir M. Sheibak – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vsheibak@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-6829-447X>

Evgeniy M. Doroshenko – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: dgi03@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 634.737:581.522.4
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-206-218>

Поступила в редакцию 15.02.2022
Received 15.02.2022

Н. Б. Павловский

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТИВНОСТИ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ, ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ

Аннотация. На основании результатов 13-летних исследований урожайности 20 сортов голубики высокорослой и 3 сортов голубики полувисокорослой, интродуцированных в Беларуси из разных географических регионов мира, рассчитаны различные показатели адаптивности. Установлено, что сорта голубики высокорослой характеризуются значительной вариабельностью урожайности. В общую изменчивость урожайности сортов голубики преобладающий вклад (45,9 %) вносит взаимодействие факторов «сорт» и «год». Высокоурожайные и урожайные сорта голубики характеризуются большей генетической и экологической пластичностью, но слабой стрессоустойчивостью и низкой стабильностью. По комплексу показателей адаптивности оцениваемые культивары голубики классифицированы на три группы: 1) высокоурожайные и урожайные сорта, пластичные, но нестабильно плодоносящие; 2) среднеурожайные сорта, стабильно плодоносящие, характеризующиеся низкой и средней пластичностью; 3) низкоурожайные сорта, малоприспособленные для промышленного возделывания в условиях Беларуси.

Ключевые слова: голубика высокорослая *Vaccinium corymbosum*, интродукция, сорт, урожайность, адаптивность, пластичность, стабильность, гомеостатичность, устойчивость, Беларусь

Для цитирования: Павловский, Н. Б. Оценка экологической адаптивности сортов голубики высокорослой, интродуцированных в Беларуси / Н. Б. Павловский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 206–218. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-206-218>

Nikolay B. Pavlovskiy

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

EVALUATION OF ECOLOGICAL ADAPTABILITY OF BLUEBERRY CULTIVARS INTRODUCED IN BELARUS

Abstract. Based on the results of a 13-year study of the yield of 20 cultivars of highbush blueberry and 3 cultivars of half-highbush blueberry, introduced in Belarus from different geographical regions of the world, various indicators of adaptability were calculated. It has been established that tall blueberry cultivars are characterized by significant yield variability. The prevailing contribution to the overall yield variability of blueberry cultivars (45.9 %) was made by the interaction of factors “cultivar × year”. High-yielding and yielding cultivars of blueberries are characterized by greater genetic and ecological plasticity, but weak stress resistance and low stability. According to the set of adaptability indicators, the assessed blueberry cultivars are classified into 3 groups: 1) high-yielding and yielding cultivars, plastic, but unstable fruiting; 2) medium-yielding cultivars, stably fruiting, characterized by low and medium plasticity; 3) low-yielding cultivars unsuitable for industrial cultivation in Belarus.

Keywords: highbush blueberry *Vaccinium corymbosum*, introduction, cultivar, productivity, adaptability, plasticity, stability, homeostasis, stability, Belarus

For citation: Pavlovskiy N. B. Evaluation of ecological adaptability of blueberry cultivars introduced in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 206–218 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-206-218>

Введение. Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) – относительно новая, интродуцированная в Беларуси ягодная культура, родиной которой является Северная Америка. В последние годы голубика приобретает все большую популярность в промышленном и приусадебном садоводстве республики [1]. Выявление сортов этой культуры, характеризующихся высокой продуктивностью, экологической пластичностью и стабильностью при воздействии стресс-факторов новых условий среды, является одной из важнейших задач интродукционных исследований.

Для оценки соответствия сорта условиям выращивания и его реакции на изменения этих условий предложено использовать пластичность и стабильность сорта как меру онтогенетической адаптивности и гомеостатичности растений [2]. Под экологической пластичностью подразумева-

ется средняя реакция растительного таксона на изменение условий среды, под стабильностью – отклонение эмпирических данных в каждом условии среды от этой средней реакции [3].

Экологическую пластичность и стабильность сортов можно оценивать, используя такие признаки, как морфометрические параметры растения, их устойчивость, содержание вещества и др. [3]. Одним из важнейших как с биологической, так и с хозяйственной точки зрения является репродуктивный критерий, так как в нем проявляется итог всей жизнедеятельности растения. В. А. Медведев и А. А. Ильенко [4] подчеркивают, что показатель, отражающий результат жизнедеятельности растения, является объективной итоговой оценкой успешности интродукции, т. е. выходным параметром системы растение–среда. По мнению этих авторов, именно выходные параметры системы позволяют судить о всех без исключения видах устойчивости, индуцированных всем комплексом стрессовых факторов, т. е. интегральным оценочным критерием итоговой оценки успешности интродукции. К тому же репродуктивный критерий обладает свойством прямой измеримости. Применительно к растениям голубики данный показатель отражает способность сорта в новых условиях среды формировать высокую и стабильную урожайность, являющуюся конечной целью интродукции ягодных растений.

В настоящее время разработан ряд методических подходов и статистических показателей оценки экологической адаптивности генотипов различных сельскохозяйственных культур [2, 3, 5, 6].

Целью настоящих исследований являлась оценка экологической адаптивности сортов голубики высокорослой по признаку «урожайность», а также выделение культиваров, сочетающих высокую продуктивность и экологическую адаптивность.

Объекты, методика и условия исследования. Исследования проводились в течение 2004–2016 гг. в отраслевой лаборатории интродукции и технологии нетрадиционных ягодных растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси, расположенной в Ганцевичском районе Брестской области (N 52°74', E 26°38').

Объектом исследований являлись интродуцированные из разных эколого-географических регионов мира растения 20 сортов голубики высокорослой: 'Bluecrop', 'Blueray', 'Bluetta', 'Coville', 'Croatan', 'Darrow', 'Duke', 'Earliblue', 'Hardyblue', 'Herbert', 'Jersey', 'Nelson', 'Patriot', 'Rubel', 'Weymouth' (США), 'Reka' (Новая Зеландия), 'Bluerose', 'Carolinablue', 'Denise Blue' (Австралия) и 3 сорта голубики полувисокорослой: 'Northblue', 'Northcountry', 'Northland' (США). В качестве стандарта был принят районированный в Беларуси и широко распространенный среднеспелый сорт 'Bluecrop'.

Насаждения голубики были созданы двулетними корнесобственными саженцами в 1999 г. Схема посадки растений – 2,0×1,5 м. Почва на участке торфяно-глеевая, мелиорированная, верхового типа на пушицево-сфагновом торфе, подстилаемая рыхлым разнородным песком. Торф среднеразложившийся с pH_{H_2O} 4,5. Приствольная полоса насаждений замульчирована древесными опилками слоем 10 см и шириной 1 м. Между рядами содержались в естественном задернении. Насаждения были оборудованы системой орошения, которое использовалось в засушливые периоды. Оценка сортов проводилась на естественном фоне, без защиты растений от вредных организмов.

Интродукционные исследования выполнены в соответствии с «Программой и методикой сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [7].

Оцениваемый признак – урожайность ягод. Учет урожайности проводили ежегодно весовым способом [7]. Сбор плодов осуществляли в 2–5 приема с каждого учетного растения по мере созревания ягод. Среднюю многолетнюю урожайность сортов голубики определяли с момента вступления растений в стадию промышленного плодоношения (6 лет). Фактором воздействия являлись почвенно-климатические условия пункта интродукции в годы исследований. По величине урожайности исследуемые сорта классифицировали на следующие группы: высокоурожайные (4 кг/раст и выше), урожайные (3–4 кг/раст), среднеурожайные (2–3 кг/раст), малоурожайные (менее 2 кг/раст).

Для оценки адаптивных свойств исследуемых сортов голубики были рассчитаны следующие статистические показатели: средняя урожайность ($\bar{x} = Y$), коэффициент (экологической) вариации (V), экологическая пластичность (b_i), стрессоустойчивость ($Y_{\min} - Y_{\max}$), генетическая пластичность ($(Y_{\min} + Y_{\max})/2$), коэффициент адаптивности (K_a), стабильность (фенотипическая) (S_{di}^2), гомеостатичность (Hom), селекционная ценность (Sc).

Значения коэффициентов b_i , V и показателя S_{di}^2 рассчитывали на основе математической модели S. A. Eberhart, W. A. Russell [8].

Показатели $Y_{\min} - Y_{\max}$ и $(Y_{\min} + Y_{\max})/2$ вычисляли по формулам А. А. Rossille, J. Hamblin [9], коэффициент K_a – по методике Л. А. Животкова с соавт. [10], Hom и Sc – по формулам В. В. Хангильдина, Н. А. Литвиненко [11].

Характеристика погодных условий выполнена по данным метеостанции г. Ганцевичи. Для оценки уровня влагообеспеченности территории вычисляли гидротермический коэффициент Селянинова (ГТК) как отношение суммы осадков к сумме среднесуточных температур (10 °C и выше) с коэффициентом 0,1 [12]. Величина ГТК в пределах 1,0–1,4 указывает на оптимальное увлажнение почвы, более 1,4 – на избыточное, менее 1,0 – на засуху. Погодно-климатические показатели (сумма осадков, сумма температур, среднесуточная температура воздуха и ГТК) определяют за период роста и созревания ягод голубики (июнь–июль).

Метеорологические условия в годы исследований значительно варьировались (табл. 1). Наиболее благоприятные погодные условия для роста и развития плодов голубики были в 2009 г. (ГТК составил 2,30, индекс среды (I_j) – 1,23) (табл. 2). В 2009 г. за период роста и созревания плодов голубики выпало 247 мм осадков, что превысило норму на 67 мм (37 %), а температура воздуха находилась на уровне средней многолетней (17,7 °C). Неблагоприятные метеорологические условия для плодоношения голубики сложились в 2005 и 2014 гг. Наиболее холодным был сезон 2014 г. (ГТК составил 1,65, I_j – 0,08). В целом метеорологические условия в 2004–2016 гг. существенно отличались по годам, что позволило оценить исследуемые сорта голубики на разном погодно-климатическом фоне.

Т а б л и ц а 1. Погодно-климатические условия в июне–июле 2004–2016 гг. в Ганцевичском районе

Table 1. Weather-climatic conditions in June–July 2004–2016 in the Gantsevichi district

Показатель	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Сумма атмосферных осадков, мм	179	77	162	312	175	247	91	279	209	171	121	92	158
Сумма температур воздуха, °C	1009	1066	1109	1117	1060	1073	1247	1165	1120	1124	1125	1092	1163
Среднесуточная температура воздуха, °C	16,5	17,5	18,2	18,5	17,4	17,7	20,2	19,2	18,4	18,4	18,6	18,1	19,1
Гидротермический коэффициент Селянинова	1,77	0,72	1,46	2,80	1,65	2,30	0,73	2,39	1,87	1,52	1,07	0,84	1,36

Т а б л и ц а 2. Средняя урожайность сортов голубики высокорослой и индексы условий среды в 2004–2016 гг., кг/раст

Table 2. Average yield of highbush blueberry cultivars and indices of environmental conditions in 2004–2016, kg/plant

Сорт	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	ΣY_i	Y_i
Bluecrop	2,30	1,38	1,90	0,56	1,50	2,28	2,40	0,70	3,90	4,34	1,56	3,14	1,44	30,34	2,33
Blueray	0,70	0,80	1,60	0,74	1,80	3,66	1,62	1,26	2,26	1,72	1,82	2,20	1,30	22,74	1,75
Bluerose	0,34	0,18	0,42	0,22	0,58	0,80	0,60	0,08	1,08	0,20	0,26	0,72	0,50	6,36	0,49
Bluetta	0,56	1,50	1,86	1,49	1,80	2,82	2,10	2,90	3,80	5,60	0,70	4,30	2,06	32,10	2,47
Carolinablue	0,20	0,20	0,28	0,01	0,20	0,42	0,50	0,50	0,30	0,20	0,58	0,70	0,90	5,58	0,43
Coville	1,46	0,76	2,40	0,52	3,10	2,48	2,50	0,90	2,18	2,42	1,08	1,72	1,38	25,88	1,99
Croatan	0,40	0,14	1,06	1,13	2,60	1,90	1,00	0,12	1,40	4,00	0,40	3,48	3,06	20,96	1,61
Darrow	1,00	0,46	1,02	0,50	2,00	2,10	1,10	1,32	1,60	2,20	0,88	1,34	1,70	17,92	1,38
Denise Blue	2,00	1,50	3,00	1,46	2,20	4,00	3,00	2,00	7,90	4,40	3,08	3,88	2,08	43,04	3,31
Duke	0,80	0,94	1,56	1,52	1,30	2,10	2,10	1,10	5,72	6,00	2,08	3,68	1,74	30,06	2,31
Earliblue	2,12	1,32	1,40	0,78	1,18	3,60	1,50	1,14	2,76	2,30	1,50	3,30	2,00	26,84	2,06
Elizabeth	1,00	0,92	3,50	0,86	3,80	3,50	2,00	2,20	0,80	3,60	0,72	2,94	1,62	31,60	2,43
Hardyblue	0,56	1,02	1,94	0,80	2,68	3,00	1,10	0,30	1,90	3,10	1,56	2,22	1,32	23,40	1,80

Окончание табл. 2

Сорт	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	ΣY_i	Y_i
Herbert	0,38	0,50	2,34	0,94	3,22	3,70	0,92	0,10	2,30	2,10	1,40	1,60	1,04	20,90	1,61
Jersey	1,26	1,54	2,68	0,86	3,80	3,60	4,92	2,40	4,40	3,90	1,30	1,56	2,34	36,46	2,80
Nelson	1,00	0,20	0,30	0,75	1,10	1,20	0,92	0,50	0,72	2,90	0,22	3,12	1,38	14,46	1,11
Northblue	1,16	1,68	3,56	2,02	0,80	6,90	0,60	7,80	2,60	4,50	0,52	7,60	4,28	42,46	3,27
Northcountry	0,60	0,92	2,40	2,31	1,10	5,10	1,40	7,92	4,80	7,60	0,46	5,54	3,14	42,68	3,28
Northland	3,50	2,32	2,74	0,14	3,00	4,46	2,48	2,22	1,48	2,10	1,82	2,30	2,50	33,92	2,61
Patriot	0,40	0,90	3,54	2,41	4,50	4,90	3,80	3,00	6,42	4,80	0,72	6,96	3,28	43,82	3,37
Reka	3,70	0,90	3,50	1,06	2,80	6,40	2,76	3,10	6,00	3,60	1,70	0,92	3,76	42,94	3,30
Rubel	2,00	3,40	4,66	1,47	4,30	8,14	4,30	4,38	7,76	2,30	3,00	4,26	3,00	59,50	4,58
Weymouth	3,76	6,12	3,30	2,03	8,00	6,76	4,50	3,60	5,40	2,98	2,02	14,00	3,00	66,04	5,08
ΣY_j	31,20	29,60	50,96	55,38	57,36	83,82	48,12	49,54	77,48	76,86	29,38	81,48	48,82	720,00	55,38
Y_j	1,36	1,29	2,22	2,41	2,49	3,64	2,09	2,15	3,37	3,34	1,28	3,54	2,12		2,41
I_j	-1,05	-1,12	-0,21	0	0,08	1,23	-0,32	-0,26	0,96	0,93	-1,13	1,13	-0,29		

Год с максимальным проявлением исследуемого признака и самым высоким значением I_j принят в оценках урожайности как Y_{\max} (2009 г.), с минимальным проявлением урожайности и наименьшим показателем индекса среды – за Y_{\min} (2014 г.). Оценку экологической адаптивности сортов голубики проводили на основании ранжирования вычисленных показателей по возрастанию их важности, присваивая им числа от 1 до 23.

Вычисление статистических показателей выполняли с применением пакета анализа данных программы Microsoft Excel на 95 %-ном уровне значимости.

Результаты и их обсуждение. Оцениваемые сорта голубики за 13-летний период исследования реализовывали генетический потенциал продуктивности под влиянием внешних факторов среды пункта интродукции по-разному, о чем свидетельствует широкий интервал изменчивости средней урожайности как по сортам, так и по годам.

Средняя урожайность исследуемых культиваров голубики варьировалась от 0,43 кг/раст у сорта ‘Carolinablue’ до 5,08 кг/раст у сорта ‘Weymouth’ (табл. 2). В наиболее благоприятный по температурному режиму и количеству выпавших осадков 2009 г. ($I_j = 1,23$) среднесортная урожайность голубики составила 3,64 кг/раст. В 2014 г., который был неблагоприятным для плодоношения этой культуры ($I_j = -1,13$), средняя урожайность исследуемых сортов была в 2,8 раза ниже и составила 1,28 кг/раст. Более детальный анализ ягодной продуктивности оцениваемых сортов голубики в условиях пункта интродукции выполнен нами ранее [13].

На основании результатов двухфакторного дисперсионного анализа выявлены достоверные различия по урожайности у исследуемых сортов голубики – фактический критерий Фишера (F_{ϕ}) больше табличного критерия ($F_{0,05}$) как по фактору год ($F_{\phi} = 9,27$), так и по фактору сорт ($F_{\phi} = 8,92$), что свидетельствует о наличии связи между внешними условиями и генотипом для всей совокупности оцениваемых культиваров (табл. 3). Анализ доли вклада каждого фактора показал, что колебания ягодной продуктивности голубики на 45,9 % определяет взаимодействие факторов «сорт × год». Это указывает на большой резерв дальнейшего повышения урожайности голубики и ее стабильности за счет использования высокопродуктивных и адаптивных сортов этой культуры. Существенное влияние (35,5 %) на урожайность голубики оказывали погодные условия года, что свидетельствует о преобладающей доле средовых условий по годам испытаний и о значимости их влияния на фенотипическую изменчивость продуктивности. Применение агротехнических мероприятий (орошение, защита от заморозков, града и др.), направленных на снижение влияния неблагоприятных метеорологических условий, будет содействовать повышению продуктивности голубики. Влияние сорта как отдельного фактора было менее значимо и составило 18,6 %.

Т а б л и ц а 3. Значимость и влияние факторов на урожайность голубики высокорослой по данным двухфакторного дисперсионного анализа (2004–2016 гг.)

T a b l e 3. Significance and influence of factors on the yield of highbush blueberry according to two-way analysis of variance (2004–2016)

Источник варьирования	Степень свободы	Сумма квадратов	Дисперсия	F_{ϕ}	$F_{0,05}$	Влияние фактора, %
Год	12	374,6	17,0	9,27	1,58	35,5
Сорт	22	196,5	16,4	8,92	1,79	18,6
Сорт × год	264	484,7	1,84			45,9

Одной из важнейших адаптационных характеристик сорта в новых климатических условиях является его стрессоустойчивость, которая определяется по разности между минимальной и максимальной урожайностью ($Y_{\min} - Y_{\max}$). Этот показатель, отражающий уровень устойчивости сорта к стрессовым условиям произрастания, имеет отрицательное значение (чем меньше разница между минимальной и максимальной урожайностью, тем выше стрессоустойчивость культивара и шире диапазон его приспособительных возможностей [9]). Среди исследуемых культиваров наиболее высокая стрессоустойчивость ($-0,02$ кг/раст) отмечена у сорта 'Duke' (табл. 4), достигнутая за счет относительно высокой урожайности в стрессовый 2014 г. и низкой урожайности в 2009 г. с высоким I_j (1,23). Невысокая разница между максимальной и минимальной урожайностью отмечена у сортов 'Bluerose', 'Carolinablue' и 'Nelson', отличающихся низкой продуктивностью как в благоприятных, так и в неблагоприятных условиях среды. По данному критерию положительно характеризовался высокоурожайный сорт 'Denise Blue' ($-0,92$ кг/раст). Наиболее низкую стрессоустойчивость ($-6,38$ кг/раст) проявил высокоурожайный сорт 'Northblue' по причине нестабильного плодоношения из-за периодического повреждения цветковых почек возвратными морозами [14]. Низкие показатели устойчивости к стрессу также отмечены у сортов 'Weymouth', 'Northcountry', 'Patriot', 'Reka' и 'Rubel', характеризующихся высокой, но неустойчивой урожайностью. Следует отметить, что для практического использования интерес представляют высокопродуктивные генотипы с незначительной разницей между максимальной и минимальной урожайностью, т. е. устойчивые к стрессовым воздействиям абиотических факторов.

Т а б л и ц а 4. Показатели урожайности и экологической адаптивности сортов голубики высокорослой по признаку «урожайность» за 2004–2016 гг.

T a b l e 4. Indicators of yield and ecological adaptability of highbush blueberry cultivars based on "yield" for 2004–2016

Сорт	Урожайность ($\bar{x} \pm m_x$), кг/раст	V, %	$Y_2 - Y_1$, кг/раст	$(Y_2 + Y_1)/2$, кг/раст	b_i	S_{di}^2	Hom	Ka	Sc
Bluecrop (st)	2,33 ± 0,75	46	-0,72	1,92	0,80	0,23	4,89	1,01	1,59
Blueray	1,75 ± 0,51	43	-1,84	2,74	0,66	0,43	4,08	0,72	0,87
Bluerose	0,49 ± 0,19	58	-0,54	0,53	0,20	0,03	0,32	0,20	0,16
Bluetta	2,47 ± 0,96	57	-2,12	1,76	1,39	2,76	4,29	0,97	0,61
Carolinablue	0,43 ± 0,15	52	-0,16	0,50	0,01	0	0,84	0,20	0,59
Coville	1,99 ± 0,58	42	-1,40	1,78	0,47	0,21	4,66	0,85	0,87
Croatan	1,61 ± 0,89	81	-1,50	1,15	1,06	1,30	1,98	0,61	0,34
Darrow	1,38 ± 0,35	37	-1,22	1,49	0,45	0,19	3,66	0,64	0,58
Denise Blue	3,31 ± 1,13	50	-0,92	3,54	1,04	1,64	6,60	1,36	2,55
Duke	2,31 ± 1,19	75	-0,02	2,09	1,42	1,79	3,05	0,90	2,29
Earliblue	2,06 ± 0,56	40	-2,10	2,55	0,71	0,47	5,17	0,87	0,86
Elizabeth	2,43 ± 0,94	57	-2,78	2,11	0,78	0,57	4,25	1,00	0,50
Hardyblue	1,80 ± 0,62	51	-1,44	2,28	0,76	0,72	3,52	0,75	0,94
Herbert	1,61 ± 0,74	68	-2,30	2,55	0,84	0,68	2,38	0,65	0,61
Jersey	2,80 ± 0,83	44	-2,30	2,45	0,72	0,51	6,37	1,19	1,01
Nelson	1,11 ± 0,63	83	-0,98	0,71	0,71	0,43	1,34	0,43	0,92
Northblue	3,27 ± 1,87	84	-6,38	3,71	1,88	3,15	3,87	1,29	0,25

Окончание табл. 4

Сорт	Урожайность ($\bar{x} \pm m_x$), кг/раст	V, %	$Y_2 - Y_1$, кг/раст	$(Y_2 + Y_1)/2$, кг/раст	b_i	S_{di}^2	Hom	Ka	Sc
Northcountry	3,28 ± 1,79	80	-4,64	2,78	2,14	4,13	4,09	1,10	0,29
Northland	2,61 ± 0,52	29	-2,64	3,14	0	0,06	8,85	1,22	1,06
Patriot	3,37 ± 1,49	65	-4,18	2,81	2,23	4,49	5,16	1,28	0,49
Reka	3,30 ± 1,11	50	-4,70	4,05	0,77	0,90	6,64	1,42	0,87
Rubel	4,58 ± 1,43	46	-5,14	5,57	1,31	1,67	9,99	1,96	1,69
Weymouth	5,08 ± 2,18	63	-4,74	4,39	1,85	3,18	8,04	2,18	1,52

Генетическую пластичность сорта ($(Y_{\min} + Y_{\max})/2$) отражает средняя урожайность в контрастных (стрессовых и нестрессовых) условиях. Чем больше значение этого показателя, тем выше степень соответствия между генотипом культивара и факторами среды [9]. По результатам наших исследований, высокой генетической пластичностью обладают сорта голубики 'Rubel' (5,57 кг/раст), 'Weymouth' (4,39 кг/раст) и 'Reka' (4,05 кг/раст). Следует подчеркнуть, что эти культивары характеризуются относительно высокой урожайностью. Очень низкие показатели генетической гибкости отмечены для низкоурожайных сортов 'Carolinablue' (0,50 кг/раст), 'Bluerose' (0,53 кг/раст) и 'Nelson' (0,71 кг/раст), которые характеризуются как высокострессоустойчивые.

Для оценки адаптивности генотипа исследователи используют коэффициент вариации (V). Некоторые авторы считают, что этот показатель характеризует стабильность генотипа [5, 15], другие – что он является одним из критериев оценки его пластичности [16–19]. В условиях сравнительного испытания культиваров голубики величина коэффициента вариации их урожайности варьировалась от 29 до 84 %. Самым стабильным культиваром по этому показателю был среднеурожайный сорт 'Northland' (29 %). Относительно высокие показатели коэффициента вариации (80–84 %), указывающие на сильную вариабельность урожайности по годам, отмечены у сортов 'Croatan', 'Nelson', 'Northblue' и 'Northcountry'.

Важнейшим показателем оценки адаптивности сортов является их экологическая пластичность. По мнению многих исследователей, пластичность – это модифицируемость признака, позволяющая приспособливаться к изменяющимся условиям среды [16, 19]. К пластичным относят сорта с повышенным откликом на внешние условия. Реакцию сорта на изменение условий среды отражает коэффициент линейной регрессии (b_i) [8]. Сорта с $b_i > 1$ требовательны к среде обитания и в благоприятных условиях продуцируют максимальную урожайность. При этом чем выше значение b_i , тем большей зависимостью от внешних условий обладает сорт. Культивары с повышенным откликом на внешние условия среды относят к сортам интенсивного типа [8]. Культивары с $b_i < 1$ проявляют слабую реакцию на изменение внешних условий, чем в среднем все оцениваемые сорта. Такие культивары считают экстенсивными. При $b_i = 1$ имеется полное соответствие изменения внешних условий изменению признака сорта.

