

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІі НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2023. Т. 68, № 1

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2023. Т. 68, № 1

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

Олег Юрьевич Баранов – 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. Вологовский** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- А. Е. Гончаров** – 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
В. И. Торчик – 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. 2023. Т. 68, № 1.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Н. И. Кашуба*

Подписано в печать 17.01.2023. Выход в свет 27.01.2023. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 74 экз. Заказ 11.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,66 руб., ведомственная подписка – 29,74 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, 220084, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2023

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2023, vol. 68, no. 1

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

Oleg Yu. Baranov – Department of Medical 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

Andrei Y. Hancharou – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences
of Belarus, 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
Vladimir I. Torchuk – 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
Vasily E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus
Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Wanda Olech-Piasecka – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Republic of Poland
Oleg N. Pugachev – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation
Alexander I. Rapoport – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvian Republic
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, 2023, vol. 68, no. 1.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *N. I. Kashuba*

Sent for press 17.01.2023. Output 27.01.2023. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 74 copies. Order 11.
Number price: individual subscription – 12.66 byn., departmental subscription – 29.74 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, 220084, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2023

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

ЗМЕСТ

Усеня В. В., Шатравко В. Г., Блинова Н. С., Помаз Г. М. Атрактыўнасць феромонных прэпаратаў для мониторинга колькасці ствалоўных шкоднікаў у сосновых насаджэннях Беларусі	7
Еловская Н. А., Калацкая Ж. Н., Ламан Н. А., Гилевская К. С., Красковский А. Н., Куликовская В. И. Влияние стабилизированных хитозаном наночастиц серебра на физиолого-биохимическое состояние растений картофеля (<i>Solanum tuberosum</i> L.) в культуре <i>in vitro</i>	15
Викс Т. Н., Доманская И. Н., Мартысюк А. В., Кабашникова Л. Ф. Характеристика фонда фотосинтетических пигментов в проростках разных сортов ярового ячменя при поражении грибом <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem.	27
Абай Ж. С., Садикалиева С. О., Шораева К. А., Еспембетов Б. А., Нурпейсова А. С. Оценка генетической стабильности рекомбинантных векторов гриппа, кодирующих белки <i>Mycobacterium bovis</i> , с помощью ОТ-ПЦР и оптимизация условий их культивирования.....	38
Виноградова Ю. К., Спиридович Е. В., Решетников В. Н. Особенности разработки протоколов оценки и контроля инвазивных видов для различных типов растительных сообществ	47
Шихад А., Сыса А. Г. Оценка влияния модифицированных пиримидиновых производных нуклеиновых кислот на бактериальные клетки (на англ. яз.).....	55
Машков Е. И., Гайдученко Е. С., Борисов Ю. М. Гаплотипическое разнообразие <i>mtCytb</i> обыкновенной полевки (<i>Microtus arvalis sensu lato</i>) в Беларуси.....	64

АГЛЯДЫ

Волотовский И. Д., Суховеева С. В., Кабачевская Е. М. Биофизические механизмы внутриклеточной сигнализации (трансдукции) в высших растениях.....	75
---	----

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

CONTENTS

Usenya V. V., Shatravko V. G., Blinova N. S., Pomaz G. M. Attractiveness of synthetic pheromones for stem pests monitoring in pine stands in Belarus.....	7
Yaloukaya N. A., Kalatskaja J. N., Laman N. A., Hileuskaya K. S., Kraskouski A. N., Kulikouskaya V. I. Influence of chitosan-stabilized silver nanoparticles on the physiological and biochemical state of potato plants (<i>Solanum tuberosum</i> L.) in <i>in vitro</i> culture.....	15
Viks T. N., Domanskaya I. N., Martysiuk H. V., Kabashnikova L. F. Feature of the photosynthetic pigment fund in seedlings of different varieties of spring barley when affected by the fungus <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem....	27
Abay Zh. S., Sadikalieva S. O., Shorayeva K. A., Espembetov B. A., Nurpeisova A. S. Evaluation of the genetic stability of recombinant flu vectors encoding <i>Mycobacterium bovis</i> proteins using RT-PCR and optimization of their cultivation conditions	38
Vinogradova Yu. K., Spirydovich A. V., Reshetnikov V. N. Features of development of invasive species assessment and control protocols for different groups of plant communities.....	47
Shihad A., Sysa A. G. Estimation of the activity of modified pyrimidine nucleoside derivatives on bacteria cells	55
Mashkov E. I., Gajduchenko H. S., Borisov Yu. M. Haplotypic diversity of the <i>mtCytb</i> gene of the common vole (<i>Microtus arvalis sensu lato</i>) in Belarus.....	64

REVIEWS

Volotovskii I. D., Sukhaveyeva S. V., Kabachevskaya E. M. Biophysical mechanisms of intracellular signaling (transduction) in higher plants	75
--	----

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 630.413.5
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-7-14>

Поступила в редакцию 28.04.2022
 Received 28.04.2022

В. В. Усеня¹, В. Г. Шатравко², Н. С. Блинова¹, Г. М. Помаз¹

¹Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

АТТРАКТИВНОСТЬ ФЕРОМОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЧИСЛЕННОСТИ СТВОЛОВЫХ ВРЕДИТЕЛЕЙ В СОСНОВЫХ НАСАЖДЕНИЯХ БЕЛАРУСИ

Аннотация. Приведена динамика усыхания в 2016–2021 гг. сосновых насаждений в лесном фонде Беларуси. Площадь сплошных санитарных рубок составила 112,3 тыс. га.