Полученные результаты показывают, что среди оцениваемых культиваров наиболее пластичным являлся сорт 'Patriot' (2,23), у которого формирование урожая плодов происходило с более высокой зависимостью от изменяющихся экологических условий, чем у других сортов (табл. 4). По мере снижения коэффициента регрессии сорта голубики расположились в следующей последовательности: 'Northcountry' (2,14), 'Northblue' (1,88), 'Weymouth' (1,85), 'Duke' (1,42), 'Bluetta' (1,39), 'Rubel' (1,31). У сортов 'Croatan' (1,06) и 'Denise Blue' (1,04) значения коэффициента регрессии оказались близкими к единице, соответственно, эти культивары адекватно реагируют на изменяющиеся внешние условия. Слабее других сортов (экстенсивно) на изменение экологических условий откликались культивары 'Northland' (0) и 'Carolinablue' (0,01). Поскольку сорт 'Northland' характеризуется относительно высокой урожайностью и низкой пластичностью, его можно отнести к полуинтенсивному типу. Также полуинтенсивными можно считать сорта 'Bluecrop', 'Earliblue', 'Elizabeth', 'Jersey' и 'Reka' с $b_i < 1$ и средней урожайностью ягод более 2,0 кг/раст. Эти культивары сочетают в себе способность обеспечивать умеренную урожайность и низкую зависимость от экологических условий.

Потенциал модификационной и генотипической изменчивости признаков растений наряду с пластичностью отражает критерий «стабильность» [8]. Понятие «стабильность» используется

в широком и узком смысле слова. В широком смысле стабильными считаются те генотипы, у которых изменение условий среды не влияет на развитие признаков. В узком смысле ее определяют как степень отклонения признака на изменение условий среды конкретного генотипа от среднего отклика всей выборки генотипов. Для количественной оценки стабильности S. A. Eberhart, W. A. Russell [8] предложили использовать показатель дисперсии (S_{di}^2), параметр отклонения которой характеризует стабильность генотипа в различных условиях среды. Наибольшую ценность представляют сорта, у которых значение дисперсии стремится к нулю: такие культивары относятся к высокостабильным, и, соответственно, чем выше значение дисперсии, тем более нестабилен сорт. Среди изучаемых таксонов голубики самым стабильным являлся сорт 'Carolinablue' (0), который ежегодно давал самую низкую урожайность. Следует отметить, что и у других низкоурожайных сортов, таких как 'Bluegose', 'Coville' и 'Darrow', отмечена относительно стабильная урожайность. Высокая стабильность плодоношения отмечена у среднеурожайных сортов 'Bluecrop' (0,23) и 'Northland' (0,06). Самым нестабильным сортом являлся 'Patriot' (4,49), характеризующийся относительно высокой урожайностью – 3,37 кг/раст. Сравнительно высокие значения дисперсии (3,15–4,13), указывающие на нестабильность плодоношения, характерны также для высокоурожайных сортов голубики 'Northblue', 'Northcountry' и 'Weymouth', продуцирующих урожайность 3,0 кг/раст и более. Одной из основных причин низкой стабильности урожайности сортов 'Northcountry', 'Northblue', 'Patriot', 'Weymouth' является высокая отзывчивость их генеративной сферы на зимние оттепели и ее повреждение возвратными морозами [14]. На этом фоне предпочтительно выделяются высокоурожайные и относительно стабильные сорта 'Denise Blue' и 'Reka', а также среднеурожайные культивары 'Bluecrop', 'Duke', 'Earliblue', 'Elizabeth', 'Jersey'.

Способность растения поддерживать внутреннее равновесие и реализовывать генетически детерминированные возможности сорта при отклонении экологических условий от нормы, определяемая как гомеостаз, заключается в проявлении «буферности» культиваров против сезонных вариаций условий среды [8]. Проявление гомеостаза связано с адаптивностью и свидетельствует об экологической выносливости сорта [11]. В нашем случае общая гомеостатичность сорта (Hom) – это способность сорта давать высокую урожайность в сезоны с благоприятными погодными условиями и минимально снижать ее в годы с неблагоприятными условиями. Среди исследуемых сортов голубики наибольший уровень гомеостатичности (9,99) отмечен у высокоурожайного сорта 'Rubel'. Следует подчеркнуть, что второй по величине уровень гомеостатичности характерен для среднеурожайного сорта 'Northland' (8,85) за счет минимизации последствий неблагоприятных погодно-климатических факторов и, как результат, получения стабильной урожайности. Относительно высокие значения гомеостатичности свойственны высокоурожайным сортам 'Weymouth' (8,04), 'Reka' (6,64), 'Denise Blue' (6,60) и 'Jersey' (6,37), характеризующимся относительно высокой вариабельностью плодоношения. Слабый уровень гомеостатичности отмечен для низкопродуктивных и нестабильно плодоносящих сортов 'Bluegose' (0,32) и 'Carolinablue' (0,84).

По селекционной ценности (Sc) высокими показателями, превышающими значения стандартного сорта 'Bluecrop' (1,59), отличались культивары 'Denise Blue' (2,55), 'Duke' (2,29) и 'Rubel' (1,69), для которых характерна средняя и высокая урожайность и относительно стабильное плодоношение.

Для оценки продуктивного и адаптивного потенциала Л. А. Животковым с соавт. [10] предложено использовать коэффициент адаптивности (Ka), определяемый соотношением урожайности оцениваемого сорта со среднесортной урожайностью за год (табл. 5). Последний показатель отражает общую норму реакции всей совокупности сортов на факторы внешней среды конкретного года, а коэффициент адаптивности показывает реакцию отдельного сорта на сложившиеся условия. При неблагоприятных условиях потенциальная продуктивность реализуется слабо, а адаптивность, наоборот, более выражено. Сравнительный анализ вариабельности коэффициентов адаптивности культиваров голубики показал, что складывающиеся в зависимости от года факторы внешней среды приводили как к сглаживанию сортовых различий по урожайности (2006, 2009, 2013, 2016 гг.), так к их дифференциации (2004, 2005, 2011, 2015 гг.). Как правило, сортовые различия по урожайности в большей степени проявлялись в годы с менее благоприятными экологическими условиями.

Т а б л и ц а 5. Коэффициенты адаптивности (Ka) сортов голубики по урожайности (2004–2016 гг.)

Table 5. Coefficients of adaptability (Ka) of blueberry cultivars by yield (2004–2016)

Сорт	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	В среднем
Bluecrop	0,74	1,07	0,86	1,45	0,60	0,63	1,15	0,33	1,16	2,30	1,22	0,89	0,67	1,01
Blueray	0,51	0,62	0,72	0,83	0,72	1,01	0,78	0,59	0,67	0,30	1,42	0,62	0,61	0,72
Bluerose	0,25	0,14	0,19	0,25	0,23	0,22	0,29	0,04	0,32	0,06	0,20	0,20	0,24	0,20
Bluetta	0,41	1,16	0,84	0,87	0,72	0,77	1,00	1,35	1,13	1,68	0,55	1,21	0,97	0,97
Carolinablue	0,15	0,16	0,13	0,25	0,08	0,11	0,24	0,23	0,10	0,06	0,45	0,20	0,42	0,20
Coville	1,07	0,59	1,08	1,45	1,24	0,68	1,20	0,42	0,65	0,72	0,84	0,48	0,65	0,85
Croatan	0,29	0,11	0,48	0,58	1,04	0,52	0,48	0,06	0,41	1,20	0,31	0,98	1,44	0,61
Darrow	0,74	0,36	0,46	0,50	0,80	0,58	1,44	0,47	0,47	0,66	0,69	0,38	0,80	0,64
Denise Blue	1,47	1,16	1,35	1,66	0,88	1,10	1,00	0,93	2,34	1,32	2,41	1,09	0,98	1,36
Duke	0,59	0,73	0,70	0,39	0,52	0,58	0,72	0,51	1,70	1,8	1,63	1,04	0,82	0,90
Earliblue	1,56	1,02	0,63	1,13	0,47	0,99	0,48	0,53	0,82	0,69	1,17	0,93	0,94	0,87
Elizabeth	0,74	0,71	1,58	2,07	1,53	0,96	0,96	1,02	0,24	1,08	0,56	0,83	0,76	1,00
Hardyblue	0,41	0,79	0,87	1,12	1,08	0,82	0,53	0,14	0,56	0,93	1,22	0,63	0,62	0,75
Herbert	0,28	0,39	1,05	0,54	1,29	1,02	0,44	0,05	0,68	0,63	1,09	0,45	0,49	0,65
Jersey	0,93	1,19	1,21	1,15	1,53	0,99	2,35	1,12	1,31	1,17	1,01	0,44	1,10	1,19
Nelson	0,74	0,16	0,14	0,37	0,44	0,33	0,44	0,23	0,21	0,87	0,17	0,88	0,65	0,43
Northblue	0,85	1,30	1,60	0,19	0,32	1,90	0,29	3,63	0,77	1,35	0,41	2,15	2,02	1,29
Northcountry	0,44	0,71	1,08	0,71	0,44	1,40	0,67	1,71	1,42	2,28	0,36	1,56	1,48	1,10
Northland	2,57	1,80	1,23	1,24	1,20	1,22	1,19	1,03	0,44	0,63	1,42	0,65	1,18	1,22
Patriot	0,29	0,70	1,59	0,25	1,81	1,35	1,82	1,39	1,91	1,44	0,56	1,97	1,58	1,28
Reka	2,72	0,70	1,58	1,58	1,12	1,76	1,32	1,44	1,78	1,08	1,33	0,26	1,77	1,42
Rubel	1,47	2,64	2,10	3,32	1,73	2,24	2,06	2,04	2,30	0,69	2,34	1,20	1,41	1,96
Weymouth	2,76	4,74	1,49	1,08	3,21	1,86	2,15	1,67	1,60	0,89	1,58	3,95	1,41	2,18
В среднем	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
V, %	80,6	100,2	53,0	73,0	68,3	55,4	62,3	100,5	67,8	52,3	63,0	82,4	46,4	

Самые неблагоприятные погодно-климатические условия, отмеченные в 2014 г. ($I_j = -1,13$), позволили оценить степень адаптивности исследуемых сортов голубики в экстремальных условиях. Наиболее высокий коэффициент адаптивности в сложных погодных условиях отмечен у сорта 'Denise Blue' (2,41). Высокий показатель пластичности характерен для сорта 'Rubel' (2,34). У сортов 'Bluecrop', 'Blueray', 'Duke', 'Earliblue', 'Hardyblue', 'Herbert', 'Jersey', 'Northland', 'Reka' и 'Weymouth' коэффициенты адаптивности также превысили единицу, что указывает на низкую степень выраженности их реакции на экстремальные внешние условия.

В наиболее благоприятный для растений голубики 2009 г. ($I_j = 1,23$) самая высокая урожайность ягод была отмечена у сорта 'Rubel' (8,14 кг/раст), что в 2,2 раза выше среднесортной. Кроме данного культивара в этот год сформировали урожайность выше среднесортной сорта 'Blueray', 'Denise Blue', 'Herbert', 'Northblue', 'Northcountry', 'Northland', 'Patriot', 'Reka' и 'Weymouth', что указывает на их высокую потенциальную продуктивность. Самый низкий коэффициент адаптивности в условиях 2009 г. имел сорт 'Carolinablue' (0,11), что свидетельствует о его слабой реакции на благоприятные внешние условия.

Использование различных параметров оценки адаптивности позволяет разнонаправленно охарактеризовать испытываемые культивары голубики и в то же время несколько усложняет восприятие получаемых данных. Поэтому для оценки согласованности показателей адаптивности между собой и с урожайностью сортов представляет интерес проведение корреляционного анализа. Оценка взаимосвязи показателей адаптивности голубики высокорослой показала, что более урожайные сорта характеризуются большей генетической пластичностью ($r = 0,90$) и слабой стрессоустойчивостью ($r = -0,77$) (табл. 6). В свою очередь генетически пластичные культивары обла-

дают относительно низкой стрессоустойчивостью ($r = 0,46$). Аналогичная тенденция наблюдается при сравнении экологической пластичности и стабильности: для более урожайных сортов голубики характерна большая экологическая пластичность ($r = 0,68$) и низкая стабильность ($r = 0,65$), а для пластичных сортов свойственна слабая стабильность ($r = 0,96$), что полностью согласуется с исследованиями А. В. Кильчевского и Л. В. Хотылевой [20], согласно которым генотип не может быть одновременно стабильным и пластичным по изучаемому признаку.

Т а б л и ц а 6. Корреляционная зависимость между показателями продуктивности и адаптивности голубики высокорослой

T a b l e 6. Correlation between indicators of productivity and adaptability of highbush blueberry

Показатель	\bar{x}	V	$Y_2 - Y_1$	$(Y_2 + Y_1)/2$	b_i	S_{di}^2	Hom	Ka	Sc
\bar{x}	1,00								
V	0,03	1,00							
$Y_2 - Y_1$	-0,77	-0,19	1,00						
$(Y_2 + Y_1)/2$	0,90	-0,15	-0,76	1,00					
b_i	0,68	0,60	-0,63	0,46	1,00				
S_{di}^2	0,65	0,53	-0,62	0,41	0,96	1,00			
Hom	0,83	-0,47	-0,56	0,86	0,22	0,22	1,00		
Ka	0,99	-0,09	-0,74	0,92	0,56	0,54	0,89	1,00	
Sc	0,41	-0,19	0,17	0,43	0,07	0,00	0,48	0,45	1,00

Следует отметить, что такая зависимость, когда при увеличении пластичности генотипа уменьшается его стабильность, характерна и для других сельскохозяйственных культур [17, 21, 22]. Это обусловлено тем, что сорта с повышенной пластичностью обладают более высокой чувствительностью не только к благоприятным, но и к неблагоприятным условиям. Причина такой сопряженности, по мнению А. А. Жученко [23], кроется в генетической детерминации нормы реакции, фенотипическое проявление которой зависит от действия факторов среды и их напряженности.

Тесная положительная корреляционная связь урожайности голубики от генетической ($r = 0,90$) и экологической ($r = 0,68$) пластичности указывает на высокую степень зависимости формирования урожая ягод от внешних условий: более пластичные сорта продуцировали более высокую урожайность. Об этом свидетельствует также сильная прямая связь урожайности с показателями адаптивности ($r = 0,99$) и гомеостатичности ($r = 0,83$).

Известно, что урожайность сорта является результатом взаимодействия «генотип × среда», где в качестве среды выступают как почвенно-климатические условия, так и агротехнические приемы возделывания. Поскольку в наших исследованиях все оцениваемые сорта голубики произрастали в однородных экологических условиях и возделывались по одной технологии, основным фактором, определяющим их адаптивность, являлась индивидуальная приспособляемость (выносливость) сорта к разнообразному воздействию климатических условий. По мнению А. Б. Дьякова и М. В. Труновой [24], не существует сортов, которые могли бы с одинаковым успехом выращиваться во всех природных зонах и экологических условиях. Э. Д. Неттевич [15] считает, что, как правило, сорта соответствуют тем условиям, в которых они селекционировались, так как биологические свойства растений сопряжены с условиями отбора. В нашем случае данную гипотезу можно отнести к сортам голубики ‘Bluerose’ и ‘Carolinablue’, которые селекционированы в Австралии и характеризуются в условиях Беларуси слабой пластичностью, а следовательно, и низкой продуктивностью. Для этих культиваров характерны очень низкие значения ранжирования показателей продуктивности и адаптивности (62,5 и 72,5 соответственно) (табл. 7). В то же время выведенный в Австралии сорт ‘Denise Blue’ характеризуется относительно высокими показателями продуктивности и адаптивности в условиях пункта интродукции и по их ранжированию занимает лидирующее положение (157,5). Высокие показатели адаптивности отмечены у сорта ‘Rubel’ (153,5), отобранного в начале XX в. на североамериканском континенте из естественных популяций *Vaccinium corymbosum*. Этот сорт широко использовался в селекции данной

культуры и является востребованным до настоящего времени [25]. Заслуживает внимание сорт 'Northland', характеризующийся высокими значениями показателей адаптивности и стабильным плодоношением (143). Сорт, распространившимся далеко за пределы ареала, в котором он создавался, и сочетающим относительно высокие показатели урожайности и адаптивности, является североамериканский культивар 'Bluecrop', возделываемый на больших площадях не только на его родине [26], но и в Австралии [27], Германии [28], Польше [29], Украине [30], Беларуси [1] и других странах. Сорт 'Bluecrop' районирован в Беларуси одним из первых (в 2005 г.) [31] и является стандартом (эталоном) при сортоиспытании среднеспелых таксонов данной культуры.

Т а б л и ц а 7. Ранжирование сортов голубики по урожайности и показателям адаптивности

T a b l e 7. Ranging blueberry cultivars by yield and adaptability indicators

Сорт	\bar{x}	v	$y_2 - y_1$	$(y_2 + y_1)/2$	b_i	S_{di}^2	Hom	Ka	Sc	Σ
Bluecrop (st)	12	16,5	20	8	13	18	15	14	20	136,5
Blueray	7	19	13	15	6	16,5	10	7	12	105,5
Bluerose	2	9	21	2	3	22	1	1,5	1	62,5
Bluetta	14	10,5	11	6	18	5	13	12	9,5	99
Carolinablue	1	12	22	1	2	23	2	1,5	8	72,5
Coville	9	20	16	7	5	19	14	9	12	111
Croatan	5,5	3	14	4	16	9	4	4	4	63,5
Darrow	4	22	17	5	4	20	8	5	7	92
Denise Blue	20	14,5	19	19	15	8	19	20	23	157,5
Duke	11	5	23	9	19	6	6	11	22	112
Earliblue	10	21	12	14,5	7,5	15	17	10	11	118
Elizabeth	13	10,5	7	10	12	13	12	13	6	96,5
Hardyblue	8	13	15	11	10	11	7	8	16	99
Herbert	5,5	6	9,5	14,5	14	12	5	6	9,5	82
Jersey	16	18	9,5	12	9	14	18	16	17	129,5
Nelson	3	2	18	3	7,5	16,5	3	3	15	71
Northblue	17	1	1	20	21	4	9	19	2	94
Northcountry	18	4	5	16	22	2	11	15	3	96
Northland	15	23	8	18	1	21	22	17	18	143
Patriot	21	7	6	17	23	1	16	18	5	114
Reka	19	14,5	4	21	11	10	20	21	12	132,5
Rubel	22	16,5	2	23	17	7	23	22	21	153,5
Weymouth	23	8	3	22	20	3	21	23	19	142

Заклучение. Интродуцированные в Беларуси сорта голубики высокорослой характеризуются значительной вариабельностью урожайности. Из 23 оцениваемых культиваров голубики высокоурожайными (4 кг/раст и более) были 2 сорта: 'Rubel', 'Weymouth'; урожайными (3–4 кг/раст) – 5 сортов: 'Denise Blue', 'Northblue', 'Northcountry', 'Patriot', 'Reka'; среднеурожайными (2–3 кг/раст) – 7 сортов: 'Bluecrop', 'Bluetta', 'Duke', 'Earliblue', 'Elizabeth', 'Jersey', 'Northland'; малоурожайными (менее 2 кг/раст) – 9 сортов: 'Blueray', 'Bluerose', 'Carolinablue', Coville', 'Croatan', 'Darrow', 'Hardyblue', 'Herbert', 'Nelson'.

В общую изменчивость урожайности сортов голубики преобладающий вклад вносили взаимодействие факторов «сорт × год» (45,9 %). Существенное влияние (35,5 %) на их урожайность оказывали погодные условия года. Влияние сорта как отдельного фактора составило 18,6 %.

Наиболее высокогомеостатичным культиваром, обладающим генетическим механизмом, способным минимизировать последствия неблагоприятных факторов внешней среды, является сорт 'Rubel'. Сорт 'Denise Blue' обладает высокой гомеостатичностью и генетической пластичностью, что представляет селекционную ценность. Высокая стабильность формирования средней

урожайности ягод свойственна сорту ‘Northland’. Самый пластичный сорт ‘Patriot’ является нестабильным по урожайности.

По комплексу показателей адаптивности оцениваемые культивары голубики классифицированы на следующие группы:

1) высокоурожайные и урожайные сорта, пластичные, но нестабильные, ягодная продуктивность которых изменяется адекватно условиям среды (‘Denise Blue’, ‘Northblue’, ‘Northcountry’, ‘Patriot’, ‘Reka’, ‘Rubel’, ‘Weymouth’); они требовательны к экологическим условиям и только в благоприятных условиях формируют высокую урожайность;

2) среднеурожайные стабильно плодоносящие сорта, характеризующиеся низкой и средней пластичностью, слабо реагирующие на изменения условий среды (‘Bluecrop’, ‘Bluetta’, ‘Duke’, ‘Earliblue’, ‘Elizabeth’, ‘Jersey’, ‘Northland’), которые можно выращивать на экстенсивном агрофоне, где они дадут максимальную продуктивность при минимальных затратах;

3) низкоурожайные сорта ‘Blueray’, ‘Bluerose’, ‘Carolinablue’, ‘Coville’, ‘Croatan’, ‘Darrow’, ‘Hardyblue’, ‘Herbert’, ‘Nelson’, которые малоприспособлены для промышленного возделывания в условиях Беларуси, но некоторые из них могут использоваться для приусадебного садоводства, так как обладают положительными свойствами (например, сорт ‘Hardyblue’ отличается засухоустойчивостью и толерантностью к эдафическим условиям).

Список использованных источников

1. Титок, В. Голубика высокорослая – инновационная культура премиум-класса / В. Титок, А. Веевник, Н. Павловский // Наука и инновации. – 2012. – № 6 (112). – С. 25–27.
2. Потанин, В. Г. Новый подход к оценке экологической пластичности сортов растений / В. Г. Потанин, А. Ф. Алейников, П. И. Степочкин // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 3. – С. 548–552.
3. Пакудин, В. З. Оценка экологической пластичности и стабильности сортов сельскохозяйственных культур / В. З. Пакудин, Л. М. Лопатина // Сельскохозяйств. биология. – 1984. – № 4. – С. 109–113.
4. Медведев, В. А. Выбор критериев для оценки степени успешности интродукции с позиции системного подхода и адаптивной стратегии растений / В. А. Медведев, А. А. Ильенко // Интродукция растений. – 2014. – № 4. – С. 3–11.
5. Удачин, Р. А. Методика оценки экологической пластичности сортов пшеницы / Р. А. Удачин, А. П. Головоченко // Селекция и семеноводство. – 1990. – № 5. – С. 2–6.
6. Децына, А. А. Расчет параметров экологической пластичности и стабильности масличных сортов подсолнечника селекции ВНИИМК / А. А. Децына, И. В. Илларионова, В. О. Щербина // Маслич. культуры. – 2020. – Вып. 3 (183). – С. 31–38.
7. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / ВНИИСПК; под общ. ред. Е. Н. Седова, Т. П. Огальцовой. – Орел: ВНИИСПК, 1999. – 608 с.
8. Экологическая пластичность сельскохозяйственных растений: методика и оценка / В. А. Зыкин [и др.]. – Уфа: РАСХН, 2011. – 97 с.
9. Гончаренко, А. А. Об адаптации и экологической устойчивости сортов зерновых культур / А. А. Гончаренко // Вестн. Рос. акад. сельскохозяйств. наук. – 2005. – № 6. – С. 49–53.
10. Животков, Л. А. Методика выявления потенциальной продуктивности и адаптивности сортов и селекционных форм озимой пшеницы по показателю «урожайность» / Л. А. Животков, З. А. Морозова, Л. И. Секатуева // Селекция и семеноводство. – 1994. – № 2. – С. 3–6.
11. Хангильдин, В. В. Гомеостатичность и адаптивность сортов озимой пшеницы / В. В. Хангильдин, Н. А. Литвиненко // Науч.-тех. бюл. ВСГИ. – 1981. – Вып. 1 (39). – С. 8–14.
12. Иванова, Т. Н. Технология хранения плодов, ягод и овощей: учеб. пособие / Т. Н. Иванова, В. С. Житникова, Н. С. Левгерова. – Орел: Орл. гос. техн. ун-т, 2009. – 203 с.
13. Павловский, Н. Б. Плодоношение сортов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) в Беларуси / Н. Б. Павловский // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2018. – № 4. – С. 486–499.
14. Павловский, Н. Б. Максимальная морозостойкость и устойчивость к возвратным морозам сортов голубики, интродуцированных в Беларусь / Н. Б. Павловский // Плодоводство: сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2014. – Т. 26. – С. 256–270.
15. Неттевич, Э. Д. Влияние условий возделывания и продолжительности изучения на результаты оценки сорта по урожайности / Э. Д. Неттевич // Вестн. Рос. акад. сельскохозяйств. наук. – 2001. – № 3. – С. 34–38.
16. Бебякин, В. М. Экологическая устойчивость сортов и форм яровой твердой пшеницы по массе зерна с растения и зерновому уборочному индексу / В. М. Бебякин // Селекция и семеноводство. – 1993. – № 1. – С. 28–30.
17. Оценка экологической пластичности и стабильности формирования урожайности зерна у сортов гречихи / А. П. Лаханов [и др.] // Докл. Рос. акад. сельскохоз. наук. – 2001. – № 1. – С. 6–9.
18. Чирко, Е. М. Сравнительная оценка зерновой продуктивности и адаптивности сортов проса (*Panicum mili-actum*) в условиях юго-западного региона республики / Е. М. Чирко // Вес. Нац. акадэміі навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2009. – № 3. – С. 49–54.

19. Волкова, Л. В. Оценка сортов яровой мягкой пшеницы по урожайности и адаптивным свойствам / Л. В. Волкова, В. М. Гиряева // Аграр. наука Евро-Северо-Востока. – 2017. – № 4 (59). – С. 19–23.
20. Кильчевский, А. В. Экологическая селекция растений / А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск : Техналогія, 1997. – 372 с.
21. Пономарева, С. В. Оценка урожайности, экологической пластичности и стабильности сортообразцов гороха в условиях Нижегородской области / С. В. Пономарева // Междунар. журн. прикл. и фунд. исслед. – 2018. – № 12–2. – С. 293–297.
22. Децына, А. А. Оценка экологической пластичности и стабильности крупноплодных сортов подсолнечника / А. А. Децына, И. В. Илларионова, В. О. Щербина // Масличные культуры. – 2019. – Вып. 3 (179). – С. 35–39.
23. Жученко, А. А. Адаптивный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы) / А. А. Жученко. – Кишинев : Штиинца, 1988. – 766 с.
24. Дьяков, А. Б. Взаимосвязь между параметрами стабильности и адаптивности сортов / А. Б. Дьяков, М. В. Трунова // Масличные культуры : науч.-техн. бюл. Всерос. науч.-исслед. ин-та масличных культур. – 2010. – Вып. 1. – С. 80–86.
25. Lyrene, P. M. Blueberry breeding / P. M. Lyrene, J. N. Moore // Blueberries for growers, gardeners, promoters / ed. N. F. Childers, P. M. Lyrene. – Florida, Gainesville, 2006. – P. 38–48.
26. Wei, Qiang Yang. Blueberries in the Northwest, USA / Wei Qiang Yang // Blueberries for growers, gardeners, promoters / ed. N. F. Childers, P. M. Lyrene. – Florida, Gainesville, 2006. – P. 206–208.
27. Bell, R. Australian blueberries industry / R. Bell // Blueberries for growers, gardeners, promoters / ed. N. F. Childers, P. M. Lyrene. – Florida, Gainesville, 2006. – P. 250–254.
28. Dierking, S. Blueberries in Germany / S. Dierking // Blueberries for growers, gardeners, promoters / ed. N. F. Childers, P. M. Lyrene. – Florida, Gainesville, 2006. – P. 228–231.
29. Smolarz, K. Cultivation of the High-bush Blueberry in Poland / K. Smolarz, S. Pluta // Acta Horticulturae. – 2014. – Vol. 1017. – P. 199–204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1017.24>
30. Поперечна, О. Лохина – ягода № 1 в Україні за площею комерційних насаджень / О. Поперечна // Ягідник. – 2020. – № 1 (17). – С. 19–21.
31. Государственный реестр сортов / ГУ «Гос. инспекция по испытанию и охране сортов растений»; отв. ред. В. А. Бейня. – Минск : ГУ «Гос. инспекция по испытанию и охране сортов растений», 2020. – 270 с.

References

1. Titok V., Veevnik A., Pavlovskiy N. Highbush blueberry – an innovative premium-class culture. *Nauka i innovatsii* [Science and innovations], 2012, no. 6 (112), pp. 25–27 (in Russian).
2. Potanin V. G., Aleinikov A. F., Stepochkin P. I. A new approach to assessing the ecological plasticity of plant varieties. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii* [Vavilov journal of genetics and breeding], 2014, vol. 18, no. 3, pp. 548–552 (in Russian).
3. Pakudin V. Z., Lopatina L. M. Evaluation of ecological plasticity and stability of agricultural crop varieties. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biology], 1984, no. 4, pp. 109–113 (in Russian).
4. Medvedev V. A., Il'enko A. A. The choice for assessing the degree of success of the introduction from the standpoint of a systematic and responsible attitude to the strategic policy of plants. *Introduktsiya roslin* [Plant introduction], 2014, no. 4, pp. 3–11 (in Russian).
5. Udachin R. A., Golovochenko A. P. Methods for assessing the ecological plasticity of wheat varieties. *Selektsiya i semenovodstvo* [Breeding and seed production], 1990, no. 5, pp. 2–6 (in Russian).
6. Detsyna A. A., Illarionova I. V., Shcherbinina V. O. Calculation of parameters of ecological plasticity and stability of oilseed varieties of sunflowers selected by VNIIMK. *Maslichnye kul'tury* [Oil cultures], 2020, no. 3 (183), pp. 31–38 (in Russian).
7. Sedov E. N., Ogal'tsova T. P. (ed.). *Program and methodology for the study of fruit, berry and nut crops*. Orel, All-Russian Research Institute of Fruit Crops Breeding, 1999. 608 p. (in Russian).
8. Zykin V. A., Belan I. A., Yusov V. S., Kiraev R. S., Chanyshiev I. O. *Ecological plasticity of agricultural plants: methodology and assessment*. Ufa, Russian Academy of Agricultural Sciences, 2011. 97 p. (in Russian).
9. Goncharenko A. A. On the adaptation and environmental sustainability of grain crop varieties. *Vestnik Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk* [Bulletin of the Russian Academy of Agricultural Sciences], 2005, no. 6, pp. 49–53 (in Russian).
10. Zhivotkov L. A., Morozova Z. A., Sekatueva L. I. Methods for identifying the potential productivity and adaptability of varieties and breeding forms of winter wheat in terms of “yield”. *Selektsiya i semenovodstvo* [Breeding and seed production], 1994, no. 2, pp. 3–6 (in Russian).
11. Khangil'din V. V., Litvinenko N. A. Homeostaticity and adaptability of winter wheat varieties. *Nauchno-tekhnicheskii byulleten' Vsesoyuznogo selektsionno-geneticheskogo instituta* [Scientific and Technical Bulletin of the All-Union Breeding and Genetic Institute], 1981, no. 1 (39), pp. 8–14 (in Russian).
12. Ivanova T. N., Zhitnikova V. S., Levgerova N. S. *Technology of storage of fruits, berries and vegetables*. Orel, Orel State Technical University, 2009. 203 p. (in Russian).
13. Pavlovskiy N. B. Fruiting of highbush blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, no. 4, pp. 486–499 (in Russian).

14. Pavlovskiy N. B. Maximum frost resistance and resistance to recurrent frosts of blueberry cultivars introduced in Belarus. *Plodovodstvo: sbornik nauchnykh trudov. Tom 26* [Fruit growing: a collection of scientific papers. Vol. 26], Samokhvalovich, 2014, pp. 256–270 (in Russian).
15. Nettevich E. D. Influence of cultivation conditions and duration of study on the results of yield assessment of a variety. *Vestnik Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk* [Bulletin of the Russian Academy of Agricultural Sciences], 2001, no. 3, pp. 34–38 (in Russian).
16. Bebyakin V. M. Ecological stability of varieties and forms of spring durum wheat by grain weight per plant and grain harvesting index. *Selektsiya i semenovodstvo* [Breeding and seed production], 1993, no. 1, pp. 28–30 (in Russian).
17. Lakhanov A. P., Glazova Z. I., Fesenko A. N., Savkin V. I. Assessment of ecological plasticity and stability of grain yield formation in buckwheat varieties. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk* [Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences], 2001, no. 1, pp. 6–9 (in Russian).
18. Chirko E. M. Comparative assessment of grain productivity and adaptability of millet varieties (*Panicum miliactum*) in the conditions of the southwestern region of the republic. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalyagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agricultural series*, 2009, no. 3, pp. 49–54 (in Russian).
19. Volkova L. V., Gireva V. M. Evaluation of spring soft wheat varieties by yield and adaptive properties. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* [Agrarian science of the Euro-North-East], 2017, no. 4 (59), pp. 19–23 (in Russian).
20. Kil'chevskii A. V., Khotyleva L. V. *Ecological plant breeding*. Minsk, Tekhnalogiya Publ., 1997. 372 p. (in Russian).
21. Ponomareva S. V. Evaluation of yield, ecological plasticity and stability of pea varieties in the conditions of the Nizhny Novgorod region. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* [International Journal of Applied and Fundamental Research], 2018, no. 12–2, pp. 293–297 (in Russian).
22. Detsyna A. A., Illarionova I. V., Shcherbina V. O. Evaluation of ecological plasticity and stability of large-fruited sunflower varieties. *Maslichnye kul'tury* [Oil cultures], 2019, no. 3 (179), pp. 35–39 (in Russian).
23. Zhuchenko A. A. *Adaptive potential of cultivated plants (ecological and genetic bases)*. Kishinev, Shtiintsa Publ., 1988. 766 p. (in Russian).
24. D'yakov A. B., Trunova M. V. The relationship between the parameters of stability and adaptability of varieties. *Maslichnye kul'tury: nauchno-tekhnicheskii byulleten' Vserossiiskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnykh kul'tur* [Oilseeds: scientific and technical bulletin of the All-Russian Research Institute of Oilseeds], 2010, no. 1, pp. 80–86 (in Russian).
25. Lyrene P. M., Moore J. N. Blueberry breeding. *Blueberries for growers, gardeners, promoters*. Florida, Gainesville, 2006, pp. 38–48.
26. Wei Qiang Yang. Blueberries in the Northwest, USA. *Blueberries for growers, gardeners, promoters*. Florida, Gainesville, 2006, pp. 206–208.
27. Bell R. Australian Blueberries Industry. *Blueberries for growers, gardeners, promoters*. Florida, Gainesville, 2006, pp. 250–254.
28. Dierking S. Blueberries in Germany. *Blueberries for growers, gardeners, promoters*. Florida, Gainesville, 2006, pp. 228–231.
29. Smolarz K., Pluta S. Cultivation of the High-bush Blueberry in Poland. *Acta Horticulturae*, 2014, no. 1017, pp. 199–204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1017.24>
30. Poperechna O. Blueberry No. 1 in Ukraine beyond the area of commercial plantings. *Yagidnik* [Berry], 2020, no. 1 (17), pp. 19–21 (in Ukrainian).
31. Beinya V. A. (ed.). *State Register of Cultivars*. Minsk, State Institution “State Inspectorate for Testing and Protection of Plant Varieties”, 2020. 270 p. (in Russian).

Информация об авторе

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

Information about the author

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

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 575:579.852.11
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-219-228>

Поступила в редакцию 10.11.2021
Received 10.11.2021

А. С. Гуринович, Н. Е. Сацункевич, М. А. Титок

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

РАСПРОСТРАНЕНИЕ pBS72-ПОДОБНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ПЛАЗМИД СРЕДИ ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Аннотация. В результате проведенного исследования в изолированных из разных природных источников на территории Беларуси почвенных образцах, содержащих бактерии *B. subtilis*, с частотой 27 % (в 22 образцах из 36 исследованных) выявлены pBS72-подобные репликоны. На основе 99–100 %-ного сходства белков, ответственных за репликацию (Rep-белки) и конъюгацию (белки VirB4, VirB6, VirB11, VirD4, Mob), установлено, что pBS72-подобные конъюгативные плазмиды присутствуют в клетках природных бактерий *B. subtilis*, циркулирующих на территории Пакистана, Китая и Нидерландов, а также в клетках бактерий *B. rugosus*, изолированных на территории Индии. Сходные репликоны (Rep-белки идентичны на 62 %), способные передаваться путем конъюгации (ключевые белки конъюгации идентичны на 60–80 %), обнаружены в бактериях *Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* и *B. subtilis*, выделенных в США, Австралии, Китае и Южной Корее.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, плазмидные репликоны, система конъюгационного переноса

Для цитирования: Гуринович, А. С. Распространение pBS72-подобных конъюгативных плазмид среди природных бактерий рода *Bacillus* / А. С. Гуринович, Н. Е. Сацункевич, М. А. Титок // Вест. Нац. акад. Навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 219–228. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-219-228>

Anastasiya S. Hurynovich, Natallia E. Satsunkevich, Marina A. Titok

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

DISTRIBUTION OF pBS72-LIKE CONJUGATIVE PLASMIDS AMONG NATURAL BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS*

Abstract. As a result of the research pBS72-like replicons were detected with a frequency of 27 % in soil samples isolated from various natural sources on the territory of Belarus, which contained bacteria *B. subtilis* (were detected in 22 samples out of 36 studied). It was established that pBS72-like conjugative plasmids are present in the cells of natural bacteria *B. subtilis* circulating in Pakistan, China, and the Netherlands, and are also found in bacteria *B. rugosus* isolated in India. The homology of proteins responsible for replication (Rep-proteins) and conjugation (VirB4, VirB6, VirB11, VirD4, Mob proteins) was 99–100 %. Similar replicons (Rep proteins are 62 % identical) capable of being transmitted by conjugation (key conjugation proteins are 60–80 % identical) were found in the bacteria *Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* and *B. subtilis*, allocated in the USA, Australia, China and South Korea.

Keywords: bacteria of the genus *Bacillus*, plasmid replicons, conjugation transfer system

For citation: Hurynovich A. S., Satsunkevich N. E., Titok M. A. Distribution of pBS72-like conjugative plasmids among natural bacteria of the genus *Bacillus*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 219–228 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-219-228>

Введение. Повсеместно распространенные бактерии рода *Bacillus*, способные утилизировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, а также синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, используются в биотехнологии в качестве продуцентов чужеродных белков, ферментов, антимикробных соединений, стимуляторов роста растений, пробиотиков [1, 2]. Для практического использования микроорганизмов необходимо комплексное изучение их генома, в том числе и внехромосомных генетических элементов, являющихся частью генетического аппарата и определяющих важнейшие этапы жизнедеятельности бактериальной клетки. Особый интерес представляют плазмиды природных бактерий *B. subtilis*, поскольку данные микроорганизмы признаны безопасными для человека и животных (имеют статус GRAS) и их использование в биотехнологических производствах практически не имеет

ограничений. В клетках бактерий *B. subtilis*, как правило, выявляются внехромосомные генетические элементы небольшого размера (до 10 kb) семейства pC194, содержащие гены общего метаболизма, некоторые из которых способны мобилизоваться на перенос путем конъюгации (например, *pTA1015*, *pTA1060*, *p1414*) [3]. В клетках природных бактерий *B. subtilis* выявлено только две конъюгативные плазмиды – pLS20 и pBS72, которые имеют разные системы инициации репликации и способны передаваться с высокой частотой в изогенных системах скрещиваний, а также мобилизовать перенос в клетки гетерологичных бактерий рода *Bacillus* неконъюгативные внехромосомные генетические элементы разных таксономических групп, содержащих *mobV*-сайт [4, 5]. Интерес к данным внехромосомным генетическим элементам обусловлен прежде всего их способностью обеспечивать горизонтальный перенос генов среди бактерий природных популяций. В связи с этим присутствие конъюгативных плазмид-подобных pBS72 необходимо учитывать при использовании природных бактерий *B. subtilis* в качестве основы биопрепаратов для практического использования (например, в качестве стимуляторов роста растений, пробиотиков для животных).

Целью настоящей работы являлось изучение распространения среди природных бактерий рода *Bacillus* pBS72-подобных конъюгативных плазмид.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 36 почвенных образцов, отобранных из различных природных источников на территории Беларуси. Почвенные образцы в количестве 1 г каждый культивировали в полноценной среде LB [6] при температуре 37 °C в течение 24 ч с последующим выделением тотальной ДНК с помощью саркозидового метода [7].

Для амплификации использовали Taq-ДНК-полимеразу производства ThermoScientific (ЕС) и праймеры производства ОДО «Праймтех» (Беларусь). Реакционная смесь (20 мкл) для полимеразной цепной реакции (ПЦР) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,3 мкмоль/л каждого праймера, 1,25 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для амплификации фрагментов генов бактериальных 16S рРНК размером 1484 п. н. использовали праймеры 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') и 1492r (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3') при режиме амплификации: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 52 °C – 30 с, 72 °C – 1,5 мин (30 циклов); 72 °C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагментов генов *spoA* бактерий *B. subtilis* размером 481 п. н. использовали праймеры F10A (5'-AAA ACT GCA GCA TGT AGC AAG GGT GAA TCC-3') и R10A (5'-CGC GGA TCC CTG CTG CGT ATA ATC TGC-3') при режиме амплификации: 94 °C – 3 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 30 с (30 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации *rep*-области плазмиды pBS72 размером 1920 п. н. использовали праймеры Rep72F (5'-GCC CTT AAG CAT TGA CTT TAG CGA CCC-3') и Rep72R (5'-GCC CTT AAG AGA CTC САА АСГ АГТ СТГ-3') при режиме амплификации: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 68 °C – 4 мин 30 с (30 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента генома плазмиды pBS72 размером 685 п. н. (локус между *orf138* и *orf139*) использовали праймеры F2 (5'-TAA ATC GCT TCC CTC CTT C-3') и R2 (5'-GTT TCC ACT GTC CAG GAG-3') при режиме амплификации: 94 °C – 3 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 42 с (5 циклов); 94 °C – 30 с, 53 °C – 30 с, 72 °C – 42 с (20 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве [8]. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ DNA LadderMix производства ThermoScientific (ЕС).

Поиск и сравнительный анализ плазмид-подобных pBS72 (регистрационный номер в GenBank NCBI – KX711616) осуществляли на основании сходства систем инициации репликации (Rep-белок) и ключевых белков конъюгационного переноса VirB4, VirB6, VirB11, VirD4 и Mob, используя программы BLASTN2.10.0 (сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и Mauve [9].

Результаты и их обсуждение. Ранее с помощью методов рестрикционного анализа и гибридизации плазмидной ДНК было установлено, что 20 % спорообразующих бактерий, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, содержали идентичные плазмиды

размером около 100 kb (обнаружены в 11 штаммах из 55 проверенных) [10, 11]. Для одной из выявленных плазмид (р19) была определена нуклеотидная последовательность области, ответственной за репликацию (регистрационный номер в GenBank NCBI – EF506610) и конъюгацию (регистрационный номер в GenBank NCBI – FJ434456), а для плазмиды рBS72 – полная нуклеотидная последовательность генома (регистрационный номер в GenBank NCBI – KX711616). Сравнительный анализ секвенированных последовательностей позволил установить их полную идентичность. На основании чувствительности к специфическим фагам, а также рекомбинационного анализа все отобранные плазмидсодержащие бактерии были отнесены к виду *B. subtilis* [10]. Отличительной особенностью выявленных плазмидных репликонов являлась их способность передаваться путем конъюгации в жидкой и на плотной средах, а также в почве и обеспечивать конъюгационный перенос мобилизуемых плазмид (показано для плазмиды р19) [5]. Указанное свойство представлялось весьма существенным, поскольку позволяет внехромосомным генетическим элементам распространяться среди бактерий природных популяций. В связи с этим важно было установить присутствие рBS72-подобных плазмид в клетках природных бактерий, циркулирующих на территории Беларуси в настоящее время (впервые репликон был обнаружен в 1999 г.).

Для обнаружения плазмидсодержащих бактерий использовали метод ПЦР. При этом в качестве матрицы в ПЦР добавляли тотальную ДНК, выделенную из почвы. В настоящее время данный методический прием широко используется для характеристики природных микробных популяций и позволяет устанавливать наличие определенных таксономических групп микроорганизмов (в частности, для выявления патогенов), а также отдельных генетических детерминант, присутствующих в геномах почвенной микрофлоры, включающей в том числе и некультивируемые бактерии [12, 13]. Поскольку почвы характеризуются разным составом и могут содержать соединения, ингибирующие протекание ПЦР (например, гуминовые кислоты), для проверки чистоты выделенной тотальной ДНК реакцию проводили с несколькими типами праймеров. На первом этапе использовали праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагментов генов бактериальных 16S рРНК размером 1484 п. н. (рис. 1). Наличие ампликонов искомого размера свидетельствовало о наличии в почвенном образце бактерий, а также о пригодности выделенной ДНК для постановки ПЦР.

Поскольку рBS72-подобные репликоны ранее выявляли только в бактериях *B. subtilis*, предполагали, что плазмидсодержащие штаммы можно обнаружить только в том случае, если в почве присутствуют бактерии этой таксономической группы. Для обнаружения бактерий *B. subtilis* использовали специфические праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагмента уникального гена *spoA*. Образование ампликонов искомого размера (481 п. н.) свидетельствовало о присутствии в исследуемом почвенном образце бактерий *B. subtilis* (рис. 2).

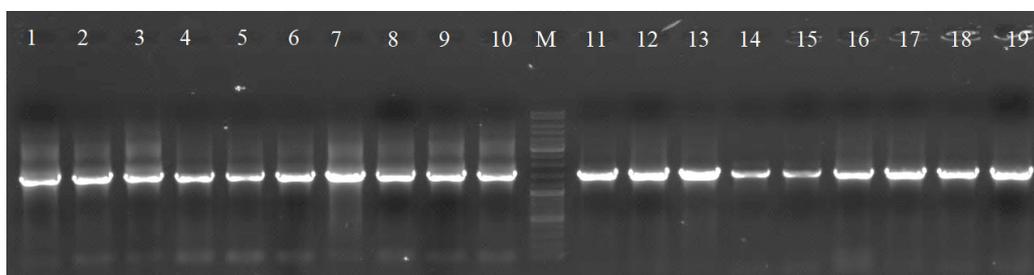


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов 16S рРНК. Номера дорожек соответствуют продуктам ПЦР, полученным с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из почвенных образцов: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – 19. Дорожка М соответствует реперу 1 kbMix

Fig. 1. Electropherogram of 16S rRNA gene amplification products. The lane numbers correspond to the PCR products obtained using total DNA isolated from soil samples as a template: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – 19. The lane M corresponds to the reference 1 kbMix

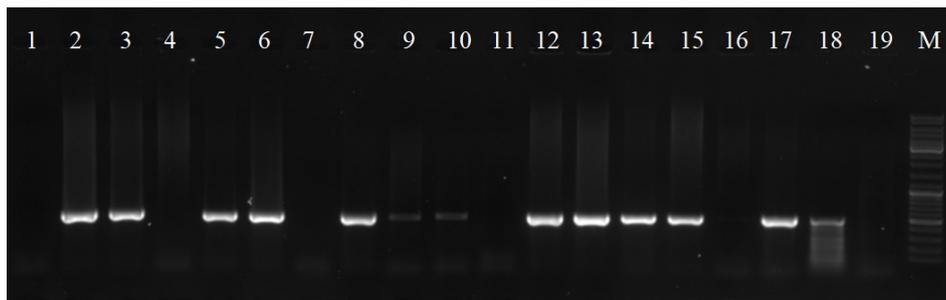


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации генов *spoA*. Номера дорожек соответствуют продуктам ПЦР, полученным с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из почвенных образцов: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – без матрицы. Дорожка М соответствует реперу 1 kbMix

Fig. 2. Electropherogram of the *spoA* gene amplification products. The lane numbers correspond to the PCR products obtained using total DNA isolated from soil samples as a template: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – without matrix. The lane M corresponds to the reference 1 kbMix

Для выявления плазмид-подобных рBS72 использовали две пары праймеров. Праймеры F2-R2 обеспечивали амплификацию уникальной области плазмиды рBS72 размером 685 п. н. (содержит *orf138* и *orf139*), а праймеры Rep72F-Rep72R – амплификацию *rep*-области размером 1920 п. н., включающей *rep*-ген и *oriV*-сайт (рис. 3).

В результате из 36 исследованных образцов почвы, содержащей бактерии (получены ампликоны генов 16S рРНК), в 22 обнаружены бактерии *B. subtilis* (получены ампликоны гена *spoA*), из которых 6 образцов содержали репликоны рBS72 (получены ампликоны плазмидной ДНК) (табл. 1).

Таким образом, согласно результатам проведенного исследования, в природных почвенных образцах, содержащих бактерии *B. subtilis*, с частотой 27 % (в 22 образцах из 36 исследованных) выявлены рBS72-подобные репликоны.

Впервые мини-репликон плазмиды рBS72 размером 3081 п. н. был секвенирован и депонирован в GenBank NCBI в мае 2002 г. (регистрационный номер AY102630). Анализ нуклеотидной последовательности *rep*-гена позволил выявить гомологию между С-терминальной последовательностью кодируемого им белка и N-терминальной последовательностью DnaA-белка грамположительных и грамотрицательных бактерий, обеспечивающего инициацию репликации хромосомы. В то же время не обнаружено сходства Rep-белка с гомологичными полипептидами других внехромосомных генетических элементов, на основании чего он был отнесен к новому типу репликонов [11].

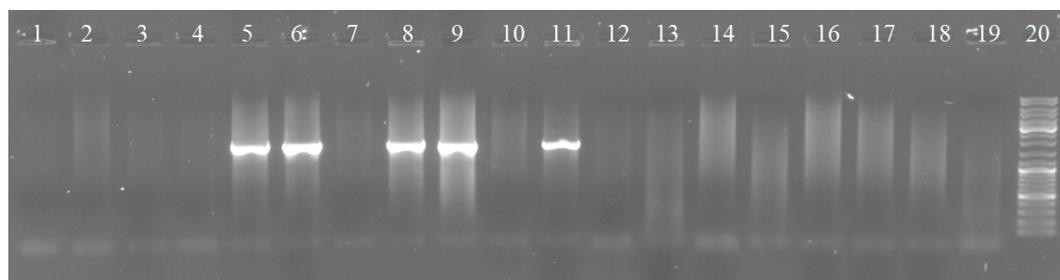


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации *rep*-области плазмиды рBS72. Номера дорожек соответствуют продуктам ПЦР, полученным с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из почвенных образцов: 1 – 3; 2 – 8; 3 – 9; 4 – 10; 5 – 2; 6 – 5; 7 – 12; 8 – 6; 9 – 15; 10 – 13; 11 – положительный контроль; 12 – 14; 13 – 19; 14 – 20; 15 – 21; 16 – 24; 17 – 27; 18 – 29, 19 – без матрицы. Дорожка М соответствует реперу 1 kbMix

Fig. 3. Electropherogram of amplification products of the *rep*-region of plasmid рBS72. The lane numbers correspond to the PCR products obtained using total DNA isolated from soil samples as a template: 1 – 3; 2 – 8; 3 – 9; 4 – 10; 5 – 2; 6 – 5; 7 – 12; 8 – 6; 9 – 15; 10 – 13; 11 – positive control; 12 – 14; 13 – 19; 14 – 20; 15 – 21; 16 – 24; 17 – 27; 18 – 29, 19 – without matrix. The lane M corresponds to the reference 1 kbMix

Т а б л и ц а 1. Результаты ПЦР-анализа тотальной ДНК из образцов почвы, изолированной из разных природных источников

T a b l e 1. Results of PCR analysis of total DNA from soil samples isolated from various natural sources

№ почвенного образца	Место выделения	Наличие продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров к генам		
		16S рPHK	<i>spoA B. subtilis</i>	плазмиды рBS72*
1	г. Минск, ул. Кирилла Туровского, 5	+	–	–
2	г. Минск, ул. Академика Купревича	+	+	+
3	г. Минск, пл. Парижской Коммуны, 1	+	+	–
4	г. Минск, ул. Якубовского, 40	+	–	–
5	г. Минск, Площадь Победы	+	+	+
6	г. Минск, Народная, 45	+	+	+
7	г. Минск, ул. Курчатова, 10	+	–	–
8	г. Минск, ул. Пушкина, 75	+	+	–
9	г. Минск, ул. Копиевича, 5	+	+	–
10	г. Минск, ул. Кириенко, 3	+	+	–
11	г. Дзержинск, Минская область	+	–	–
12	г. Минск, ул. Скорины, 11	+	+	–
13	г. Минск, Коммунистическая, 10	+	+	–
14	г. Жодино, Минская область	+	+	–
15	г. Клецк, Минская область	+	+	+
16	д. Зембин, Минская область	+	–	–
17	д. Хатежино, Минская область	+	+	+
18	д. Корсаковичи, Минская область	+	+	+
19	д. Стешицы, Минская область	+	+	–
20	д. Обчак, Минская область	+	+	–
21	д. Углы, Минская область	+	+	–
22	пос. Нарочь, Минская область	+	–	–
23	оз. Нарочь, Минская область	+	–	–
24	оз. Нарочь, Минская область	+	+	–
25	г. Пинск, Брестская область	+	–	–
26	г. Береза, Брестская область	+	–	–
27	д. Самойловичи, Брестская область	+	+	–
28	р. Сервечь, Брестская область	+	–	–
29	д. Стайки, Брестская область	+	+	–
30	г. Ельск, Гомельская область	+	–	–
31	оз. Черное, Гомельская область	+	+	–
32	г. Витебск	+	+	–
33	г. Витебск	+	+	–
34	г. Полоцк, Витебская область	+	–	–
35	г. Глубокое, Витебская область	+	–	–
36	г. Климовичи, Могилевская область	+	–	–

П р и м е ч а н и е. Для реакции ПЦР использовали два типа праймеров – F2-R2 и Rep72F-Rep72R.

Анализ Rep-белка плазмиды рBS72 позволил выявить полностью идентичный (на 100 %) белок, кодируемый геномом бактерий *B. rugosus* SPB7, выделенных из морской воды на территории Индии. Идентичные на 99 % аминокислотные последовательности кодировались геномами разных штаммов бактерий *B. subtilis*, выделенных на территории Пакистана (штаммы MB378 и MB415 из загрязненных нефтепродуктами почв), Нидерландов (штаммы EH11 и DH12 из луговой почвы, штамм B4071 из кари супа) и Китая (штамм 18-3, использующийся в качестве коммерческого пробиотика для животных) (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика бактерий, содержащих pBS72-подобные конъюгативные плазмиды
 Table 2. Characteristics of bacteria containing pBS72-like conjugative plasmids

Бактерия-хозяин	Размер плазмиды, п. н.	Источник выделения	Страна (№ в GenBank NCBI)	Идентичность белков, %					
				Rep (orf1)	VirD4 (orf24)	VirB4 (orf31)	VirB11 (orf26)	VirB6 (orf28)	Mob (orf37)
<i>B. subtilis</i> 72	102 254	Клумба	Беларусь, Минская обл. (KX711616)	100	100	100	100	100	100
<i>B. subtilis</i> 19	–	Лес	Беларусь, Гродненская обл. (FJ434456)	100	100	100	100	100	100
<i>B. rugosus</i> SPB7	–	Морская вода	Индия (NZ_JABUXO010000030)	100	100	100	100	94	100
<i>B. subtilis</i> MB378	88 605	Почва с нефтью	Пакистан (MBPE01000006)	99	100	100	100	96	100
<i>B. subtilis</i> MB415	94 937	Почва с нефтью	Пакистан (MQSR01000011)	99	100	100	100	96	100
<i>B. subtilis</i> B4071	–	Кари суп	Нидерланды (NZ_JXHN01000026, NZ_JXHN01000027, NZ_JXHN01000031)	99	99	100	98	100	99
<i>B. subtilis</i> EH11	122 937	Почва луговая	Нидерланды (NZ_RPHE01000007)	99	100	100	100	–	99
<i>B. subtilis</i> DH12	117 972	Почва луговая	Нидерланды (NZ_RQRH01000007)	99	100	100	100	99	99
<i>B. subtilis</i> 18-3	–	Коммерческий пробиотик	Китай (NZ_NJRE01000013)	99	99	100	98	96	99
<i>Bacillus</i> sp. CX-120	–	Компост	Китай (NZ_NCTZ01000020)	62	72	80	62	74	60
Плазмиды SX01705-1 <i>B. subtilis</i>	79 987	Субстрат для грибов	Китай (CP022288)	62	71	80	62	74	61
<i>B. licheniformis</i> YNP5-SUWRT508	–	Трава в парке	США (MEDD01000008)	62	71	80	62	74	60
<i>B. licheniformis</i> YNP1-TSU	–	Трава в парке	США (MIGE01000004)	62	71	80	62	74	60
<i>B. paralicheniformis</i> G-1	–	Сухое молоко	Австралия (NZ_AZSK01000003, NZ_AZSK01000013)	62	72	80	62	74	60
Плазмиды 1 <i>B. licheniformis</i>	96 005	Пищевой продукт	Южная Корея (CP035229)	62	72	80	62	74	60

Примечание. «←» – размер плазмидного репликона не установлен.

Белки, отличающиеся от Rep-белка плазмиды pBS72, в большей степени (идентичность составляла 62 %) кодировались плазмидой pSX01705-1 размером 79987 п. н. бактерий *B. subtilis* SX01705 (CP022288), изолированных на территории Китая из субстрата для выращивания грибов, плазмидой 1 размером 96005 п. н. бактерий *B. licheniformis* SRCM103529 (CP035229), выделенных из пищевого продукта в Южной Корее, а также обнаруживались в составе геномов бактерий *B. licheniformis*, изолированных из подогретой воды, контактирующей с травой в парке в США (штаммы YNP1-TSU и YNP1-TSU), и бактерий *B. paralicheniformis* G-1, изолированных из сухого молока в Австралии. При аннотации всех вышеперечисленных геномов данные белки отнесены к разряду гипотетических (табл. 2).

В составе всех вышеперечисленных геномов выявлены гены, кодирующие ключевые белки конъюгационного переноса (VirB4, VirB6, VirB11, VirD4 и Mob). Сходство данных полипептидов, кодируемых геномами бактерий *B. subtilis*, с таковыми плазмиды pBS72 составляло 96–100 %. Гомология с белками плазмид pSX01705-1 и 1 бактерий *B. licheniformis* составляла от 60 до 80 %. Наименьшее сходство было выявлено для релаксаз (Mob) и белков VirB11, в то время как для консервативных белков VirB4 и VirD4, используемых в качестве генетических маркеров для классификации конъюгативных плазмид, сходство превышало 71 % (табл. 2).

Анализ нуклеотидных последовательностей бактерий штаммов *B. subtilis* MB378, MB415, EH11 и DH12, депонированных в GenBank NCBI под номерами MBPE01000006, MQSR01000011, NZ_RPHE01000007 и NZ_RQPH01000007, позволил установить, что они начинаются и заканчиваются фрагментами одной и той же открытой рамки считывания, что позволяет представить их



Рис. 4. Генетическое сходство pBS72-подобных конъюгативных плазмид, установленное с использованием программы Mauve [9]. Одинаковым цветом обозначены гомологичные области плазмидных репликонов.

Участки белого цвета соответствуют уникальным нуклеотидным последовательностям

Fig. 4. Genetic similarity of pBS72-like conjugative plasmids established using the Mauve program [9]. Homologous regions of plasmid replicons are marked with the same color. Areas in white correspond to unique nucleotide sequences

в виде кольцевых молекул ДНК и определить размер внехромосомного генетического элемента, присутствующего в их клетках (табл. 2). Для остальных геномов, содержащих рBS72-подобные конъюгативные плазмиды, размер внехромосомных генетических элементов установить не представлялось возможным ввиду отсутствия перекрывания контигов, депонированных в GenBank NCBI.

Сравнительный анализ всех нуклеотидных последовательностей, депонированных в GenBank NCBI, с нуклеотидной последовательностью плазмиды рBS72 позволил выявить протяженные участки гомологии в областях локализации систем репликации и конъюгационного переноса (рис. 4).

В то же время в составе плазмид размером 122 937 и 117 972 п. н. бактерий *B. subtilis* штаммов EN11 и DN12 обнаруживались протяженные уникальные нуклеотидные последовательности, в составе которых аннотированы гены, которые детерминируют синтез белков, определяющих устойчивость к ионам меди (WP_124048611.1, WP_124048614.1, WP_124048618.1), участвующих в транспорте тяжелых металлов (WP_124048612.1), обмене азота (WP_061576709.1), регуляции транскрипции (WP_124048619.1), перемещении мобильных генетических элементов (WP_124048623.1, WP_124048624.1) и некоторых других. Присутствие данных детерминант в составе плазмидных репликонов может обеспечивать селективное преимущество содержащим их бактериям. Следует отметить, что ранее было показано, что присутствие плазмиды рBS72 увеличивает выживаемость содержащих ее бактерий *B. subtilis* в условиях стресса (низкая и высокая pH-среды, УФ-облучение, повышенная осмолярность) [14]. Показано, что бактерии *B. subtilis* B4071, выделенные из пищевых продуктов (кари суп), образуют споры, устойчивые к высоким температурным режимам [15]. Определенный интерес представляет плазмидсодержащий штамм *B. subtilis* 18-3, используемый в Китае в качестве коммерческого пробиотика для животных (спекулятивно можно предположить, что некоторые практически важные признаки этих бактерий могут быть связаны с присутствием в их клетках рBS72-подобной конъюгативной плазмиды). Однако следует учитывать, что рBS72-подобные репликоны могут обеспечивать перенос антибиотикорезистентных плазмид среди бактерий природной микрофлоры, а использование плазмидсодержащих бактерий в качестве пробиотических препаратов может принести больше вреда, чем пользы.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что в изолированных из разных природных источников на территории Беларуси почвенных образцах, содержащих бактерии *B. subtilis*, с частотой 27 % (в 22 образцах из 36 исследованных) выявлены рBS72-подобные репликоны. На основе 99–100 %-ного сходства белков, ответственных за репликацию (Rep-белки) и конъюгацию (белки VirB4, VirB6, VirB11, VirD4, Mob), установлено, что рBS72-подобные конъюгативные плазмиды присутствуют в клетках природных бактерий *B. subtilis*, циркулирующих на территории, Пакистана, Китая и Нидерландов, а также в клетках бактерий *B. rugosus*, изолированных на территории Индии. Сходные репликоны (Rep-белки идентичны на 62 %), способные передаваться путем конъюгации (ключевые белки конъюгации идентичны на 60–80 %), выявлены в бактериях *Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* и *B. subtilis*, выделенных в США, Австралии, Китае и Южной Корее.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № B21-142).

Acknowledgements. This work was carried out with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant no. B21-142).

Список использованных источников

1. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45 / C. Leifert [et al.] // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – Vol. 78, N 2. – P. 97–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb02829.x>
2. Schallmey, M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production / M. Schallmey, A. Singh, O. P. Ward // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50, N 1. – P. 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
3. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria / W. J. Meijer [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. – 1998. – Vol. 21, N 4. – P. 337–368. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00357.x>
4. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector / M. A. Titok [et al.] // Plasmid. – 2003. – Vol. 49, N 1. – P. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)

5. Plasmid transfer in *Bacilli* by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain / E. U. Poluektova [et al.] // *Plasmid*. – 2004. – Vol. 52, N 3. – P. 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.07.001>
6. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group / C. R. Harwood [et al.] // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2018. – Vol. 42, N 6. – P. 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
7. te Riele, H. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* / H. te Riele, B. Michel, S. D. Ehrlich // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83, N 8. – P. 2541–2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
8. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук ; пер. с англ. под ред. А. А. Баева, К. Г. Скрыбина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
9. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements / A. C. E. Darling [et al.] // *Genome Res.* – 2004. – Vol. 14, N 7. – P. 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
10. Титок, М. А. Плазмидный состав бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из природных источников / М. А. Титок, А. В. Лагодич, Ю. В. Селезнева // *Вестн. БГУ. Сер. 2.* – 2003. – № 3. – С. 35–38.
11. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector / M. A. Titok [et al.] // *Plasmid*. – 2003. – Vol. 49, N 1. – P. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
12. Integrated metagenomics and network analysis of soil microbial community of the forest timberline / J. Ding [et al.] // *Sci. Reports.* – 2015. – Vol. 5. – Art. 7994. <https://doi.org/10.1038/srep07994>
13. Microbial diversity of a mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment / J. A. Siles [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9, N 7. – P. e103035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103035>
14. Гуринович, А. С. Молекулярно-генетический и функциональный анализ плазмиды pBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* / А. С. Гуринович, М. А. Титок // *Микробиология.* – 2020. – Т. 89, № 6. – С. 646–657.
15. Draft genome sequences of 10 *Bacillus subtilis* strains that form spores with high or low heat resistance / E. M. Berendsen [et al.] // *Genome Announc.* – 2016. – Vol. 4, N 2. – P. e00124–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00124-16>

References

1. Leifert C., Li H., Chidburee S., Hampson S., Workman S., Sigeo D., Epton H. A., Harbour A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Microbiology*, 1995, vol. 78, no. 2, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb02829.x>
2. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, vol. 50, no. 1, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
3. Meijer W. J., Wisman G. B., Terpstra P., Thorsted P. B., Thomas C. M., Holsappel S., Venema G., Bron S. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, vol. 21, no. 4, pp. 337–368. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00357.x>
4. Titok M. A., Chapuis J., Selezneva Y. V., Lagodich A. V., Prokulevich V. A., Ehrlich S. D., Jannièrè L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid*, 2003, vol. 49, no. 1, pp. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
5. Poluektova E. U., Fedorina E. A., Lotareva O. V., Prozorov A. A. Plasmid transfer in *Bacilli* by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain. *Plasmid*, 2004, vol. 52, no. 3, pp. 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.07.001>
6. Harwood C. R., Mouillon J. M., Pohl S., Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, vol. 42, no. 6, pp. 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
7. te Riele H., Michel B., Ehrlich S. D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*, 1986, vol. 83, no. 8, pp. 2541–2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
8. Maniatis T., Fritch E., Sambuk Dzh. *Genetic engineering techniques: molecular cloning*. Moscow, Mir Publ., 1984, 479 p. (in Russian).
9. Darling A. C., Mau B., Blattner F. R., Perna N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 2004, vol. 14, no. 7, pp. 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
10. Titok M. A., Lagodich A. V., Selezneva Yu. V. Plasmid composition of *Bacillus subtilis* bacteria isolated from natural sources. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2: Khimiya. Biologiya. Geografiya* [Bulletin of the Belarusian State University. Series 2: Chemistry. Biology. Geography], 2003, no. 3, pp. 35–38 (in Russian).
11. Titok M. A., Chapuis J., Selezneva Y. V., Lagodich A. V., Prokulevich V. A., Ehrlich S. D., Jannièrè L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid*, 2003, vol. 49, no. 1, pp. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
12. Ding J., Zhang Y., Deng Y., Cong J., Lu H., Sun X., Yang C., Yuan T., Van Nostran, J. D., Li D., Zhou J., Yang Y. Integrated metagenomics and network analysis of soil microbial community of the forest timberline. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5, art. 7994. <https://doi.org/10.1038/srep07994>
13. Siles J. A., Rachid C. T., Sampedro I., García-Romera I., Tiedje J. M. Microbial diversity of a mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 7, p. e103035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103035>

14. Gurinovich A. S., Titok M. A. Molecular genetic and functional analysis of the pBS72 plasmid from *Bacillus subtilis* environmental isolates. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 2020, vol. 89, no. 6, pp. 646–657 (in Russian).

15. Berendsen E. M., Wells-Bennik M. H., Krawczyk A. O., de Jong A., van Heel A., Eijlander R. T., Kuipers O. P. Draft genome sequences of 10 *Bacillus subtilis* strains that form spores with high or low heat resistance. *Genome Announcements*, 2016, vol. 4, no. 2, pp. e00124–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00124-16>

Информация об авторах

Гуринович Анастасия Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4381-4499>

Сацункевич Наталья Евгеньевна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nesatsunkevich@gmail.com

Титок Марина Алексеевна – д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ma_titok@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0002-8623-5083>

Information about the authors

Anastasiya S. Hurynovich – Junior Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4381-4499>

Natallia E. Satsunkevich – Junior Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nesatsunkevich@gmail.com

Marina A. Titok – D. Sc. (Biol.), Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ma_titok@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0002-8623-5083>

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 576.3.08
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-229-242>

Поступила в редакцию 16.12.2021
Received 16.12.2021

И. Д. Вологовский, С. В. Пинчук

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

**ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ. ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ
И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИИ**

Аннотация. В данном обзоре предпринята попытка изложить основы технологии проточной цитометрии – фундаментального метода исследования, широко применяемого в различных областях биологической науки – клеточной биологии, биофизики, биохимии, молекулярной биологии, а также в прикладной и диагностической медицине. Приведены данные о принципе работы метода, устройстве проточных цитометров и их возможностях (получение информации о структурно-функциональном состоянии клеточных популяций и сортировка клеток) и использовании в проточной цитометрии лазерных источников излучения и систем регистрации рассеянного света и флуоресценции. Кроме того, представлен широкий ассортимент различных флуорофоров и моноклональных антител. Приводятся конкретные примеры использования метода проточной цитометрии в различных экспериментах. Рассматриваются перспективы дальнейшего развития технологии.

Ключевые слова: проточная цитометрия, клеточная популяция, сортировка, многопараметровый анализ, кластеры дифференцировки, моноклональные антитела, флуорохромы

Для цитирования: Вологовский, И. Д. Проточная цитометрия. Основы технологии и ее применение в биологии / И. Д. Вологовский, С. В. Пинчук // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 229–242. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-229-242>

Igor D. Volotovskii, Sergei V. Pinchuk

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

FLOW CYTOMETRY. BASICS OF TECHNOLOGY AND ITS APPLICATION IN BIOLOGY

Abstract. The given review is an attempt of concentrated consideration of flow cytometry problem which is widely used as a fundamental research approach in various fields of biology like cell biology, biophysics, biochemistry and molecular biology and also in applied and diagnostic medicine. The method principle, construction of flow cytometers and their possibilities (study of structure and function state of cell populations and cell sorting), usage of lasers in flow cytometers, wide assortment of fluorophores and monoclonal antibodies. The concrete examples of flow cytometer methods in different experiments are given. The trends in development of flow cytometry are considered.

Keywords: flow cytometry, cell population, sorting, multiparametric analysis, clusters of differentiation, monoclonal antibodies, fluorochromes

For citation: Volotovskii I. D., Pinchuk S. V. Flow cytometry. Basics of technology and its application in biology. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 67, no. 2, pp. 229–242 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-229-242>

Проточная цитометрия – быстро прогрессирующий метод биофизического анализа живых клеток и частиц неорганической и органической природы, основанный на их спектральном сканировании в потоке с использованием одиночных или множественных тестирующих источников лазерного излучения в видимой спектральной области [1–4]. Проточная цитометрия базируется на обширном арсенале достижений цитохимии и флуоресцентного анализа структурных

компонентов клеток, но от классической цитохимии ее отличает высокая производительность. Так, исследуются выборки от нескольких тысяч до нескольких миллионов клеток, что гарантирует экспериментальную достоверность результатов [3, 5].

От классических методов клеточной биологии проточную цитометрию отличает возможность анализа не усредненных молекулярных характеристик клеточной популяции, а индивидуальных параметров ее отдельных клеток [6].

Два существенных обстоятельства делают проточную цитометрию незаменимым методом анализа клеток. Во-первых, этот метод позволяет охарактеризовать гетерогенные клеточные популяции по фенотипу, а при использовании ДНК-цитометрии – и по генотипу входящих в них клеток. Во-вторых, это высокая производительность метода – способность обнаружить и охарактеризовать маловероятные события, встречающиеся с частотой порядка 10^{-5} – 10^{-7} . Современные цитометры могут регистрировать несколько параметров каждой отдельной клетки со скоростью до 30 000 клеток в секунду [1, 4].

Принцип функционирования проточного цитометра состоит в следующем: через тонкую ячейку под определенным давлением прокачивается «обжимающий» буферный раствор с исследуемыми клетками (рис. 1). Условия подобраны таким образом, что в ячейке создается так называемое гидродинамическое фокусирование струи, вследствие чего клетки выстраиваются друг за другом. В определенном месте поток одиночных клеток попадает под зондирующий лазерный луч, что позволяет считывать с них разнообразную информацию [1].

Исследуемые частицы и клетки перед измерением суспендируются в буферном растворе. Анализ осуществляется в двух режимах: режиме рассеяния и режиме флуоресценции. Рассеяние регистрируется по двум взаимно перпендикулярным векторам: прямом (forward scatter) и боковым (side scatter). Регистрируя сигнал рассеяния света, получают информацию о концентрации клеток в образце, их размерах и сложности внутреннего устройства. Флуоресцентный анализ базируется на собственной флуоресценции клеток или флуоресценции связанных с клеткой или введенных в клетку флуоресцентных зондов. В их роли используются флуоресцентные белки, например зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein), флуоресцентные зонды (красители), например бромид пропидия или меченные флуоресцентными зондами моноклональные антитела.

Проточная цитометрия используется в таких областях научных исследований, как молекулярная биология, клеточная биология, биофизика и биохимия, онкобиология, микробиология, иммунология и вирусология. Метод позволяет одновременно анализировать такие гетерогенные

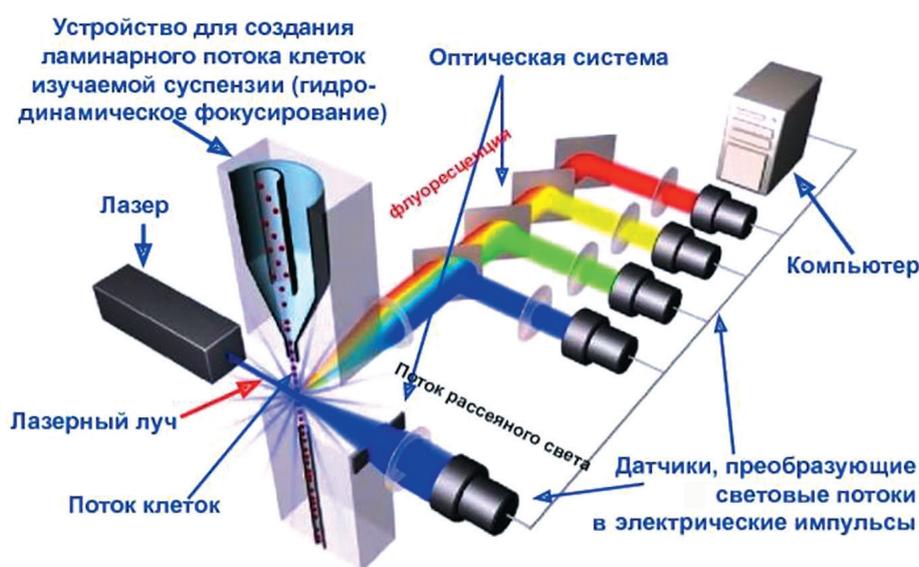


Рис. 1. Принципиальная схема проточного цитометра [1]

Fig. 1. Schematic diagram of a flow cytometer [1]

системы, как клеточные популяции крови, костного мозга, а также тканей, которые можно дезагрегировать до отдельных клеток (лимфоузлы, почка, слизистые, опухоли и др.). Кроме изучения клеточных популяций проточная цитометрия используется также с целью сортировки – выделения из гетерогенной популяции отдельных клеток для дальнейших исследований. Более детальное рассмотрение применения проточных цитометров в биологии приведено ниже.

В последние десятилетия лазерные источники света получили широкое распространение в науке и технике. Они часто используются как в проточных цитометрах, так и в комбинации с проточной цитометрией в специализированных приборах другого назначения – микроскопах и масс-спектрометрах.

Большое значение для развития проточной цитометрии, сопровождающегося взрывным ростом возможностей метода, имело увеличение доступных на рынке реактивов (флуорохромов, конъюгированных с моноклональными антителами, тандемных и полимерных красителей) и, как следствие, рост информативности проточной цитометрии. Кроме того, появились флуоресцирующие белки (например, mCherry, mBanana, mOrange, mNeptun и др.), что дало возможность вводить в клетку необходимую метку.

Прорывную роль в проточной цитометрии сыграли моноклональные антитела, используемые в первую очередь для типирования клеток. Меченные флуорохромами моноклональные антитела позволяют проводить как качественный, так и количественный анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов. На сегодняшний день ряд фирм предлагают широкий спектр моноклональных антител, с помощью которых можно идентифицировать клеточные поверхностные антигены, получившие название кластеров дифференцировки (cluster of differentiation, CD). По сути дела, CD – это набор моноклональных антител, которые распознают одну и ту же структуру на клеточной поверхности независимо от эпитопной специфичности. В настоящее время описано порядка 350 кластеров дифференцировки клеток человека. Расширился и спектр флуоресцентных красителей. Так, например, пометив несколько моноклональных антител различными флуоресцентными красителями, можно в одном эксперименте получить информацию сразу о нескольких антигенах на поверхности клеток, а следовательно, и о составе клеток в популяции.

Разнообразие флуорохромов сделало возможным количественное исследование ряда таких физиологических параметров, как внутриклеточный pH (флуоресцеин и 7-гидроксикумарин), концентрация свободных ионов кальция (Fura red, Indo-1, Fluo-3), уровень окислительных процессов в клетке, активация митохондрий, потенциал наружной клеточной мембраны, механизмы гибели клеток (апоптоз, некроз) [1, 7]. Кроме того, разработаны методики, позволяющие при помощи проточной цитометрии исследовать фагоцитоз, экспрессию цитокинов и др. Все это создает предпосылки для современных исследований всего комплекса внутриклеточных процессов на уровне отдельных клеток.

Финальным этапом эксперимента с использованием проточной цитометрии является анализ полученных результатов, наиболее часто – выдаваемых прибором гистограмм с отображением одного или двух (dot plot) измеряемых параметров (рис. 2). Однако увеличение объема данных и повышение сложности экспериментов вызвало необходимость разработки более новых методов кластерного анализа (в частности, PCA, SPADE и tSNE) с целью извлечения из многомерного массива данных больше полезной информации.

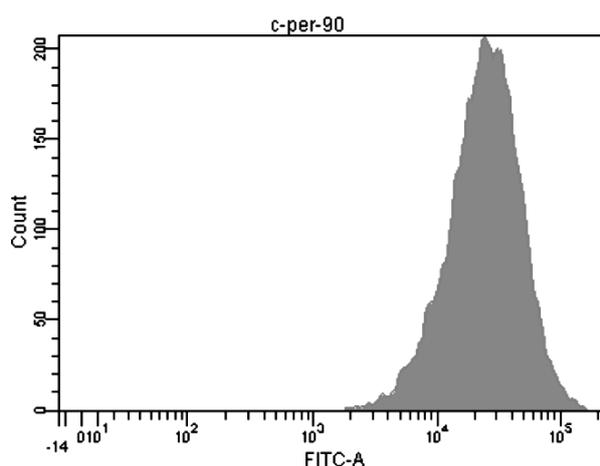


Рис. 2. Гистограмма флуоресценции зонда CM-H₂DCF-DA в МСК костного мозга после воздействия на клетки трет-бутилгидропероксида [7]

Fig. 2. Histogram of CM-H₂DCF-DA fluorescence in bone marrow MSCs after treatment of cells with tret-butylhydroperoxide [7]

Оборудование. Традиционные проточные цитометры. Традиционный проточный цитометр состоит из трех функциональных систем: гидравлической, оптической и электронной (см. рис. 1). Гидравлическая система содержит так называемую обжимающую жидкость (обычный солевой буферный раствор, находящийся под давлением) для беспрепятственной доставки и фокусирования лазерного луча. Оптическая система состоит из двух частей: оптики возбуждения (лазер) и оптики регистрации (фотоумножитель или фотодиод), с помощью которых возникший световой сигнал генерируется и затем подвергается анализу. Набор дихроичных светофильтров выделяет флуоресцентное излучение для его последующего улавливания специализированным детектором. Более специфическими являются светофильтры, отсекающие коротко- и длинноволновый участки спектра, оставляя излучение в максимуме флуоресцентного сигнала. Они как бы создают узкое спектральное окно, пропускающее информационно ценное излучение для его последующей детекции и конверсии электронной системой цитометра в цифровой сигнал [8].

Наиболее часто в проточных цитометрах используются лазеры с испусканием излучения следующих длин волн: 488 нм (синий), 405 нм (фиолетовый), 532 и 553 нм (зеленый), 561 нм (зелено-желтый), 640 нм (красный) и 355 нм (ультрафиолетовый) (см. таблицу). Поскольку современные цитометры, как правило, оборудованы более чем тремя фотоэлектронными умножителями (от 3 до 18), на одном образце периферической крови можно проанализировать практически все основные субпопуляции клеток [9]. Наличие на рынке большого выбора моноклональных антител, меченных различными флуорохромами, дает возможность исследователю подобрать такой их набор, чтобы на меньшем количестве образцов получить максимальную информацию. Все это привело к формированию многопараметрового анализа в цитометрии.

Во многих проточных цитометрах вместо фотоумножителей используются фотодиоды, позволяющие увеличить чувствительность приборов.

Флуорохромы, используемые для конъюгации с моноклональными антителами [2]

Fluorochromes used for conjugation with monoclonal antibodies [2]

Флуорохром	Длина волны возбуждения, нм	Максимум эмиссии, нм
Флуоресцеинизотиоцианат (FITC)	488	525
Алекса Флуор 488 (Alexa Fluor 488)	488	525
Фикоэритрин (PE, R-PE, RD1)	488	575
ECD (PE-Texas Red)*	488	610
PC5 (PE/CY5)*	488	675
PC5.5 (PE/CY5.5)*	488	700
PE Alexa Fluor 700*	488	725
PC7 (PE/CY7)	488	790
Алофикоцианин (APC)	633/635	680
Alexa Fluor 647	633/635	680
Alexa Fluor 700	633/635	725
APC Alexa Fluor 700*	633/635	725
APC7 (APC/CY7)*	633/635	790

Примечание. CY – цианин; * – tandemные флуоресцентные красители.

Ультразвук-фокусирующие цитометры. В этих цитометрах для увеличения фокусирования используется ультразвуковая обработка. Она позволяет уменьшить в проточном цитометре риск засорения системы прокачки образцов.

Клеточные сортеры. Особым типом проточных цитометров являются клеточные сортеры, с помощью которых можно очистить клетки в образце и собрать их в коллекторе для дальнейшего анализа. Использование клеточного сортера позволяет проводить селекцию в популяции клеток, характеризующихся выраженностью позитивных или негативных параметров, и собирать их в специальном коллекторе (рис. 3). Сортеры разделяют клетки благодаря осцилляции



Рис. 3. Упрощенная схема проточного цитометра с функцией сортировки клеток [4]

Fig. 3. Schematic diagram of a flow cytometer with cell sorting function [4]

потока жидкости в приборе при высоких частотах и образованию капель. Капли обладают позитивным или негативным зарядом. Они пропускаются через так называемую отклоняющую металлическую пластинку и в зависимости от их заряда направляются в специальный коллектор. В качестве коллекторов используют трубочки, предметные стекла или пластинки (чаще всего имеющие 96 или 384 лунок). Имеются два типа сортеров: сортеры с кварцевой кюветой и сортеры с воздушной струей. Они отличаются точкой расположения тестирующего лазера. Сортеры с кварцевой кюветой характеризуются фиксированным лазерным источником света, а у сортеров с воздушной струей приходится перед каждой процедурой настраивать систему. Это создает определенные неудобства, но эти сортеры адаптированы к детекции малых клеток.

Проточные цитометры с визуализацией. Данные цитометры, представляющие собой комбинацию традиционного проточного цитометра с флуоресцентным микроскопом, позволяют быстро анализировать как отдельные клетки, так и популяции в целом по их морфологии и флуоресцентным параметрам [5]. Кроме того, они могут оценивать распределение белков внутри отдельной клетки подобно конфокальному или флуоресцентному микроскопам и осуществлять функции проточного цитометра. Особенно востребованы эти цитометры при исследовании в популяции процессов клеточной сигнализации и образования межклеточных контактов, повреждения и репарации ДНК, а также в опытах по определению локализации клеток в популяции в соответствии с флуоресцентными данными.

Масс-цитометры. Масс-цитометры представляют собой комбинацию времяпролетного масс-спектрометра с проточным цитометром [10]. При этом для детекции клеток вместо антител, меченных флуоресцентными зондами, используются антитела, меченные ионами тяжелых металлов (обычно лантанидами). Однако в этом случае в ходе анализа клетки могут разрушаться, поэтому клеточный сортинг невозможен. В масс-цитометрах скорость прокачки составляет только 1000 клеток/с вместо 10 000 клеток/с у традиционных проточных цитометров. Появились и новые металлические зонды для мечения антител, например платиновые [11].

Цитометры с биочипами. Данная разновидность проточной цитометрии приобрела популярность при анализе большого количества образцов при их малых объемах. Другими словами, в этом случае используются биочипы с известным флуоресцентным сигналом в канале регистрации и репортерными молекулами, которые детектируются с помощью отдельного лазера, что позволяет увеличить количество захваченного биочипами анализируемого вещества. При этом один такой анализ заменяет 100 определений с помощью метода ELISA. Для проведения большого

количества измерений были сконструированы небольшие проточные цитометры с двумя лазерами и 96-луночными кассетами. Прибор в состоянии регистрировать и дискриминировать в двух каналах 100–500 различных образцов, характеризующихся чипами с различными флуоресцентными свойствами.

Спектральные анализаторы. Одним из вызовов многопараметровой проточной цитометрии является перекрытие спектров между различными флуорохромами. Для решения этой проблемы в современных проточных цитометрах используются специальные спектральные анализаторы. Они регистрируют в образце спектры эмиссии каждого флуорохрома, которые служат потом отпечатком, а в ходе анализа выделяют для каждого флуорохрома чистый сигнал. Использование спектрального анализа стало стартовым событием по замене в проточных цитометрах фотоумножителей как детекторов сигналов на фотодиоды.

Новые технологии детекции. Благодаря высокой чувствительности и низкому шумовому току фотоумножители до сих пор остаются в проточных цитометрах стандартными детекторами. Тем не менее в проточных цитометрах начинают применять твердотельные детекторы. Лавинные фотодиоды дешевы, характеризуются линейностью усиления сигнала и фоточувствительностью в красной спектральной области, появились также и силиконовые детекторы.

Реактивы. Малые органические молекулы. На практике для мечения антител используются такие малые органические красители, как флуоресцеин (молекулярная масса (ММ) – 389 дальтон (D)), Алекса Флуор 488 – аналог флуоресцеина (ММ = 643 D), тexasский красный (ММ = 625 D), пaцифик голубой (ММ = 262 D). Они характеризуются небольшими (порядка 50–100 нм) стоксовскими сдвигами, стабильны и легко конъюгируют с антителами. Красителю Алекса Флуор (Thermo Fisher), специально синтезированному для повышения резистентности метки к фотообесцвечиванию, отдается предпочтение и при получении имиджевых изображений образцов.

Фикобилины. Фикобилины – класс крупных белков, входящих в состав цианобактерий и водорослей. Примерами фикобилинов служат фикоэритрин (PE), аллофикоцианин (APC) и перидиновый хлорофилловый белок (PErCP). Например, молекулярная масса фикоэритрина составляет 240 000 D. Фикобилины характеризуются большим стоксовским сдвигом (75–200 нм), они очень стабильны, а спектры их излучения хорошо воспроизводимы и не подвержены изменениям. Благодаря своим размерам фикобилины превосходно подходят для количественной проточной цитометрии, так как при образовании их конъюгатов с антителами сохраняется соотношение 1:1. Однако фикобилины под действием лазерного излучения быстро выцветают, поэтому их не рекомендуется использовать в опытах с продолжительным или повторным облучением.

Квантовые точки. Квантовые точки (Qdots) – полупроводниковые нанокристаллы, которые характеризуются узким спектром флуоресценции, зависящим от их размера. Их свечение возбуждается ультрафиолетовым или фиолетовым лазером. Возбуждение квантовых точек осложняется компенсаторным эффектом флуоресценции в случае, когда проводятся многопараметровые эксперименты. Из-за компенсаторного эффекта и связанными с ним трудностями конъюгации Qdots с антителами в многопараметровых экспериментах квантовые точки все чаще заменяются полимерными красителями.

Полимерные красители. Полимерные красители представляют собой полимерную цепь, способную поглощать и испускать свет при фиксированных длинах волн, что определяется длиной полимерной цепи и природой присоединенных к ней молекулярных субъединиц – красителей. Эти красители очень стабильны, обладают близким к фикобилинам квантовым выходом флуоресценции, но более значительной фотостабильностью. Так как полимерные красители поглощают свет только при определенных длинах волн, при их использовании удается избежать множественного возбуждения. Примером данных красителей являются бриллиантовый фиолетовый (BV), бриллиантовый ультрафиолетовый (BUV) и бриллиантовый голубой (BB).

Тандемные красители. Тандемные красители представляют собой химическую пару, включающую фикобилин (PE, APC, PErCP) и полимерный краситель (BV421, BUV395) с небольшим органическим флуорохромом (Cu3, Cu5, Cu7), между которыми происходит миграция энергии (FRET), что увеличивает доступность флуорохрома к лазерному излучению. Так, например, у красителя тexasский красный максимум возбуждения наблюдается при длине волны 589 нм,

а у РЕ максимум флуоресценции – при 595 нм, поэтому в составе тандема флуоресценция РЕ будет возбуждать молекулу тexasского красного, что позволяет возбуждать комплекс РЕ–тexasский красный излучением лазера при 488 или 532 нм. В комплексе с антителом тандемные красители характеризуются большей доступностью к свету возбуждения, так как они могут возбуждаться одним лазером. Тандемные красители имеют яркую окраску, величина их стоксовского сдвига составляет 150–300 нм, что очень удобно при изучении антител с низкой концентрацией. Однако тандемные красители менее стабильны, чем донорные флуорохромы, и могут значительно отличаться по эффективности миграции энергии. Большинство из более длинных бриллиант-полимерных красителей также являются тандемными и обладают теми же свойствами.

Металлические конъюгаты в масс-цитометрии. Масс-спектрометрия предполагает использование антител, конъюгированных с изотопами металлов группы тяжелых лантанидов. На рынке присутствуют 35 изотопов лантанидов, пригодных для конъюгации с антителами. Они не флуоресцируют и используются исключительно в масс-цитометрии. Появилась информация о применении в проточной цитометрии платины [11].

Флуоресцентные белки. Флуоресцентные белки используются в качестве репортерных систем при экспрессии генов. Чаще всего применяется зеленый флуоресцирующий белок (GFP), выделяемый из медузы *Aequorea victoria* [12]. Из GFP получают циановое производное белка (CFP) и желтый флуоресцирующий белок (YFP). Красный флуоресцирующий белок (DsRed) был выделен из грибовидного анемона (*Discosoma*) [13] и затем клонирован в системе белковой экспрессии. Флуоресцирующие белки mCherry и mBanana следующего поколения, клонированные из красного флуоресцирующего белка, характеризуются широкими спектрами возбуждения и эмиссии. Кроме того, исключительно в проточной цитометрии используются фиолетовый и зелено-желтый белки. К настоящему времени открыты также сотни новых флуоресцирующих белков со спектрами возбуждения и эмиссии в интервале длин волн от ультрафиолетовой до инфракрасной области [14].

Красители ДНК. Данные красители комплексируют с ДНК и РНК. Их используют при исследовании клеточного цикла (йодид пропидия, 7-AAD, DyeCycle Violet, DAPI), сортинге хромосом (Hoescht 33342, хромомоциин А3), сортинге стволовых клеток (Hoescht 33342) и для оценки их жизнеспособности. Их применяют также при сортинге бактерий и при изучении процессов пролиферации клеток.

Красители для изучения пролиферации. Пролиферацию клеток можно оценивать, подвергая их воздействию бромдезоксипуридина (BrdU), а затем обрабатывая антителами против BrdU и красителем ДНК. Однако этот подход не позволяет проводить длительные опыты по пролиферации. Эфир янтарной кислоты и карбоксифлуоресцеина (CFSE) и другие сходные по структуре красители используются для мониторинга пролиферирующих клеток. В последнее время на рынке появились их красный и фиолетовый варианты. Эти красители не оказывают влияния на рост или морфологию клеток, поэтому пригодны для длительных экспериментов.

Красители для оценки жизнеспособности. Жизнеспособность клеток можно оценивать по эксклюзии красителя жизнеспособными клетками, что является отражением интактности клеточной мембраны. Для этих целей используют связывающиеся с ДНК красители (йодид пропидия, DAPI, 7AAD) или красители, реагирующие внутри клетки со свободными аминами. На рынке представлены целые линейки красителей, реагирующих с аминами, – LIVE/DEAD (ThermoFisher), Zombie dyes (Biolegend), Fixable Viability Stain (BD Biosciences). Особенностью данных красителей является необратимость их реакции с аминами, что позволяет определять пул мертвых клеток в исходном образце даже после проведения процедур фиксации и пермеабиллизации клеток при внутриклеточном окрашивании антителами [15]. Связывающиеся с ДНК красители образуют менее устойчивые комплексы и выходят из клеток при проведении внутриклеточного окрашивания или при длительном хранении. Анализ жизнеспособности клеток необходимо проводить в относительно короткий период времени после их нагрузки красителями ДНК.

Красители – кальциевые индикаторы. Эти красители меняют окраску или квантовый выход флуоресценции после связывания с ионами кальция. Они используются в опытах по активации клеток и сигнализации. Данные выражаются как отношение сигналов, соответствующих

свободному красителю и связанному с ионизированными ионами кальция. Чаще всего в качестве кальциевых зондов используются красители Indo-1 и Fluo-3.

Применение. Применение проточной цитометрии стало обычным в самых различных областях современной биологии.

Иммунология. Иммунофенотипирование. Наиболее широко распространенное практическое использование проточной цитометрии – иммунофенотипирование. Оно базируется на уникальной способности проточной цитометрии анализировать смешанные клеточные популяции по многим параметрам одновременно. В простейшей форме эксперимент по фенотипированию проводится на клетках, меченных конъюгированными флуорохромами антителами, мишенью которых являются антигены на клеточной поверхности. Большинство этих антигенов обозначаются как «кластеры дифференцировки» (CD) с определенным номером, присвоенным на рабочем совещании по дифференцировке лейкоцитов человека (Human Leukocyte Differentiation Workshops). Поэтому для обозначения моноклональных антител используется общая номенклатура. Например, CD3 – это кластер дифференцировки под номером 3. Он используется для определения ко-рецепторов, которые присутствуют во всех Т-клетках. Большинство иммунных клеток характеризуется специфическими CD-маркерами. Эти клеточные маркеры, называемые родословными (lineage), характеризуют специфические клеточные популяции, что является необходимым условием для проведения любого иммунофенотипического эксперимента. Так, Т-клетки характеризуются маркерами CD3, CD4, CD8; В-клетки – CD19 и CD20; моноциты – CD14 и CD11b; натуральные киллеры – CD56 и CD161. Дополнительно к родословным маркерам для характеристики популяции клеток используются и другие маркеры. Среди них нужно отметить маркеры активации CD69, CD25, CD62L, маркеры памяти CD45RO, CD27, маркеры клеточного хоуминга $\alpha 4/\beta 7$, маркеры хемокиновых рецепторов CCR7, CCR5, CXCR4, CCR6. Часто при иммунофенотипировании используются внутриклеточные маркеры. Маркер FoxP3 свойственен регуляторным Т-клеткам (T_{reg}), цитокины IFN- γ , TNF- α и IL-2 характерны для Т-хелперов первого типа (T_H1). Объектами изучения часто являются маркер пролиферации Ki67, а также антиген-специфические маркеры (технология тетрамеров главного комплекса гистосовместимости, МНС Tetramers) [16].

Последние проточные цитометры и имеющиеся в распоряжении исследователей необходимые для них реактивы дают возможность подбирать панели антител, позволяющие определять одновременно до 15 и более клеточных маркеров.

Большой массив данных по CD-маркированию накоплен в области изучения мезенхимальных стволовых клеток (МСК). На их поверхности зафиксированы CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 маркеры [17, 18]. Как правило, в противовес определяют содержание CD19, CD34, CD45 маркеров, которые характерны для гемопоэтических стволовых клеток, присутствующих в костном мозге и с позиции МСК являющихся примесными (рис. 4).

Антиген-специфические ответы. Антиген-специфические ответы наблюдаются при стимулировании клеток специфическими антигенами. Они проявляются благодаря образованию цитокинов, пролиферации, памяти или узнаванию антигенов МНС-мультимерами. Последние являются, по сути, смесью МНС-мономеров главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex), которые обычно биотилируются, а затем связываются с опорной структурой флуоресцирующего стрептовида на уровне групп антигена: 4 (тетрамер), 5 (пентамер), 10 (декстрамер). Эти МНС-мультимеры нагружаются антигенами выбора и затем связываются с Т-клетками, которые и узнают антиген, в результате чего определяется уровень ответа на специфический антиген [19]. Этот подход используется при разработке вакцин.

Анализ внутриклеточных цитокинов. Данный анализ включает в себя обработку клеток ингибиторами белкового транспорта (Brefeldin A или Monensin) в течение 2–12 ч. При этом цитокины, продуцируемые клетками, могут накапливаться внутри клеток, что способствует их лучшей детекции. Клетки можно стимулировать различными антигенами так же, как это делают пептиды вакцин. Вслед за ингибированием белкового транспорта клетки метят маркерами жизнеспособности и поверхностными маркерами, затем фиксируют и обрабатывают проникающими в клетки антителами против цитокинов.

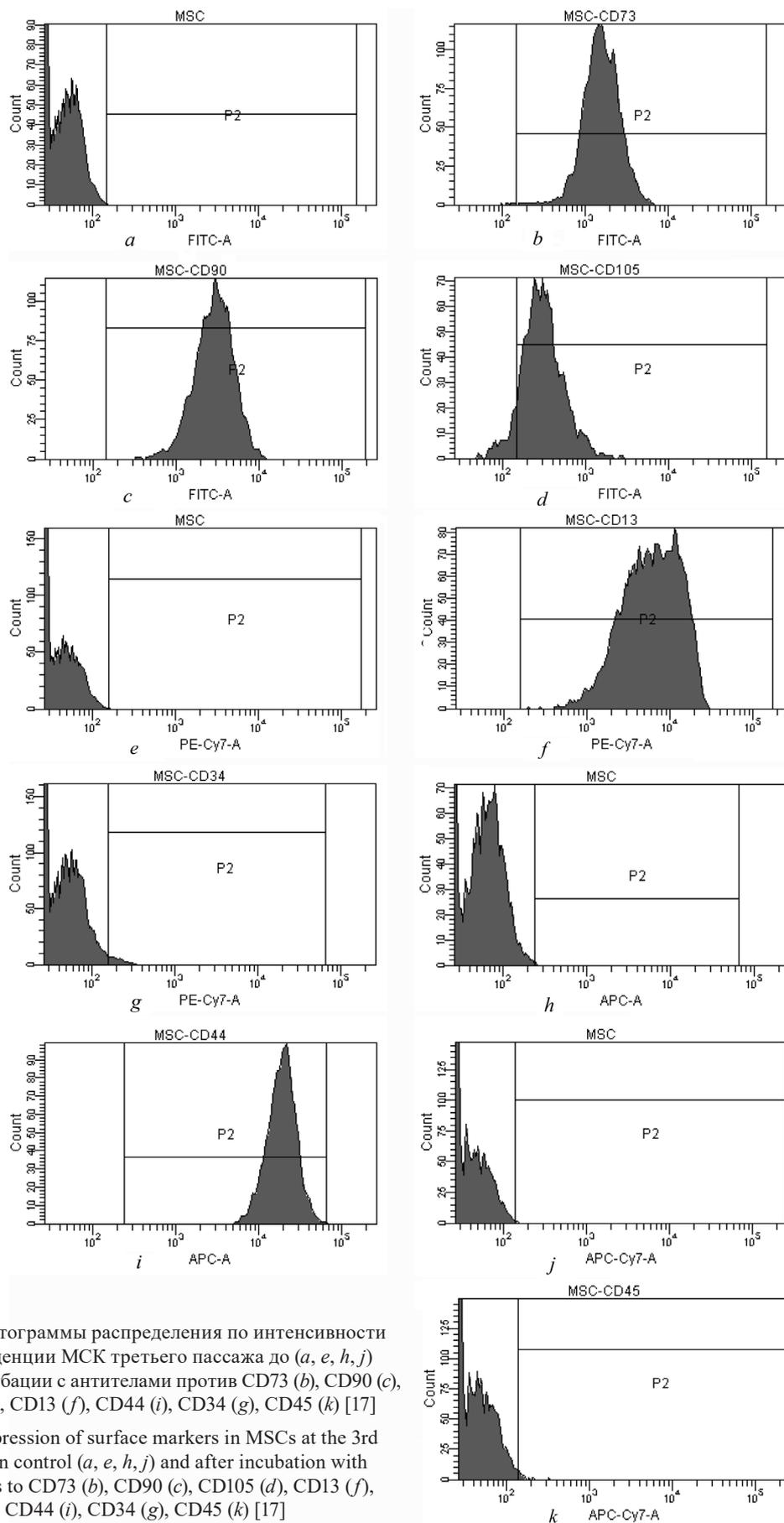


Рис. 4. Гистограммы распределения по интенсивности флуоресценции МСК третьего пассажа до (*a, e, h, j*) и после инкубации с антителами против CD73 (*b*), CD90 (*c*), CD105 (*d*), CD13 (*f*), CD44 (*i*), CD34 (*g*), CD45 (*k*) [17]

Fig. 4. Expression of surface markers in MSCs at the 3rd passage in control (*a, e, h, j*) and after incubation with antibodies to CD73 (*b*), CD90 (*c*), CD105 (*d*), CD13 (*f*), CD44 (*i*), CD34 (*g*), CD45 (*k*) [17]

Анализ пролиферации. Пролиферация клеток оценивается проточной цитометрией с помощью различных маркеров и методов. О пролиферативной активности клеток судят по включению в ДНК аналогов тимидина (BrdU), экспрессии связанных с пролиферацией антигенов (Ki67, PCNA), а для мониторинга поколений клеточного деления вводится перманентный краситель (CFSE). Для проведения проточной цитометрии применяют эквиваленты 3Н-тимидина – BrdU или EdU (этинилдезоксисуридин). Клеточные культуры инкубируются с данными соединениями в течение 2–6 ч, после чего клетки фиксируют и пермеабилзируют для определения инкорпорированного BrdU или EdU с использованием соответствующих антител. Определению BrdU предшествует обработка клеток ДНКазой (в случае EdU – ионами меди) с целью увеличения доступности антигенов для антител. В обоих методах применяется связывающийся с ДНК краситель иодид пропидия. Возможно также внутриклеточное окрашивание антителами других антигенов.

Экспрессия связанных с пролиферацией антигенов также может служить маркером пролиферации. Так, Ki67 экспрессируется в процессе пролиферации, но не на стадии покоя клеток. PCNA (ядерный антиген клеточной пролиферации) необходим для репликации ДНК. Наличие в системе Ki67 или PCNA является индикатором пролиферации [20]. CFSE и такие красители, как CellTrace Violet, Far Red, проникают через мембрану интактной клетки и ковалентно связываются с внутриклеточными соединениями, например аминами лизина. Дочерние клетки каждого последующего поколения «наследуют» краситель, но в меньшем количестве, что позволяет разделять поколения клеток по интенсивности флуоресценции зонда и в течение продолжительного времени отслеживать их пролиферацию [21, 22].

Анализ апоптоза. Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, часто привлекает внимание исследователей, работающих в области клеточной биологии, биофизики и молекулярной биологии. Апоптоз поддерживает гомеостаз многих систем организма посредством направленного удаления из него клеток и контролирует воспалительные процессы в организме (некроз). Вслед за иммунным ответом по механизму апоптоза в организме погибают клонированные Т-клетки, автореактивированные В-клетки, а кроме того, имеют место и другие события в иммунной системе.

Многие из этих процессов можно детектировать с помощью проточной цитометрии. Для определения в культуре МСК доли апоптозных и некротических клеток широко используются ДНК-связывающиеся красители в сочетании с флуоресцентными зондами (флуоресцеин диацетат, кальцеин ацетоксиметил), способными накапливаться в клетках вследствие их гидролиза внутриклеточными эстеразами [7, 17]. Данный подход отличается простотой выполнения и хорошей воспроизводимостью результата.

Повреждение плазматической мембраны клетки опосредуется аннексином V, представляющим собой белок, который связывает фосфолипид фосфатидилсерин. При апоптозе происходит его транслокация на наружный слой бислоидной фосфолипидной мембраны. Для определения наружного аннексина V окрашивание антителами против этого белка осуществляют в сочетании с окрашиванием проидиум иодидом. Разрушение ДНК эндонуклеазами в процессе апоптоза детектируется с помощью так называемого метода TUNEL (TdT, dUTP Nick End Labeling), который основан на способности терминальной дезоксирибонуклеотидтрансферазы (TdT) метить концевые участки разрывов ДНК дезоксиуридином (dUTP) или BrdU. В свою очередь dUTP или BrdU перед считыванием данных с проточного цитометра окрашиваются мечеными флуорохромами антителами. Конденсация хроматина в ядре исследуется с помощью красителя Hoechst 33342. Сигнальный путь каспаз в большинстве случаев активируется путем апоптоза. Этот процесс можно регистрировать с помощью внутриклеточного прокрашивания антителами, специфичными к активным формам каспазы-3. Кроме того, активность каспаз можно оценивать с использованием флуорогенного субстрата фермента, после деградации которого появляется флуоресценция. Многие методы проточной цитометрии направлены на регистрацию митохондриального апоптоза. Большинство таких методов связано с измерением мембранного потенциала митохондрий с помощью красителя JC-1. Также можно использовать антитело против белка APO2.7, который локализован на митохондриальной мембране и экспрессируется в ходе апоптоза [23].

Молекулярная биология. *Анализ флуоресцентных белков.* Флуоресцентные белки (GFP, mCherry, YFP, mRuby) используются как маркеры белковой экспрессии. Обычно наряду с флуоресцентным

белком при трансфекции в клетку вводится генетическая конструкция, содержащая промотор и нуклеотидную последовательность интересующего гена. При этом экспрессия флуоресцентного белка рассматривается в качестве индикатора экспрессии этого гена.

Недавно в проточной цитометрии стали использовать методы, основанные на экспрессии в клетках нефлуоресцирующих фрагментов флуоресцентных белков, присоединенных к другим белкам (bimolecular fluorescence complementation (BiFC), trimolecular fluorescence complementation (TriFC)). Фрагменты комплементарны, и при их объединении восстанавливается интактная структура флуоресцентного белка. Данный подход позволяет изучать РНК-белок и белок-белковые взаимодействия непосредственно в живых клетках [24]. Эта технология нашла применение при решении разных задач, например, таких, как передвижение трансплантируемых клеток *in vivo*, механизмы бактериальной или вирусной инфекции и нокаут генов.

Анализ клеточного цикла. Анализ клеточного цикла включает окрашивание ДНК насыщенными концентрациями красителей, связываемых ДНК. В большинстве случаев клетки фиксируются 70 %-ным этанолом, который увеличивает проницаемость плазматической мембраны, и окрашиваются красителем (иодид пропидия, 7-AAD, DAPI). Однако имеются красители (Hoescht 33342), которые входят в живую клетку, окрашивая ДНК, но не причиняя ей вреда. В ходе этого анализа образцы пропускают через проточный цитометр при низкой скорости потока при условии линейной амплификации сигнала, после чего данные анализируют с помощью вычислительной техники.

Проточная цитометрия и сигнальная трансдукция. Данное применение проточной цитометрии предполагает использование антител против фосфорилированных сигнальных молекул. Такой подход при окрашивании панели участников процесса трансдукции позволяет исследовать эти процессы в смешанных популяциях клеток.

Проточная цитометрия РНК. Проточная цитометрия РНК основывается на комбинации проточной цитометрии с флуоресцентной гибридизацией (FISH) с целью оценки экспрессии РНК и белков. Следует отметить, что при использовании этого метода большую роль играет оптимизация температурного режима прокрашивания, так как структура не всех красителей способна выдерживать инкубацию в течение 1 ч при температуре 40 °С. Этот метод может применяться, когда нет антител, необходимых для проведения экспериментов.

Сортинг клеток. Для сортировки клеток используются специально приспособленные проточные цитометры, способные разделять и очищать клетки или частицы (см. рис. 3). Важно отметить, что отсепарированы могут быть любые клетки или частицы, обладающие флуоресценцией. Современные сортеры позволяют разделять клетки непосредственно в 96- или 384-луночные планшеты. Особым видом объекта сортировки являются трансфицированные клетки, экспрессирующие флуоресцентные белки, стволовые клетки, опухолевые клетки и форменные элементы белой крови. Следует отметить также важность оптимизации концентрации антител в образце для избирательного окрашивания целевых клеток в большом клеточном массиве.

Другие области применения. Абсолютный подсчет клеток. При любом иммунофенотипическом эксперименте можно подсчитать количество исследуемых клеток. Для этого в ходе измерения используется шаблон – суспензия микросфер известной концентрации, близкой к концентрации клеток в образце. В конечном счете, сравнивая полученные результаты, можно определить точное количество клеток в 1 мл образца.

Количественная проточная цитометрия. В количественной проточной цитометрии также используются шаблоны с известным количеством флуоресцирующего объекта для построения кривой прокрашивания образца. Клетки исследуются в том же режиме, что и шаблон. В зависимости от системы шаблона полученные результаты могут быть представлены как количество связанных клетками антител на единицу объема образца (Antibody Binding Capacity, ABC), активность связанного антитела (Antibodies Bound per Cell, ABC) или количества молекул растворимого флуорохрома (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome, MESF). Наилучшим образом для этого подходит флуорохром PE, который из-за своего размера всегда связан с антителом в соотношении 1:1. Параметр MESF служит для конверсии относительной интенсивности флуоресценции в число флуоресцирующих молекул.

Исследование фагоцитоза. Используя маркированные флуорохромами биологические частицы, например бактерии, с помощью проточного цитометра можно зарегистрировать их фагоцитоз.

Бактерии метят чувствительным к изменению рН красителем, который флуоресцирует при низких значениях рН фагосом, свидетельствуя о том, что фагоцитоз произошел.

Анализ малых частиц. С помощью высокочувствительных проточных цитометров можно детектировать и сортировать экзосомы и другие субмикронные частицы клетки. Анализ экзосом, вирусов и других субклеточных частиц открывает новые перспективы в различных направлениях биологической науки, включая клеточную биологию, терапию опухолей и вирусологию. В настоящее время эти подходы бурно развиваются [25].

Анализ результатов. Стандарт проточной цитометрии 3:1 FCS. Данный стандарт был разработан в 1984 г. для того, чтобы привести в соответствие друг с другом самые различные результаты измерений, проведенных с помощью проточной цитометрии. Все файлы, содержащие результаты этих измерений, имеют расширение “.fcs”, что позволяет анализировать их на любом проточном цитометре.

Общепринятый анализ результатов проточной цитометрии. Данный анализ заключается в получении рисунка, описывающего окружение популяции (gating) и параметры, вытекающие из этих измерений. Это позволяет вычлнить специфические параметры клеток, необходимые для привлечения к эксперименту других маркеров. Например, хелпер Т-клеток может определяться по экспрессии CD3+ и CD4+, затем анализируются так называемые маркеры активации CD25 (IL-2R α), а также образование IFN- γ цитокина. Многие коммерческие компании предлагают программное обеспечение для обработки данных проточной цитометрии. Наиболее популярными программами являются FlowJo, FCS Express, WinList, Kaluza и WinMDI.

Анализ клеточного цикла. Программное обеспечение цитометра позволяет моделировать процесс клеточного цикла, определять фазу цикла и представлять полученные данные в виде гистограмм. Этот вид анализа хорошо обеспечивается программой ModFit LT. Кроме того, анализ клеточного цикла возможен и программой FlowJo.

Анализ многомерных данных. Данный анализ, использующий 14 и более параметров на базе традиционной канальной стратегии, является громоздким и занимает много времени. При этом могут потеряться интересные популяции клеток, так как необходимое соотношение маркеров в образце часто очень трудно определить. Для решения этой проблемы предлагаются новые инструменты, например метод SPADE (spanning-tree progress ion analysis).

Список использованных источников

1. Shapiro, H. M. Practical flow cytometry. 4th ed. / H. M. Shapiro. – New York : Wiley-Liss, 2003. – 681 p.
2. Хайдуков, С. В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка // Мед. иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4–5. – С. 373–378.
3. McKinnon, K. M. Flow cytometry : an overview / K. M. McKinnon // Curr. Prot. Immunol. – 2018. – Vol. 120. – P. 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
4. Pranab, D. Diagnostic flow cytometry in cytology / D. Pranab. – New York : Springer, 2021. – 194 p.
5. Barteneva, N. S. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems / N. S. Barteneva, E. Fasler-Kan, I. A. Vorobjev // J. Histochem. Cytochem. – 2012. – Vol. 60, N 10. – P. 723–733. <https://doi.org/10.1369/0022155412453052>
6. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate / U. Sack [et al.] // Cytometry. – 2006. – Vol. 69, N 3. – P. 169–172. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20231>
7. Пинчук, С. В. Влияние ростовых факторов на некроз и апоптоз мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при окислительном воздействии трет-бутилгидропероксида *in vitro* / С. В. Пинчук, Е. С. Лобанок, И. Д. Волотовский // Докл. НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 2. – С. 79–83.
8. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service / J. Luider [et al.] // Lab. Hematol. – 2004. – Vol. 10. – P. 102–108. <https://doi.org/10.1532/LH96.04121>
9. Claude, L. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of new flow cytometer / L. Claude, C. Lobagiu, C. Genin // Cytometry, Part B. – 2005. – Vol. 70, N 1. – P. 29–38. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20072>
10. Leipold, M. D. Multiparameter phenotyping of human PBMCs using mass cytometry / M. D. Leipold, E. W. Newell, H. T. Maecker // Meth. Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1343. – P. 81–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_7
11. Mei, H. E. Platinum-conjugated antibodies for application in mass cytometry / H. E. Mei, M. D. Leipold, H. T. Maecker // Cytometry, Part A. – 2016. – Vol. 89, N 3. – P. 292–300. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22778>
12. Tsien, R. Y. Green fluorescent protein / R. Y. Tsien // Ann. Rev. Biochem. – 1998. – Vol. 67. – P. 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
13. Matz, M. V. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species / M. V. Matz [et al.] // Nat. Biotechnol. – 1999. – Vol. 17, N 10. – P. 969–973. <https://doi.org/10.1038/13657>

14. Day, R. N. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging / R. N. Day, M. W. Davidson // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – Vol. 38, N 10. – P. 2887–2921. <https://doi.org/10.1039/b901966a>
15. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry / S. P. Perfetto [et al.] // *J. Immunol. Meth.* – 2006. – Vol. 313, N 1–2. – P. 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.04.007>
16. He, X. H. Procedure for preparing peptide-major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes / X. H. He, L. H. Xu, Y. Liu // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 4180–4187. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i27.4180>
17. The effect of quercetin on hepatic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells / S. V. Pinchuk [et al.] // *Cell Tiss. Biol.* – 2016. – Vol. 10. – P. 357–364. <https://doi.org/10.1134/S1990519X16050102>
18. Immunophenotyping and transcriptional profiling of *in vitro* cultured human adipose tissue derived stem cells / A. Mieczkowska [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 11339. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29477-5>
19. Dolton, G. More tricks with tetramers: a practical guide to staining T cells with peptide-MHC multimers / G. Dolton // *Immunology.* – 2015. – Vol. 146, N 1. – P. 11–22. <https://doi.org/10.1111/imm.12499>
20. Landberg, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation / G. Landberg, G. Roos // *Cell Prolif.* – 1993. – Vol. 26, N 5. – P. 427–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1993.tb00130.x>
21. Use of CFDA-SE for evaluating the *in vitro* proliferation pattern of human mesenchymal stem cells / S. Urbani [et al.] // *Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8, N 3. – P. 243–253. <https://doi.org/10.1080/14653240600735834>
22. Monitoring cell proliferation by dye dilution: considerations for probe selection / J. D. Tario [et al.] // *Meth. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 1678. – P. 249–299. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_12
23. Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7 / S. K. Koester [et al.] // *Cytometry.* – 1997. – Vol. 29, N 4. – P. 306–312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19971201\)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19971201)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7)
24. *In vivo* imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems / Y. Han [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2014. – Vol. 42, N 13. – P. e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gku408>
25. Employing flow cytometry to extracellular vesicles sample microvolume analysis and quality control / J. Maia [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 8. – Art. 593750. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593750>

References

1. Shapiro H. M. *Practical flow cytometry. 4th ed.* New York, Wiley-Liss, 2003. 681 p.
2. Khaidukov S. V., Zurochka A. V. Flow cytometry as a modern analytical tool in biology and medicine. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical immunology], 2007, vol. 9, no. 4–5, pp. 373–378 (in Russian).
3. McKinnon K. M. Flow cytometry : an overview. *Current Protocols in Immunology*, 2018, vol. 120, no. 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
4. Pranab D. *Diagnostic flow cytometry in cytology.* New York, Springer Publ., 2021. 194 p.
5. Barteneva N. S., Fasler-Kan E., Vorobjev I. A. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2012, vol. 60, no. 10, pp. 723–733. <https://doi.org/10.1369/0022155412453052>
6. Sack U., Scheibe R., Wotzel M., Hammerschmidt S., Kuhn H., Emmrich F., Hoheisel G., Wirtz H., Gessner C. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry*, 2006, vol. 69, no. 3, pp. 169–172. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20231>
7. Pinchuk S. V., Lobanok E. S., Volotovskii I. D. Influence of growth factors on the necrosis and apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells under the oxidative action of tert-butyl-hydroperoxide *in vitro*. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus], 2013, vol. 57, no. 2, pp. 79–83 (in Russian).
8. Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Laboratory Hematology*, 2004, vol. 10, pp. 102–108. <https://doi.org/10.1532/LH96.04121>
9. Claude L., Lobagiu C., Genin C. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of new flow cytometer. *Cytometry, Part B*, 2005, vol. 70, no. 1, pp. 29–38. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20072>
10. Leipold M. D., Newell E. W., Maecker H. T. Multiparameter phenotyping of human PBMCs using mass cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 2015, vol. 1343, pp. 81–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_7
11. Mei H. E., Leipold M. D., Maecker H. T. Platinum-conjugated antibodies for application in mass cytometry. *Cytometry, Part A*, 2016, vol. 89, no. 3, pp. 292–300. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22778>
12. Tsien R. Y. Green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, vol. 67, pp. 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
13. Matz M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L., Lukyanov S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, no. 10, pp. 969–973. <https://doi.org/10.1038/13657>
14. Day R. N., Davidson M. W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, 2009, vol. 38, no. 10, pp. 2887–2921. <https://doi.org/10.1039/b901966a>
15. Perfetto S. P., Chattopadhyay P. K., Lamoreaux L., Nguyen R., Ambrozak D., Koup R. A., Roederer M. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 2006, vol. 313, no. 1–2, pp. 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.04.007>

16. He X. H., Xu L. H., Liu Y. Procedure for preparing peptide-major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, vol. 11, pp. 4180–4187. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i27.4180>

17. Pinchuk S. V., Vasilevich I. B., Kvacheva Z. B., Volotovskii I. D. The effect of quercetin on hepatic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Biology*, 2016, vol. 10, pp. 357–364. <https://doi.org/10.1134/S1990519X16050102>

18. Mieczkowska A., Schumacher A., Filipowicz N., Wardowska A., Zieliński M., Madanecki P. [et al.]. Immunophenotyping and transcriptional profiling of *in vitro* cultured human adipose tissue derived stem cells. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 11339. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29477-5>

19. Dolton G., Tungatt K., Lloyd A., Bianchi V., Theaker S. M., Trimby A. [et al.]. More tricks with tetramers: a practical guide to staining T cells with peptide-MHC multimers. *Immunology*, 2015, vol. 146, no. 1, pp. 11–22.

20. Landberg G., Roos G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Proliferation*, 1993, vol. 26, no. 5, pp. 427–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1993.tb00130.x>

21. Urbani S., Caporale R., Lombardini L., Bosi A., Saccardi R. Use of CFDA-SE for evaluating the *in vitro* proliferation pattern of human mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 3, pp. 243–253. <https://doi.org/10.1080/14653240600735834>

22. Tario J. D., Conway A. N., Muirhead K. A., Wallace P. K. Monitoring cell proliferation by dye dilution: considerations for probe selection. *Methods in Molecular Biology*, 2018, vol. 1678, pp. 249–299. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_12

23. Koester S. K., Roth P., Mikulka W. R., Schlossman S. F., Zhang C., Bolton W. E. Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Cytometry*, 1997, vol. 29, no. 4, pp. 306–312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19971201\)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19971201)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7)

24. Han Y., Wang S., Zhang Z., Ma X., Li W., Zhang X., Deng J., Wei H., Li Z., Zhang X-E., Cui Z. *In vivo* imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 13, p. e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gku408>

25. Maia J., Batista S., Couto N., Gregório A. C., Bodo C., Elzanowska J., Moraes M. C. S., Costa-Silva B. Employing flow cytometry to extracellular vesicles sample microvolume analysis and quality control. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, vol. 8, art. 593750. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593750>

Информация об авторах

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

Пинчук Сергей Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pinchuksv@mail.ru

Information about the authors

Igor D. Volotovskii – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovskii@yahoo.com

Sergei V. Pinchuk – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchuksv@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 633.31/37:631.46
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-243-256>

Поступила в редакцию 15.12.2021
Received 15.12.2021

Я. К. Куликов

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ СИМБИОЗОВ И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ РЕСУРСΟΣБЕРЕГАЮЩИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Аннотация. Обоснована возможность использования полифункциональных свойств растительно-микробных симбиозов при разработке ресурсосберегающих технологий в растениеводстве. Проведена экологическая оценка взаимодействия генотипов бобовых культур с ризосферной микрофлорой и показана роль растительно-микробных систем в накоплении биологического азота. Выявлено положительное влияние растительно-микробных взаимодействий на биогенность почвы и адаптацию растений к биотическим стрессам.

Ключевые слова: растительно-микробные симбиозы, ризосферная микрофлора, биогенность почвы, микробиологические препараты, биологический азот

Для цитирования: Куликов, Я. К. Экологические функции растительно-микробных симбиозов и их роль в развитии ресурсосберегающих биотехнологий / Я. К. Куликов // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 243–256. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-243-256>

Yaroslav K. Kulikou

Belarussian State University, Minsk, Republic of Belarus

ECOLOGICAL FUNCTIONS OF PLANT-MICROBIAL SYMBIOSES AND THEIR ROLE IN THE DEVELOPMENT OF RESOURCE-SAVING BIOTECHNOLOGIES

Abstract. The possibility of using the polyfunctional properties of plant-microbial symbiosis in the development of resource-saving technologies in crop production has been substantiated. An ecological assessment of the interaction of legume genotypes with rhizosphere microflora was carried out, and the role of plant-microbial systems in the accumulation of biological nitrogen was shown.

The positive effect of plant-microbial interactions on soil biogenicity and plant adaptation to biotic stresses was revealed.

Keywords: plant-microbial symbioses, rhizosphere microflora, soil biogenicity, microbiological preparations, biological nitrogen

For citation: Kulikou Ya. K. Ecological functions of plant-microbial symbioses and their role in the development of resource-saving biotechnologies. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 243–256 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-243-256>

Введение. Понимание первостепенной роли продовольственной безопасности страны позволило сформулировать важнейшие национальные приоритеты, среди которых на первый план выходит энерго- и ресурсосбережение. В сельском хозяйстве эта проблема наиболее актуальна, поскольку агропромышленный комплекс Беларуси традиционно входит в число самых энергоёмких отраслей народного хозяйства. В этой связи наиболее важным с точки зрения энергоресурсосбережения, а также получения экологически безопасной и качественной продукции растениеводства является использование в сельскохозяйственной практике растительно-микробных симбиозов. Симбиотические взаимодействия с микроорганизмами играют исключительно важную роль в жизни растений, обеспечивая их минеральное питание, адаптацию к абиотическим стрессам, а также защиту от патогенов и вредителей [1].

Активное изучение бобово-ризобияльного, эндомикоризного и ассоциативного симбиоза инициировало появление на рынке биопрепаратов на основе моно- и поликомпонентного микробного сообщества, которые позволяют снизить дозы применяемых химических средств защиты растений и минеральных удобрений, способствуют повышению качества продукции, безвредны

для живых объектов и не вызывают эффекта привыкания к ним насекомых. Однако существующие на сегодняшний день технологии возделывания сельскохозяйственных культур не предусматривают использования полезных ризосферных микроорганизмов в качестве важнейших составляющих снижения энергозатратности и повышения адаптивности агрофитоценозов [2].

Поэтому с точки зрения целесообразности применения в сельскохозяйственной практике микробно-растительных систем необходим комплексный подход к изучению и разработке способов повышения их эффективности за счет средств эндогенной и экзогенной регуляции. Изучение возможности использования растительно-микробных взаимодействий в современных биотехнологиях вносит уникальный вклад в агроэкологию, обеспечивая системное использование эндо- и экзогенных факторов их регуляции на уровне агрофитоценоза и открывает возможность для разработки путей к ресурсосбережению и совершенствованию производства продукции растениеводства.

Цель работы – обсуждение ресурсосберегающих принципов оптимизации агроэкологического состояния фитоценозов с учетом полифункциональных свойств растительно-микробных симбиозов.

Реализация основных положений данной работы позволит создать высокоэффективную, экологически безопасную и конкурентоспособную продукцию растениеводства, а главное – сохранить землю для будущих поколений.

Растительно-микробные взаимодействия в агроэкосистемах. Особую роль для сельскохозяйственной экологии представляют взаимоотношения растений и почвенных микроорганизмов. Наиболее изученными являются три типа микробно-растительных симбиозов: азотфиксирующий (например, бобово-ризобияльный), микоризный и защитный (ассоциации растений с полезными ростстимулирующими ризобактериями) [3].

Азотфиксирующий симбиоз. К настоящему времени выделено и описано свыше 50 видов азотфиксирующих бактерий, принадлежащих к 12 различным семействам. Активные штаммы ассоциативных азотфиксаторов относятся к родам *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Aquaspirillum*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Rhodospirillum*, *Xantobacter*. Сейчас усиленно исследуются свойства этих бактерий, условия их функционирования и взаимоотношения с высшими растениями. К наиболее изученным из них следует отнести род *Azospirillum* [4].

Размеры азотфиксации в ризосфере зерновых культур при благоприятных экологических условиях (зона тропиков и субтропиков) могут достигать значительных величин: 44–80 кг/га у риса и 34–45 кг/га у пшеницы. Однако в зоне умеренного климата эти показатели в 1,5–3 раза ниже [5].

Колоссальное значение представляет бобово-ризобияльный симбиоз. Азотфиксация различными видами бобовых варьируется от 50 до 300 кг/га в год. Это может быть обусловлено типом роста стебля. Так, более высоким уровнем фиксации азота по сравнению с детерминантными формами бобовых отличаются виды растений с индетерминантным ростом (маш, вигна, каянус, люцерна). Однако многолетние исследования Н. А. Проворова [6] показали, что преобладание симбиотрофного питания азотом характерно для малокультуренных видов бобовых (клевер сходный, вика мохнатая), а преобладание автотрофного питания – для высококультуренных видов бобовых. При этом наиболее резкие межвидовые различия по эффективности симбиотрофного питания азотом выявлены для видов, образующих недетерминантные клубеньки с «амидным типом» ассимиляции фиксированного азота (горох, вика, люцерна, козлятник, клевер), тогда как у бобовых с детерминированными клубеньками «уреидного типа» (соя, фасоль, маш, арахис) эти различия выражены не столь резко.

Особенно важное значение уникальные возможности микроорганизмов по фиксации атмосферного азота приобретают в связи с усилением антропогенного воздействия на агроэкосистемы. Наземные биологические системы восстанавливают около 175–190 млн т атмосферного азота ежегодно, из которых 90–110 млн т приходится на почвы агроэкосистем [7]. При симбиотической фиксации все 100 % минерализованного азота воздуха усваиваются культурой, поскольку сам процесс расщепления молекулы азота воздуха происходит внутри растений – в клубеньке, а восстановленные формы азота в виде аминокислот поступают в растущие вегетативные или

генеративные органы. Это исключает загрязнение почв, водоемов и атмосферы, которое имеет место при внесении азотных минеральных удобрений. Использование бобовых культур в смешанных посевах способствует значительному снижению (до 30–40 %) вымывания нитратов в нижние горизонты почвы и попадания их в грунтовые воды [8].

По мнению многих исследователей, симбиоз бобовых с клубеньковыми бактериями способствует повышению плодородия почвы и увеличению урожайности последующих культур севооборота, что позволяет уменьшить нормы применения азотных удобрений и снизить себестоимость продукции минимум на 20 % [9]. По расчетам Е. Н. Мишустина и Н. И. Черепкова, зернобобовые оставляют после себя в среднем около 20 кг/га биологически связанного азота [10]. При этом количество азота воздуха, поступающего в почву, определяется видом выращиваемой культуры и ее урожайностью. Так, после гороха остается 8–21 кг/га симбиотического азота, а после сои в условиях Дальнего Востока при урожайности 14–17 ц/га остается примерно столько же (8–23 кг/га) фиксированного азота, положительно влияющего на последующую культуру севооборота. При средней урожайности люпина узколистного 2,8 т/га зерна в почву поступает 112 кг/га общего азота, в том числе 74 кг/га симбиотического, который обеспечивает прирост урожая пшеницы на 0,58 т/га [11].

Обеспечение растений фиксированным азотом – важнейшая, но не единственная задача диазотрофов. Определена роль клубеньковых бактерий в защите семян и растений от ряда грибковых и бактериальных инфекций. Инокулированные растения обеспечиваются гиббериллинами, ауксинами, цитокининами, протопорфиринами, комплексом витаминов группы В, каратиноидами и другими физиологически активными соединениями, которые оказывают воздействие на рост, развитие, фотосинтетическую деятельность растений, транспорт в них ассимилятов и на другие физиологически активные процессы [12]. Инокуляция семян бобовых *Rhizobium* положительно сказывается на фосфорном и калийном питании растений и приводит к увеличению поглотительной способности корневой системы и повышению за счет этого «встречаемости» корней с минеральными элементами [13].

Совместная инокуляция азоспириллами и ризобиями или внесение азоспирилл к естественной популяции ризобий способствовали колонизации корней бобовых растений, что приводило к увеличению азотфиксирующей активности, количества клубеньков, а в конечном счете и урожая растений [14].

Также известно, что сельскохозяйственные культуры, выращенные за счет питания их биологическим, а не техническим азотом, обладают большей резистентностью к воздействию вредителей и возбудителей болезней. Например, активный азотфиксатор *Klebsiella planticola* ТСХА-91 обладал фунгистатической активностью по отношению к ряду фитопатогенных грибов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Thelaviopsis*, *Alternaria*, *Mucor*, что было обусловлено его способностью к биосинтезу антибиотических веществ антрамицинового ряда. Бактеризация некоторыми штаммами ассоциативных диазотрофов уменьшала поражаемость растений озимой пшеницы, ярового ячменя и картофеля фузариозом, ризоктониозом, паршой обыкновенной и корневыми гнилями в 1,5–2 раза [15].

Таким образом, азотфиксирующие симбиозы для агрофитоценозов не только обеспечивают растения доступным азотом, но и оказывают положительное влияние на продуктивность последующих культур в севообороте, улучшают фитосанитарное состояние и активизируют микробиологическую активность почв, сокращают использование азотных удобрений и дают возможность получать экологически безопасную продукцию растениеводства.

Микоризный симбиоз. Микориза – наиболее широко распространенная и экологически значимая форма растительно-микробного взаимодействия: способность к образованию той или иной формы микоризы свойственна 80–90 % видов наземных растений. Поскольку микориза обладает огромным адаптивным потенциалом и распространена во всех климатических зонах Земли, она выступает основным фактором стабильности и разнообразия фитоценозов и может быть использована в качестве восстановителя нарушенных экосистем [16].

Значительный интерес для сельскохозяйственной практики представляет неспецифическая форма эндомикоризы – арбускулярная микориза (АМ), которую образуют грибы рода *Glomus* (группа *Glomeromycota*). При взаимодействии с растениями-хозяевами микоризные грибы претер-

певают сложные морфогенетические изменения, которые не могут быть осуществлены вне симбиоза. Многоэтапный процесс развития арбускулярной микоризы можно разделить на 4 основных этапа: 1) преинфекционные взаимодействия; 2) формирование межклеточного мицелия; 3) развитие внутриклеточных симбиотических структур; 4) формирование наружного (внекорневого) мицелия. Как правило, обоюдный обмен метаболитами между симбионтами осуществляется в арбускулах, которые являются основной структурно-функциональной единицей данного типа симбиоза [17].

Выполняя функцию питания растений, АМ является одним из ключевых факторов выживания растений в условиях жесткой конкуренции за трофические ресурсы почвы. Формирование АМ улучшает рост растений и за счет увеличения рабочей поверхности корня обеспечивает улучшенную ассимиляцию труднорастворимых фосфатов и других питательных элементов почвы, являясь в сельском хозяйстве естественной альтернативой внесению больших количеств удобрений, главным образом фосфорных [16, 18]. Подсчитано, что на 1 м корней развивается 70–80 м гиф АМ-грибов, что многократно повышает адсорбционную способность корней. Важной особенностью внекорневых гиф является их способность проникать в корни соседних растений, создавая возможность для их обмена метаболитами. Однако внесение повышенных доз фосфорных удобрений приводит к снижению эффекта от микоризации. При этом микоризные грибы инициируют устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам и принимают участие в защите растений от патогенных организмов [19].

Велика роль микоризы и в снабжении растений водой. Данная функция особенно важна в условиях недостаточной влажности, так называемой физиологической сухости и засоленности почв. В холодных таежных и сухих полупустынных и пустынных областях микориза становится практически единственной формой почвенного питания растений. Представляя столь многочисленные преимущества растениям, грибы получают от них углеводы (образованные в результате фотосинтеза), которые не способны синтезировать сами [18].

Опыт зарубежных и отечественных ученых также демонстрирует, что инфицирование растений АМ-грибами улучшает показатели их фотосинтетической деятельности (площадь листовой поверхности, скорость фиксации углекислого газа, содержание хлорофилла) и усиливает отток продуктов фотосинтеза в корни [20]. Грибами микоризообразователями могут минерализоваться многие органические соединения, в результате чего улучшается питание растений не только фосфором, но и азотом [21].

Совершенствование методов молекулярно-генетического анализа позволило выяснить, что в развитии микоризы и азотфиксирующих клубеньков участвуют «общие» гены [22]. Nod-факторы, синтезируемые ризобиями и активирующие ранние стадии клубенькообразования, стимулируют микоризацию корней. Многие компоненты сигнального каскада, управляющие развитием клубеньков у бобовых, принимают участие и в развитии АМ.

Сходство между азотфиксирующим и эндомикоризным симбиозами растений позволяет рассматривать генетическую систему бобовых растений, контролирующую их симбиотические свойства, как единую для развития тройного симбиоза – бобовое растение + эндомикоризные грибы + клубеньковые бактерии. При этом за счет улучшения азотного и фосфорного питания повышаются продуктивность растения-хозяина и его устойчивость к стрессам и ослабляется конкуренция между растениями, что крайне необходимо для создания высокоэффективных агроценозов.

Защитный симбиоз. Осуществление биоконтроля (подавление активности патогенных микробов) – важнейший механизм растительно-микробных взаимодействий. Достаточно вспомнить, что ежегодные потери урожая во всем мире от различных заболеваний сельскохозяйственных растений, вызываемых патогенами микробной, грибной, вирусной и иной природы, достигают 540 млн т, что соответствует 50 млрд долларов [22]. Для борьбы с возбудителями болезней растений чаще всего используют химические препараты, далеко не всегда отвечающие требованиям экологической безопасности.

Защитными функциями от фитопатогенов обладают микроорганизмы, колонизирующие наружные поверхности растений. Большая и гетерогенная группа бактерий, оказывающих положи-

тельное действие на растения, была объединена под названием PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) – ростстимулирующие ризобактерии. В эту группу были включены представители многих родов, но прежде всего *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. chloraphis*, *P. corrugate*, *P. putida*), *Serratia* (*S. marcescens*) и *Bacillus* (*B. cereus*) [23]. Им присуща высокая динамичность роста и способность поселяться в ризосфере (узкий слой почвы, непосредственно прилегающий к поверхности корней) и ризоплане (поверхности корня, включающие углубления и «карманы», образованные неравномерностью роста тканей и отмиранием клеток) культивируемых растений, а иногда и внутри корня, образуя ассоциации с корнями растения, но без формирования на них специализированных структур типа симбиотических клубеньков бобовых растений. Наилучшими экологическими нишами для PGPR являются участки максимального выброса корневых экссудатов (зона элонгации корня), через которые может экскретироваться до 30 % продуктов растительного фотосинтеза. При этом концентрация бактерий в прикорневой зоне может быть в 10–100 раз выше, чем в почве (ризосферный эффект), и существенно изменяется состав микробного сообщества.

Способность подавлять развитие заболеваний растений может осуществляться двумя путями: 1) за счет синтеза микросимбиотом антибиотических метаболитов, ингибирующих патогены; 2) вследствие индукции иммунных реакций растения-хозяина.

Роль продукции антибиотиков в защите растений непосредственно в почве была показана Д. В. Мавроди [24], исследовавшего бактеризацию семян пшеницы штаммом *P. fluorescens* 2-79 и его дефектным по синтезу феназинового антибиотика мутантом. Защиту растений от возбудителя корневой гнили обеспечивал только исходный штамм с нормальной продукцией феназин-1-карбоновой кислоты.

У энтеробактерий часто ярко выражена способность к подавлению роста фитопатогенов. Активный азотфиксатор *Klebsiella planticola* TCXA-91 обладал фунгистатической активностью по отношению к ряду фитопатогенных грибов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Thelaviopsis*, *Alternaria*, *Mucor*, что обусловлено его способностью к биосинтезу антибиотических веществ антрамицинового ряда. Развитие твердой головки на яровой пшенице эффективно предотвращали штаммы *Bacillus subtilis* ИБ-15, *Bacillus sp.* 739. Некоторые штаммы *Serratia* и *Bacillus* продуцируют внеклеточные хитиназы, благодаря которым происходит ингибирование патогенов (например, *Fusarium*) на различных стадиях их развития, включая прорастание конидий и развитие гиф на поверхности корней [25].

Ризобактерии активно продуцируют такие антибиотики, как 2,4-диацетил-флороглюканол, пиролнитрин, пиолотеорин, 2-гексил-5-пропил резорцинол и циклические липопептиды [26]. При этом прямое подавление патогенов наблюдается при активной колонизации поверхности корня. Однако в ряде случаев подавление деятельности патогенов осуществляется малыми количествами бактерий, поскольку инокуляция ризобактериями приводит к индукции у растений системной устойчивости (ISR-реакция), что обуславливает невосприимчивость растений к инфекции патогенами. Чаще всего это наблюдается при колонизации бактериями ризопланы или при проникновении их в наружные ткани корня.

Индукция резистентности к фитопатогенам продемонстрирована в работах А. М. Боронина [27]. Например, обработка корней бобов и гвоздики определенными штаммами *P. putida* повышала устойчивость растений к *Fusarium solani*. При этом отмечалось усиление лигнификации корневой ткани и повышение содержания фитоалексинов в стеблях растений. В опытах с *P. fluorescens* было показано, что данный штамм помимо антибиотиков и сидерофоров продуцировал цианистый водород и эффективно подавлял заболевания табака, вызываемые фитопатогенным грибом *Thielaviopsis basicola*.

Установлено, что при инокуляции корней *Medicago truncatula* биоконтрольным штаммом *P. fluorescens* наблюдается индукция некоторых генов растений, контролирующих сигнальное взаимодействие с ризобиями и микоризными грибами, что доказывает общность молекулярных механизмов взаимодействия растений с внутриклеточными и ассоциативными симбионтами [28].

Увеличение количества азотфиксирующих клубеньков и повышение активности нитрогеназы может происходить за счет выделения ассоциативными бактериями индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) или изменения метаболизма флавоноидов у растения. Также имеются сведения о том, что инокуляция растений ассоциативными ризосферными бактериями приводит к стимуляции

эндосимбиоза с АМ, что в конечном итоге улучшает накопление биомассы инокулированными растениями и выражается в формировании тройственных растительно-микробных симбиозов [29].

Многие ризосферные бактерии способны синтезировать различные фитогормоны и, в частности, ИУК, которые могут стимулировать рост растений на различных стадиях развития. Ризосферные бактерии могут содействовать поступлению в растения минеральных веществ, переводя их из нерастворимой формы в растворимую, синтезировать некоторые низкомолекулярные соединения и ферменты, например АСС-дезаминазу, предотвращающую синтез стрессового растительного гормона – этилена, что также приводит к улучшению роста растений [30].

Следовательно, широкий комплекс функций защитных ризосферных ассоциаций, включая питание растений, повышение устойчивости к абиотическим стрессам, стимуляцию азотфиксирующей способности, свидетельствует о значительных перспективах использования защитных симбиозов в сельскохозяйственной практике.

Экзогенная регуляция растительно-микробных взаимодействий. Для формирования эффективного симбиоза необходимо изучить требования биологии каждой симбиотической системы к параметрам основных факторов среды и с помощью агротехнических приемов обеспечить эти параметры.

Первое условие активного симбиоза – наличие специфичного вирулентного активного штамма микроорганизма. Это связано с тем, что внутри каждого вида есть штаммы бактерий, наиболее приспособленные только к определенному виду или сорту культуры (специфичность). Специфичные штаммы одного вида обладают вирулентностью, т. е. неодинаковой способностью проникать в корень бобового растения. Некоторые специфичные вирулентные штаммы рода *Rhizobium* в симбиозе с растением-хозяином интенсивно фиксируют азот воздуха, у других штаммов фиксация азота протекает медленнее и в меньших объемах [31].

Инокуляция семян дает неодинаковый эффект в различных условиях: иногда она обеспечивает прибавку урожая, а в некоторых случаях оказывается бесполезной [32]. Следовательно, инокуляция необходима лишь в тех случаях, когда в почве отсутствуют специфичные спонтанные бактерии. В основном это относится к интродуцируемым малораспространенным в конкретном районе культурам (лядвенец рогатый, козлятник восточный).

Для ассоциативного симбиоза необходимо также проводить тщательный подбор партнеров. Макросимбионт – растение и микросимбионт – микроорганизм должны быть комплементарны друг другу, т. е. наилучшим образом соответствовать и взаимодействовать между собой. Ряд авторов считают, эффективность азоспириллы в большей степени зависит от происхождения бактерий, чем от их таксономической принадлежности. Это положение нашло свое подтверждение в результатах исследований бельгийских авторов [33], которые на 10 сортах пшеницы показали, что азоспириллы, выделенные из одноименной культуры, дают более высокий прирост урожая, чем азоспириллы, выделенные из кукурузы. В свою очередь на кукурузе более эффективным оказался гомологический штамм *A. poliferum* по сравнению с линией *A. brasilense*, выделенной из риса.

В целом имеющиеся литературные данные свидетельствуют о позитивном влиянии азоспирилл на растительный организм, поскольку они являются достаточно универсальными агентами по сравнению с клубеньковыми бактериями. Дальнейшие исследования должны быть направлены на создание для каждого региона конкретных растительно-микробных систем, в которых эффективность инокуляции будет высокой и стабильной. Это даст возможность для экономически выгодного использования *Azospirillum* в производственных целях.

Вторым важнейшим фактором, ограничивающим активность симбиоза, главным образом бобово-ризобиального, считается повышенная кислотность почвы. Для большинства бобовых культур оптимальное значение рН находится в пределах 6,5–7,5. Доказана устойчивая специфичная реакция симбионтов на изменение рН. Например, лядвенец рогатый удовлетворительно фиксирует азот воздуха (120 кг/га) и дает достаточно высокий урожай сена – 6,5 т/га даже при рН 4,2. Клевер луговой при той же кислотности фиксирует азота в 9 раз меньше, а люцерна не усваивает азот воздуха. При снижении кислотности до рН 6,5 урожайность лядвенца возросла в 1,5 раза, клевера лугового – в 4, а люцерны – в 6 раз. По мнению В. К. Шильниковой, кислая реакция среды

в значительной степени влияет на ультраструктуру клубеньковой ткани. Это проявляется в сокращении времени активного функционирования инфекционных нитей. Как при низких, так и при высоких значениях pH ухудшаются свойства клубеньковых растений – снижается способность инфицирования корней, уменьшается азотфиксирующая активность [34].

Диапазон pH, при котором развиваются ассоциативные diaзотрофы, также достаточно широк. Например, азоспириллы способны адаптироваться к широкому диапазону pH – от 3,2 до 8,5. В большинстве публикаций отмечается, что оптимальной для связывания атмосферного азота является нейтральная или слабокислая реакция среды. При этом наблюдаются различия по родам, видам и даже штаммам бактерий. Например, *Azospirillum* лучше всего развиваются при pH 6,5–7,0, *Klebsiella* – при 6,8–7,0, *Entherobacter* – при 7,0 [35].

Третьим по важности фактором, определяющим величину и активность симбиотической системы, является влажность почвы [36]. Усвоение азота воздуха при низкой влажности почвы прекращается не вследствие недостатка воды в клубеньках (клубеньки сами не поглощают воду, они получают ее через корни), а из-за нехватки энергетических материалов – углеводов, которые расходуются на рост новых корешков, «ищущих» воду.

В засушливые годы клубеньки формируются мелкие и неактивные или не образуются вообще. Несмотря на специфику биологии отдельных культур, для большинства из них оптимум влажности для активного бобово-ризобияльного симбиоза находится в пределах от 100 % до влажности разрыва капилляров (около 62 % ППВ) [37].

Вегетационные опыты, проведенные на темно-серой лесной почве и выщелоченном черноземе, показали, что лучшее развитие растений и образование клубеньков, а также самый высокий урожай фасоли отмечаются при влажности почвы 60 % ППВ. При дальнейшем увеличении и уменьшении влажности снижались как количество и масса клубеньков, так и урожайность фасоли. Из-за снижения аэрации ухудшалось снабжение симбиотического аппарата кислородом [38].

Аэрация почвы играет важную роль в процессе симбиотической азотфиксации, так как последняя является аэробным процессом [31]. На 1 мл фиксированного азота воздуха расходуется 3 мл кислорода. Большая часть клубеньков обычно образуется в наиболее аэрируемом слое почвы (0–10 см). При уменьшении доступа кислорода к клубенькам снижаются содержание в них леггемоглобина и фиксация азота воздуха.

Красный пигмент леггемоглобин по структуре и функциям – аналог гемоглобина крови. Он обеспечивает перенос кислорода воздуха от периферии клубенька к его энергетическим центрам – митохондриям, где происходит окисление углеводов и высвобождение энергии для фиксации атмосферного азота. Этот же гемопротеид защищает нитрогеназу (ферментный комплекс, отвечающий за восстановление молекулярного азота) от инактивирующего воздействия избытка кислорода [34].

Температурный (как водный и воздушный) режим среды обитания растений относится к числу наиболее важных звеньев в симбиотических отношениях макро- и микросимбионтов. Все физико-химические процессы, поддерживающие жизнедеятельность и обеспечивающие функциональную активность клеток, зависят в большей или меньшей степени от температуры [39].

Требования симбиотических систем к напряженности температуры закреплены в геноме обоих симбионтов и определены экологическими условиями региона, в которых формировался вид. Мнение большинства исследователей сводится к тому, что нормальный, хотя и замедленный рост клубеньковых растений начинается при 4–6 °С, оптимум находится в пределах 20–28 °С, а при 0 и 37 °С их деятельность резко замедляется или совсем прекращается. Таким образом, клубеньковые бактерии и большинство бобовых растений характеризуются весьма близкой реакцией на термодинамическое воздействие, сохраняют жизнеспособность в достаточно широком интервале температур, но наибольшую активность проявляют при 20–24 °С. У видов короткого фотопериодизма оптимальная температура для максимальной симбиотической азотфиксации находится в диапазоне 20–30 °С; у видов длинного фотопериодизма (люцерна, клевер) средних широт этот диапазон снижается до 15–20 °С [39].

У ассоциативных азотфиксаторов при оптимизации условий увлажнения процесс азотфиксации протекает в достаточно широком диапазоне температур, который составляет для подзо-

листных почв 5–25 °С, а для почв лесостепной и степной зон – 15–45 °С. Например, для бактерий рода *Azospirillum* оптимальной является температура 25 °С. При этом выявлено неодинаковое значение температуры как регулятора активности почвенных diaзотрофов в различных почвах: с повышением температуры до 25–30 °С отмечается слабое повышение азотфиксирующей активности в подзолистых почвах и резкое нарастание процесса азотфиксации в почвах с развитым процессом гумусообразования [2], причем наиболее холодостойкими считаются псевдомонады, поскольку температура 14–20 °С для них оптимальна [27].

Грибы АМ хорошо развиваются в широком интервале кислотности, аэрации, влажности и температуры. Способность грибов многократно увеличивать абсорбционную способность корней обуславливает незаменимость микоризных симбиозов в засушливых условиях [40].

Мощным фактором воздействия на растения являются элементы минерального питания, вносимые в почву в виде соответствующих удобрений или внекорневым путем. Они не только входят в состав разнообразных соединений растения, но и принимают активное участие в ферментативных, энергетических процессах, оказывают значительное влияние на физико-химические свойства плазмы клеток, ее структуру, вязкость, проницаемость, обводненность, состояние воды в плазме [41].

Достаточная обеспеченность фосфором – обязательное условие активного симбиоза, так как фиксация атмосферного азота происходит при участии АТФ, главной составной частью которой является фосфор. Калий же способствует передвижению пластических веществ в растении, лучшему обеспечению симбиотической системы фотоассимилятами. Следовательно, при его недостатке снижается активность симбиотической азотфиксации [34].

В отличие от азотфиксирующих растений, АМ-грибы и ризобактерии (*Pseudomonas*) обладают способностью усиливать поступление фосфорных соединений в растения. Однако микоризованные растения наиболее активно растут при низкой обеспеченности «подвижными» источниками минерального питания, тогда как стерильные – при высокой обеспеченности [42].

Особое место в симбиотических отношениях сельскохозяйственных культур занимают минеральные соединения азота. В научной литературе встречаются различные мнения по данному вопросу. Одни ученые считают, что азотфиксирующая способность может удовлетворять потребность растений в этом элементе, а азотные удобрения отрицательно действуют на азотфиксацию [31]. Другие же исследователи придерживаются противоположного мнения [43].

В результате многолетних опытов, проведенных с различными бобовыми культурами в различных почвенно-климатических условиях, Г. С. Посыпанов пришел к выводу, что азотные удобрения угнетают симбиоз всех бобовых культур, задерживают образование клубеньков, сокращают продолжительность активного симбиоза, снижают активный симбиотический потенциал по мере возрастания нормы азота [44].

Для активного симбиоза необходима достаточная обеспеченность не только макро-, но и микроэлементами, в первую очередь бором и молибденом. При недостатке бора в почве в клубеньках не образуются сосудистые пучки и вследствие этого нарушается нормальное развитие бактериальной ткани. Недостаток молибдена также отрицательно сказывается на образовании клубеньков, в которых подавляется синтез леггемоглобина и нарушается синтез аминокислот. Я. В. Пейве показал, что молибден и бор повышают активность ферментативных систем, непосредственно катализирующих активацию и связывание молекулярного азота. Молибден входит в состав нитрогеназы. Как правило, кислые почвы сильнее нуждаются в применении молибденовых удобрений, а известкованные – в борных [45]. Кроме бора и молибдена для симбиотической азотфиксации также необходимы магний, железо, сера. При недостатке магния останавливается размножение клубеньковых растений, снижается их жизнедеятельность, а железо и сера играют важную роль в синтезе леггемоглобина [37].

Эффективность растительно-микробных симбиозов напрямую зависит от взаимодействия различных групп микроорганизмов между собой. Вероятно, поэтому более стабильное положительное действие на растение оказывают смешанные культуры, обладающие широким диапазоном физиологических и экологических свойств. Внесение смешанной культуры *Enterobacter sp.* и *Azospirillum brasilense* приводило к большей активности азотфиксации в ризосфере, чем использование любой из этих чистых культур [46].

Широко известно, что инокуляция бобовых растений ризобиями вместе с бактериями PGPR усиливает эффект действия симбионтов. Так, совместное внесение бактерий *Bacillus polymyxa* и ризобий, а также *Azospirillum* и *Rhizobium* увеличивалов 2–3 раза число клубеньков у растений, ускоряло их образование, способствовало повышению азотфиксации и улучшало минеральное питание. Иногда ризобии не оказывают положительного действия до тех пор, пока не будут внесены ризосферные бактерии [47].

Отмечался преобладающий синергический эффект совместной инокуляции азоспириллами и микоризными грибами, что приводило к значительному увеличению урожая и содержания фосфора в надземной массе. Такая совместная инокуляция может заменить применение азотных и фосфорных удобрений [48].

Несмотря на очевидную перспективность применения смешанных культур ростстимулирующих бактерий в растениеводстве, данные объекты еще недостаточно изучены, что обусловлено сложностью их получения и поддержания. Однако общность молекулярных механизмов, определяющих взаимодействия растений с внутриклеточными и ассоциативными симбионтами, позволяет надеяться на более детальное изучение бактериальных ассоциаций и расширение области их применения в ближайшие годы [28].

Эндогенная регуляция растительно-микробных взаимодействий. Микроорганизмы в ризосфере и ризоплане существуют за счет отмерших клеток эпидермиса и корневых волосков, корневых выделений растений, богатых сахарами и органическими кислотами. При этом некоторые органические вещества оказывают хемотоксическое действие на почвенные бактерии [6].

Для *Rhizobiaceae* аттрактантами служат дикарбоновые кислоты, глутамат и аспарат, которые растения выделяют в ризосферу. При бобово-ризобииальном симбиозе растение поставляет в клубеньки продукты фотосинтеза, образующиеся в листьях и необходимые для развития симбиотических структур, снабжения нитрогеназы энергией и ассимиляции фиксированного азота. Установлено, что для симбиотической фиксации 1 г N_2 необходимо 5–10 г углевода (15–20 г глюкозы). Он расходуется в качестве источника энергии и восстановителя для фиксации N_2 , углеродных скелетов, ассимиляции фиксированного N_2 в аминокислоты, а также оказывает влияние на процессы роста и поддержания в активном состоянии клубеньков и бактериоидов [49].

Активность ростстимулирующих ризобактерий также находится под непосредственным контролем хозяина, в экссудатах которого содержатся питательные вещества, инициирующие размножение PGPR и проявление ими биоконтрольных свойств. Наиболее интенсивный рост ризобактерий и экспрессия генов, участвующих в биоконтроле, наблюдаются в том случае, когда в экссудатах много органических кислот (в первую очередь цитрата, сукцината и малата), тогда как высокое содержание моно- и дисахаридов (глюкозы, сахарозы, ксиланозы) не способствует проявлению полезных свойств PGPR. Растения способны адекватно реагировать на появление в ризосфере биоконтрольных штаммов псевдомонад, повышая экссудацию именно тех фракций органических кислот, которые обеспечивают наилучший рост и антифунгальную активность PGPR [50].

Важной особенностью, определяющей способность симбиотического аппарата бобовых культур к азотфиксации, является генетическая совместимость клубеньковых растений с растением-хозяином, поскольку генетические отклонения в растениях или бактериях могут привести к полной или частичной потере способности образовывать клубеньки [51].

Анализ различных бобово-ризобииальных систем показал, что вклад генотипов партнеров в варьирование показателей симбиотической активности зависит от вида растений, изучаемого признака, а также условий опыта. Так, нитрогеназная активность клубеньков приблизительно в равной степени контролируется генотипами партнеров, тогда как эффективность симбиоза зависит прежде всего от генотипа растений [1].

Исследования американских ученых, проведенные во Флориде, показали, что из 40 проверенных генотипов растений только 2 были отзывчивы на инокуляцию азоспириллами. Эти растения, принадлежащие к видам *Panicum maximum* и *Digitaria decumbens*, давали соответственно прибавки урожая на 150 и 163 % по сравнению с контролем. Остальные 38 генотипов, которые включали *D. decumbens*, *P. maximum*, *Cynodon sp.*, *Cenchrus sp.*, не были отзывчивы на инокуляцию [12].

Известно, что образование симбиозов требует значительных затрат энергии (до 20–30 % продуктов фотосинтеза в случае бобово-ризобияльного симбиоза или АМ). Однако эти затраты являются восполняемыми, так как при взаимодействии с симбиотическими микроорганизмами обычно наблюдается стимуляция фотосинтетической активности растений, которая часто снижается при внесении эквивалентных доз минеральных удобрений [1].

Таким образом, сопряжение метаболических систем растений и микроорганизмов при формировании симбиоза образует сложную систему донорно-акцепторных связей, которые управляют ростом и развитием растительно-микробной системы. Исследование этих связей может открыть возможности увеличения КПД фотосинтеза на уровне ценоза.

Заключение. В результате изучения растительно-микробных взаимодействий сельское хозяйство получило возможность применения препаратов биологического действия, которые позволяют не только повышать урожайность сельскохозяйственных культур, но и получать высококачественную и экологически безопасную продукцию.

Многолетнее изучение эффективности инокулянтов бобовых культур и новых земледобрильных биопрепаратов на основе ассоциативных азотфиксирующих бактерий показало, что они обладают комплексным положительным действием на растения и способны существенно увеличивать их продуктивность. При этом прибавка урожая зерновых в среднем составляет 15–20 %, а овощных культур – 20–30 %. Кроме того, применение биопрепаратов оказывает положительное влияние на качество продукции, повышая, в зависимости от культуры, накопление протеина, крахмала, сахаров и витаминов.

Микробные земледобрильные препараты представлены не только азотфиксирующими микроорганизмами. Перспективным представляется применение микоризных грибов, которые улучшают водообеспечение и минеральное питание растений, продуцируют биологически активные вещества (фитогормоны, витамины, антибиотики), противостоят патогенным микроорганизмам и в целом значительно улучшают рост и приживаемость растений. Однако грибы – микоризообразователи трудно культивировать искусственно, поэтому для микоризации часто применяют лесную почву, содержащую споры и мицелий таких грибов.

При использовании препаратов на основе *Bacillus* улучшаются условия роста и развития растений и на 10–45 % повышается их урожайность, что эквивалентно внесению азотных удобрений в дозе 30–45 кг действующего вещества в расчете на 1 га. При этом обеспечивается дополнительное вовлечение в агроценозы биологического азота, фосфора и калия за счет почвенных запасов, а также увеличивается устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды.

В последние годы в Беларуси предпринимались попытки внедрения микробиологических препаратов в сельское хозяйство, но широкого использования они не нашли. К сожалению, в нашей стране до сих пор не уделяется должное внимание использованию микробиологических земледобрильных препаратов, которые, будучи экологически безопасными для окружающей среды, позволят обеспечить повышение урожайности культур, их оздоровление и получение продукции улучшенного качества, а главное будут способствовать энергосбережению при производстве продукции растениеводства.

Использование бобово-ризобияльного и эндомикоризного симбиозов, а также ассоциативных азотфиксаторов и их сочетаний является весьма перспективным направлением в растениеводстве. Это обеспечивает не только повышение продуктивности агроценоза, но и устраняет негативные последствия химизации, увеличивает устойчивость сельскохозяйственных культур к абиотическим и биотическим стрессам, активизирует их адаптивный потенциал и способствует ресурсосбережению.

Список использованных источников

1. Проворов, Н. А. Эколого-генетические принципы селекции растений на повышение эффективности взаимодействия с микроорганизмами / Н. А. Проворов, И. А. Тихонович // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – Т. 38, № 3. – С. 11–25.
2. Чеботарь, В. К. Эффективность применения биопрепарата Экстрасол / В. К. Чеботарь, А. А., Завалин, Е. Н. Кипрушкина. – М. : ВНИИ агрохимии, 2007. – 216 с.
3. Тихонович, И. А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий / И. А. Тихонович, Н. А. Проворов // Экол. генетика. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 36–46.

4. Advances in agronomy and ecology of the Azospirillum plant association / Y. Okon [et al.] // Nitrogen fixation: fundamentals and applications : proc. of the 10th Int. congress on nitrogen fixation / eds. I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. E. Romanov, W. E. Newton. – St. Petersburg, 1995. – P. 635–640.
5. Умаров, М. М. Азотфиксация в ассоциациях микроорганизмов с растениями / М. М. Умаров, Н. Г. Куракова, Б. Ф. Садыков // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР / редкол. : Е. Н. Мишустин (отв. ред.) [и др.]. – М., 1985. – С. 205–213.
6. Тихонович, И. А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего / И. А. Тихонович, Н. А. Проворов. – СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2009. – 210 с.
7. Физиолого-экологические основы оптимизации продукционного процесса агрофитоценозов (поликультура в растениеводстве) / В. Н. Прохоров [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2005. – 368 с.
8. Парахин, Н. В. Сельскохозяйственные аспекты симбиотической азотфиксации / Н. В. Парахин, С. Н. Петрова. – М. : Колос, 2006. – 158 с.
9. Завалин, А. А. Эффективность использования минеральных удобрений и биопрепаратов в зерноотравах севооборотах / А. А. Завалин, Н. С. Алметов, Л. С. Чернова // Агрохимия. – 2014. – № 9. – С. 35–47.
10. Мишустин, Е. Н. Роль биологического азота в азотном балансе земледелия СССР и в повышении плодородия почв / Е. Н. Мишустин, Н. И. Черепков // Изв. АН СССР. Сер. биол. наук. – 1987. – № 5. – С. 649–660.
11. Персикова, Т. Ф. Роль бобовых предшественников в азотном питании культур севооборота / Т. Ф. Персикова // Бюл. ВНИИ агрохимии им. Д. Н. Прянишникова. – 2001. – № 115. – С. 57–58.
12. Smith, S. E. Mycorrhizal Symbiosis / S. E. Smith, D. J. Read. – 2nd ed. – San Diego ; London ; New York ; Boston ; Sidney ; Tokyo ; Toronto : Academic Press, 1997. – 590 p.
13. Лактионов, Ю. В. Роль клубеньков бактерий в возделывании бобовых культур / Ю. В. Лактионов, А. П. Кожемяков, В. В. Елисеев // Агроинформ. – 2014. – № 2. – С. 34–36.
14. Biologia ed applicazioni agronomiche dell'associazione graminacee-Azospirillum / M. Del Gallo [et al.] // Impieghi degli azotofissatori in agricoltura. Limitazioni e prospettive. CNR-IPRA. – Rome, 1985. – N 7. – P. 31–52.
15. Целесообразность совмещения полифункциональных препаратов-регуляторов роста растений с современными системными фунгицидами / Т. А. Рябчинская [и др.] // Агрохимия. – 2014. – № 2. – С. 26–32.
16. Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems / ed. : S. Gianinazzi, H. Schüepp. – Basel : Birkhäuser Verlag, 2002. – 227 p.
17. Schüssler, A. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution / A. Schüssler, D. Schwarzott, C. Walker // Mycol. Res. – 2001. – Vol. 105, N 12. – P. 1412–1421. <https://doi.org/10.1017/s0953756201005196>
18. Read, D. J. An ecological point of view on arbuscular mycorrhiza research / D. J. Read // Mycorrhizal technology in agriculture. From genes to bioproducts / eds. S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea, K. Haselwandter. – Basel, 2002. – P. 129–137.
19. Helal, H. M. Zur Bedeutung der Mykorrhiza in einer umweltschonenden Landwirtschaft / H. M. Helal // Anwendung arbuskulärer Mykorrhizapilze im Pflanzenbau : Arbeitstagung am 13. und 14. Januar 1997 in Braunschweig. – Berlin, 1997. – S. 47–53.
20. Balt, H. Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential of winter barley / H. Baltruschat, H. W. Dehne // Plant and Soil. – 1989. – Vol. 113, N 2. – P. 251–256. <https://doi.org/10.1007/bf02280188>
21. Páradí, I. Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus supply on polyamine content, growth and photosynthesis of *Plantago lanceolata* / I. Páradí, Z. Bratek, F. Láng // Biol. Plantarum. – 2003. – Vol. 46, N 4. – P. 563–569. <https://doi.org/10.1023/a:1024819729317>
22. Gianinazzi-Pearson, V. Have common plant system co-evolved in fungal and bacterial root symbiosis? / V. Gianinazzi-Pearson // Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture / eds. A. Legocki, G. Boethe, A. Pueler. – Berlin ; Heidelberg, 1997. – P. 321–324.
23. Okon, Y. Agronomic applications of Azospirillum/Improving plant productivity with rhizosphere bacteria / Y. Okon, C. A. Labandera-Gonzales // Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization / ed. by M. H. Ryder, P. M. Stephens, G. D. Bowen. – Adelaide, Australia, 1994. – P. 1274–1278.
24. Структурно-функциональная организация генов *Pseudomonas fluorescens*, кодирующих ферменты биосинтеза фенозин-1-карбоновой кислоты / Д. В. Мавроди [и др.] // Молекуляр. биология. – 1997. – Т. 31, № 1. – С. 74–80.
25. Попова, Е. В. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahlia* on tomato and cucumber by *Serratia marcescens* / Е. В. Попова, Л. К. Khatskevich // Biology of Plant-Microbe Interactions. Vol. 4: Molecular Plant-Microbe Interactions: New Bridges between Past and Future (Proc. of the 11th Int. congress on molecular plant-microbe interactions) / ed. : I. Tikhonovich, B. Lugtenberg, N. Provorov. – St. Paul, Minn., USA, 2004. – P. 315–318.
26. Genom-based discovery, structure, prediction and functional analyses of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species / I. de Bruijn [et al.] // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 63, N 2. – P. 417–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05525.x>
27. Боронин, А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А. М. Боронин // Сорос. образов. журн. – 1998. – № 10. – С. 26–31.
28. *Medicago truncatula* gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota / Massoumou M. [et al.] // Mycorrhiza. – 2007. – Vol. 17, N 3. – P. 223–234. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0099-9>
29. Многокомпонентный симбиоз бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: генетическое и эволюционное обоснование использования в адаптивном растениеводстве / О. Ю. Штарк [и др.] // Экол. генетика. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 80–94.

30. *Rhizobacteria* that produce auxins and contain 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*) / A. Belimov [et al.] // *Ann. Appl. Biol.* – 2015. – Vol. 167, N 1. – P. 11–25. <https://doi.org/10.1111/aab.12203>

31. Посыпанов, Г. С. Биологический азот. Проблемы экологии и растительного белка / Г. С. Посыпанов. – М. : Изд-во Моск. с.-х. акад., 1993. – 272 с.

32. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев [и др.]. – М. : Агропромиздат, 1990. – 384 с.

33. Reynders, I. Use of *Azospirillum brasilense* as bio-fertilizer in intensive wheat cropping / I. Reynders, K. Vlassak // *Plant and Soil.* – 1982. – Vol. 66. – P. 217–223.

34. Шильникова, В. К. Анатомия и закономерности развития клубеньковых бактерий в симбиозе с растениями и в условиях искусственной питательной среды : автореф. дис ... д-ра биол. наук / В. К. Шильникова. – М., 1970. – 28 с.

35. Establishment of inoculated *Azospirillum spp.* in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum / V. L. D. Baldani [et al.] // *Plant and Soil.* – 1986. – Vol. 90, N 1–3. – P. 35–46.

36. Sau, F. Response to water stress and nitrogen-fixing faba bean / F. Sau, M. J. Minguez // *J. Exp. Bot.* – 1990. – Vol. 41, N 9. – P. 1207–1211. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.9.1207>

37. Schnotz G. Stickstoff-Fixierungsvermögen mehrjähriger Leguminosen des Dauergrünlandes / G. Schnotz. – Stuttgart : Grauer, 1995. – 128 p.

38. Орлов, В. П. Влияние влажности почвы на формирование клубеньков и урожай фасоли в условиях вегетационного опыта / В. П. Орлов, Л. Д. Князева // *Бюл. науч.-техн. информации Всесоюз. НИИ зернобобовых и крупяных культур.* – 1980. – № 26. – С. 62–65.

39. Воробьев, В. А. Симбиотическая азотфиксация и температура / В. А. Воробьев. – Новосибирск : Наука. Сиб. предприятие РАН, 1998. – 128 с.

40. Handbook of microbial biofertilizer / ed. M. K. Rai. – New York : Haworth Press Inc., 2006. – 579 p.

41. Martin, P. Einfluß von Mineralstoffen auf das symbiotische N₂ – Bindungssystem bei Leguminosen / P. Martin // *Kalibriefe (Büntehof).* – 1990. – Bd. 20, N 1. – S. 93–110.

42. Aikio, S. The modeled growth of mycotritrial plants under constant versus soil nutrient concentrations / S. Aikio, A. L. Ruotsalainen // *Mycorrhiza.* – 2002. – Vol. 12, N 5. – P. 257–261. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0178-5>

43. Yahalom, E. *Azospirillum* effect on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes / E. Yahalom, Y. Ocon, A. Dovrat // *Can. J. Microbiol.* – 1987. – Vol. 33, N 6. – P. 510–514. <https://doi.org/10.1139/m87-085>

44. Посыпанов, Г. С. Методические аспекты изучения симбиотического аппарата бобовых культур в полевых условиях / Г. С. Посыпанов // *Изв. Тимирязев. с.-х. акад.* – 1983. – № 5. – С. 17–26.

45. Пейве, Я. В. Роль микроэлементов в симбиотической азотфиксации / Я. В. Пейве // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* – 1970. – № 2. – С. 238–245.

46. Lazarovits, G. *Rhizobacteria* for improvement of plant growth and establishment / G. Lazarovits, J. Nowak // *HortScience.* – 1997. – Vol. 32, N 2. – P. 188–192. <https://doi.org/10.21273/hortsci.32.2.188>

47. Бонарцева, Г. А. Влияние разных концентраций кислорода, сахарозы и нитрата на синтез поли-бета-оксипутирата *Rhizobium phaseoli* / Г. А. Бонарцева, В. Л. Мышкина, Е. Д. Загреба // *Микробиология.* – 1995. – Т. 64, № 1. – С. 40–43.

48. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces sp.*, *Glomus intraradices* and manure application / M. R. Ardakani [et al.] // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2011. – Vol. 17, N 2. – P. 181–192. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0065-7>

49. Phillips, D. A. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes / D. A. Phillips // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1980. – Vol. 31, N 1. – P. 29–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.000333>

50. Effect of tomato pathogen *Fusarium oxysporum f. sp. radices-lycopersici* and biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS635 on the compositions of organic acids and sugars in tomato root exudates / F. Kamilova [et al.] // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2006. – Vol. 19, N 10. – P. 1121–1126. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-1121>

51. Тихонович, И. А. Использование генетических факторов макросимбионта для повышения эффективности биологической азотфиксации / И. А. Тихонович // *Биологический азот в сельском хозяйстве СССР : сб. ст. / отв. ред. Е. Н. Мишустин.* – М., 1989. – С. 166–181.

References

1. Provorov N. A., Tikhonovich I. A. Ecological and genetic principles of plant breeding to increase the efficiency of interaction with microorganisms. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2003, vol. 25, no. 3, pp. 11–25 (in Russian).

2. Chebotar' V. K., Zavalin A. A., Kiprushkina E. N. *The effectiveness of the use of the biopreparation Extrasol.* Moscow, All-Russian Research Institute of Agrochemistry, 2007. 216 p. (in Russian).

3. Tikhonovich I. A., Provorov N. A. Symbiotic genetics of plant-microbe interaction. *Ekologicheskaya genetika* [Ecological genetics], 2004, vol. 1, no. 1, pp. 36–46 (in Russian).

4. Okon Y., Itzigsohn R., Burdman S., Hampel M. Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum* plant association. *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications: Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation, St. Petersburg, Russia, May 28–June 3, 1995.* St. Petersburg, 1995, pp. 635–640.

5. Umarov M. M., Kurakova N. G., Sadykov B. F. Nitrogen fixation in associations of microorganisms with plants. *Mineral and biological nitrogen in agriculture of the USSR.* Moscow, 1985, pp. 205–213 (in Russian).

6. Tikhonovich I. A., Provorov N. A. *Symbioses of plants and microorganisms: molecular genetics of the agricultural systems of the future.* St. Petersburg, Publishing House of St. Petersburg University, 2009. 210 p. (in Russian).

7. Prorokhov V. N., Laman N. A., Shashko K. G., Kravchenko V. M. *Physiological and ecological bases of optimization of the production process of agrophytocenoses (polyculture in crop production)*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2005. 368 p. (in Russian).
8. Parakhin N. V., Petrova S. N. *Agricultural aspects of symbiotic nitrogen fixation*. Moscow, Kolos Publ., 2006. 158 p. (in Russian).
9. Zavalin A. A., Almetov N. S., Chernova L. S. Efficiency of the use of mineral fertilizers and biological products in grain-grass crop rotations. *Agrokhimiya* [Agrochemistry], 2014, no. 9, pp. 35–47 (in Russian).
10. Mishustin E. N., Cherepkov N. I. The role of biological nitrogen balance of agriculture of the USSR and in the improvement of soil fertility. *Izvestiya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskikh nauk* [Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR. Biological series], 1987, no. 5, pp. 649–660 (in Russian).
11. Persikova T. F. The role of legumes predecessors in the nitrogen nutrition of crop rotation. *Byulleten' Vserossiiskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta agrokhimii imeni D. N. Pryanishnikova* [Bulletin of the All-Russian Research Institute of Agrochemistry named after D. N. Pryanishnikov], 2001, no. 115, pp. 57–58 (in Russian).
12. Smith S. E., Read D. J. *Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed.* San Diego, London, New York, Boston, Sidney, Tokyo, Toronto, Academic Press, 1997. 590 p.
13. Laktionov Yu. V., Kozhemyakov A. P., Eliseev V. V. The role of nodule bacteria in the cultivation of leguminous crops. *Agroinform* [Agroinform], 2014, no. 2, pp. 34–36 (in Russian).
14. Del Gallo M., Morpurgo G., Galli E., Zanetti G. Biologia ed applicazioni agronomiche dell'associazione graminacee-Azospirillum. *Impieghi degli azotofissatori in agricoltura. Limitazioni e prospettive. CNR-IPRA*. Rome, 1985, no. 7, pp. 31–52.
15. Ryabchinskaya T. A., Kharchenko G. L., Bobreshova I. Yu., Sarantseva N. A. Expediency of combining multifunctional drugs-plant growth regulators with modern systemic fungicides. *Agrokhimiya* [Agrochemistry], 2014, no. 2, pp. 26–32 (in Russian).
16. Gianinazzi S., Schüepp H. (eds.). *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Basel, Birkhäuser Verlag, 2002. 227 p.
17. Schüssler A., Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 2001, vol. 105, no. 12, pp. 1412–1421. <https://doi.org/10.1017/s0953756201005196>
18. Read D. J. An ecological point of view on arbuscular mycorrhiza research. *Mycorrhizal Technology in Agriculture. From Genes to Bioproducts*. Basel, 2002, pp. 129–137.
19. Helal H. M. Zur Bedeutung der Mykorrhiza in einer umweltschonenden Landwirtschaft. *Anwendung arbuskulärer Mykorrhizapilze im Pflanzenbau: Arbeitstagung am 13. und 14. Januar 1997 in Braunschweig*. Berlin, 1997, S. 47–53.
20. Balt H., Dehne H. W. Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential of winter barley. *Plant and Soil*, 1989, vol. 113, no. 2, pp. 251–256. <https://doi.org/10.1007/bf02280188>
21. Páradí I., Bratek Z., Láng F. Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus supply on polyamine content, growth and photosynthesis of *Plantago lanceolata*. *Biologia Plantarum*, 2003, vol. 46, no. 4, pp. 563–569. <https://doi.org/10.1023/a:1024819729317>
22. Gianinazzi-Pearson V. Have common plant system co-evolved in fungal and bacterial root symbiosis? *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. Berlin, Heidelberg, Springer Publ., 1997, pp. 321–324.
23. Okon Y., Labandera-Gonzales C. A. Agronomic applications of Azospirillum/Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*. Adelaide, Australia, 1994, pp. 1274–1278.
24. Mavrodi D. V., Ksenzenko V. I., Chatuev B. M., Tomashov L. S., Boronin A. M. Structural-functional organization of genes of *Pseudomonas fluorescens* that encode the enzymes of the biosynthesis of fenoxan-1-carboxylic acid. *Molecular Biology*, 1997, vol. 31, no. 1, pp. 74–80 (in Russian).
25. Popova E. V., Khatskevich L. K. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahlia* on tomato and cucumber by *Biology of plant-microbe interactions. Volume 4: molecular plant-microbe interactions: new bridges between past and future (International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (11th, 2003, Saint Petersburg, Russia))*. St. Paul, Minn., USA, 2004, pp. 315–318.
26. De Bruijn I., de Kock M. J. D., Yang M., de Waard P., van Beek T. A., Raaijmakers J. M. Genom-based discovery, structure, prediction and functional analyses of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology*, 2007, vol. 63, no. 2, pp. 417–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05525.x>
27. Boronin A. M. Rhizospheric bacteria of the genus *Pseudomonas*, promoting the growth and development of plants. *Sorosovskii obrazovatel'nyi zhurnal* [Soros educational journal], 1998, no. 10, pp. 26–31 (in Russian).
28. Massoumou M., van Tuinen D., Chatagnier O., Arnould C., Brechenmacher L., Sanchez L., Selim S., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. Medicago truncatula gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota. *Mycorrhiza*, 2007, vol. 17, no. 3, pp. 223–234. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0099-9>
29. Shtark O. Yu., Borisov A. Yu., Zhukov V. A., Nemankin T. A., Tikhonovich I. A. Multi-legume symbiosis with beneficial soil micro-organisms: genetic and evolutionary justification for the use in adaptive crop. *Ekologicheskaya genetika* [Ecological genetics], 2011, vol. 9, no. 2, pp. 80–94 (in Russian).
30. Belimov A., Dodd I., Safronova V., Shaposhnikov A., Azarova T., Marova N., Davies W., Tikhonovich I. *Rhizobacteria* that produce auxins and contain 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*, 2015, vol. 167, no. 1, pp. 11–25. <https://doi.org/10.1111/aab.12203>
31. Posypanov G. S. Biological nitrogen. *Problems of ecology and plant protein*. Moscow, Publishing house Moscow Agricultural Academy, 1993. 272 p. (in Russian).

32. Muromtsev G. S., Butenko R. G., Tikhonenko T. I., Prokofiev M. I. *Fundamentals of agricultural biotechnology*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1990. 384 p. (in Russian).
33. Reynders I., Vlassak K. Use of *Azospirillum brasilense* as bio-fertilizer in intensive wheat cropping. *Plant and Soil*, 1982, vol. 66, pp. 217–223.
34. Shil'nikova V. K. *Anatomy and patterns of development of nodule bacteria in symbiosis with plants and in conditions of artificial nutrient medium*. Abstract of Ph. D. diss. Moscow, 1970. 28 p. (in Russian).
35. Baldani V. L. D., Alvarez M. A. de B., Baldani J. J., Döbereiner J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, 1986, vol. 90, no. 1–3, pp. 35–46.
36. Sau F., Minguez M. J. Response to water stress and nitrogen-fixing faba bean. *Journal of Experimental Botany*, 1990, vol. 41, no. 9, pp. 1207–1211. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.9.1207>
37. Schnotz G. *Stickstoff-Fixierungsvermögen mehrjähriger Leguminosen des Dauergrünlandes*. Stuttgart, Grauer, 1995. 128 p.
38. Orlov V. P., Knyazeva L. D. Influence of soil moisture on the formation of nodules and harvest beans in the conditions of a pot experiment. *Byulleten' nauchno-tekhnicheskoi informatsii Vsesoyuznogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zernobobovykh i krupnykh kul'tur* [Bulletin of scientific and technical information of the All-Union Scientific Research Institute of Legumes and Groats], 1980, no. 26, pp. 62–65 (in Russian).
39. Vorob'ev V. A. *Symbiotic nitrogen fixation and temperature*. Novosibirsk, Nauka Publ., 1998. 128 p. (in Russian).
40. Rai M. K. (ed.). *Handbook of microbial biofertilizer*. New York, Haworth Press Inc., 2006. 579 p.
41. Martin P. Einfluß von Mineralstoffen auf das symbiotische N₂ – Bindungssystem bei Leguminosen. *Kali-Briefe (Büntehof)*, 1990, Bd. 20, no. 1, S. 93–110.
42. Aikio S., Ruotsalainen A. L. The modeled growth of mycotrizal plants under constant versus soil nutrient concentrations. *Mycorrhiza*, 2002, vol. 12, no. 5, pp. 257–261. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0178-5>
43. Yahalom E., Ocon Y., Dovrat A. *Azospirillum* effect on susceptibility to Rhizobim on nodulation and nitrogen fixation of several forage legumes. *Canadian Journal of Microbiology*, 1987, vol. 33, no. 6, pp. 510–514. <https://doi.org/10.1139/m87-085>
44. Posypanov G. S. Methodological aspects of studying the symbiotic apparatus of legumes in the field. *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* [Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy], 1983, no. 5, pp. 17–26 (in Russian).
45. Peive Ya. V. The role of trace elements in symbiotic nitrogen fixation. *Izvestiya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskaya* [Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR. Biological series], 1970, no. 2, pp. 238–245 (in Russian).
46. Lazarovits G., Nowak J. *Rhizobacteria* for improvement of plant growth and establishment. *HortScience*, 1997, vol. 32, no. 2, pp. 188–192. <https://doi.org/10.21273/hortsci.32.2.188>
47. Bonartseva G. A., Myshkina V. L., Zagreba E. D. The influence of different concentrations of oxygen, sucrose and nitrate on the synthesis of *Rhizobium phaseoli* poly-beta-oxybutyrate. *Microbiologiya* [Microbiology], 1995, vol. 64, no. 1, pp. 40–43 (in Russian).
48. Ardakani M. R., Mazaheri D., Mafakheri S., Moghaddam A. Efficiency absorption of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2011, vol. 17, no. 2, pp. 181–192. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0065-7>
49. Phillips D. A. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annual Review of Plant Physiology*, 1980, vol. 31, no. 1, pp. 29–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.000333>
50. Kamilova F., Kravchenko L. V., Shaposhnikov A. I., Makarova N., Lugtenberg B. Effect of tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. radices-lycopersici and biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS635 on the compositions of organic acids and sugars in tomato root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, vol. 19, no. 10, pp. 1121–1126. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-1121>
51. Tikhonovich I. A. The use of macrosymbiont genetic factors to increase the efficiency of biological nitrogen fixation. *Biologicheskii azot v sel'skom khozyaistve SSSR: sbornik statei* [Biological nitrogen in agriculture of the USSR: collection of articles]. Moscow, 1989, pp. 166–181 (in Russian).

Информация об авторе

Куликов Ярослав Константинович – д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulikova22@mail.ru

Information about the author

Yaroslav K. Kulikov – D. Sc. (Biol.), Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulikova22@mail.ru