Изложены результаты натурных испытаний по оценке аттрактивности отечественных феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В», «ИПСВАБОЛ Ш», «МОНВАБОЛ» с использованием барьерных ловушек для мониторинга численности вершинного (*Ips acuminatus* Gyll.) и шестизубчатого (*Ips sexdentatus* Boern.) короедов и усачей рода *Monochamus* в сосновых насаждениях. Установлено, что феромонные препараты «ИПСВАБОЛ В», «ИПСВАБОЛ Ш» и «МОНВАБОЛ» обладают высокой аттрактивностью в отношении жуков вершинного, шестизубчатого короедов и усачей рода *Monochamus* при мониторинге их численности в сосновых насаждениях. Выявлено, что лет первого поколения вершинного и шестизубчатого короедов по сравнению со вторым их летом является наиболее массовым (активнее в 1,8–4,5 и 3,8–5,1 раза соответственно).

Впервые разработаны шкалы оценки численности вершинного и шестизубчатого короедов и усачей рода *Monochamus* и методы феромонного мониторинга, применение которых позволяет оперативно осуществлять контроль численности данных стволовых вредителей и их распространения в сосновых насаждениях для назначения лесозащитных мероприятий.

Ключевые слова: сосновые насаждения; массовое усыхание; очаги стволовых вредителей; вершинный и шестизубчатый короеды; усачи рода *Monochamus*; препараты феромонные «ИПСВАБОЛ В», «ИПСВАБОЛ Ш», «МОНВАБОЛ»; аттрактивность; феромонный мониторинг

Для цитирования: Аттрактивность феромонных препаратов для мониторинга численности стволовых вредителей в сосновых насаждениях Беларуси / В. В. Усеня [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 7–14. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-7-14>

Vladimir V. Usenya¹, Valentin G. Shatravko², Natalya S. Blinova¹, Galina M. Pomaz¹

¹Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

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

ATTRACTIVENESS OF SYNTHETIC PHEROMONES FOR STEM PESTS MONITORING IN PINE STANDS IN BELARUS

Abstract. Dynamics of pine stands dieback in 2016–2021 in the forest fund of Belarus is presented. The area of clear sanitary cuttings was 112.3 thousand hectares.

The results of field tests on attractiveness assessment of Belarusian synthetic pheromones “IPSVABOL V”, “IPSVABOL SH”, “MONVABOL” using barrier traps for monitoring the abundance of sharp-dentated (*Ips acuminatus* Gyll.) and six-toothed (*Ips sexdentatus* Boern.) bark beetles and longhorn beetles (*Monochamus* spp.) in pine stands are presented. During insect abundance monitoring in pine stands, it was found that the synthetic pheromone “IPSVABOL V”, “IPSVABOL SH” and “MONVABOL” are highly attractive to beetles of the sharp-dentated, six-toothed bark and longhorn beetles of the genus *Monochamus* when monitoring their abundance in pine stands. It was revealed that the first generation flying of the sharp-dentated and six-toothed bark beetles are the most widespread and higher by 1.8–4.5 and 3.8–5.1 times of the second generation flying of these stem pests, respectively.

For the first time, scales for assessing the abundance and methods for pheromone monitoring of the sharp-dentated and six-toothed bark beetles, and longhorn beetles (*Monochamus* spp.) have been developed. The use of the developed scales in forest protection practice makes it possible to quickly control the abundance of these stem pests and their distribution in pine stands for appointment of forest protection measures.

Keywords: pine stands; dieback; foci of stem pests; sharp-dentated and six-toothed bark beetles; longhorn beetles (*Monochamus* spp.); synthetic pheromones “IPSVABOL V”, “IPSVABOL SH”, “MONVABOL”; attractiveness; pheromone monitoring

For citation: Usenya V. V., Shatravko V. G., Blinova N. S., Pomaz G. M. Attractiveness of synthetic pheromones for stem pests monitoring in pine stands in Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryyya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 7–14 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-7-14>

Введение. В Республике Беларусь леса являются одним из основных возобновляемых природных ресурсов и важнейших национальных богатств, что имеет большое значение для устойчивого социально-экономического развития страны, обеспечения экономической, энергетической, экологической и продовольственной безопасности. На территории страны в видовом составе лесов доминируют хвойные породы (58,0 %), в том числе сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) и ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst) – 48,7 и 9,3 % соответственно от лесопокрытой площади [1].

В последние годы в лесном фонде Беларуси, как и на территории ряда других государств, отмечено снижение биологической устойчивости сосновых лесов и их массовое усыхание [2–5]. Причиной снижения биологической устойчивости сосновых насаждений, особенно в южных регионах страны, является комплекс стрессовых абиотических, биотических и антропогенных факторов, основными из которых являются повышение температуры воздуха и снижение уровня грунтовых вод в вегетационный период. В биологически ослабленных сосновых насаждениях отмечается появление и распространение очагов массового размножения стволовых вредителей, прежде всего вершинного (*Ips acuminatus* Gyll.) и шестизубчатого (*Ips sexdentatus* Voern.) короедов.

Четыре вида усачей рода *Monochamus* (черный сосновый усач (*M. galloprovincialis*), черный бархатно-пятнистый усач (*M. saltuarius*), малый еловый усач (*M. sutor*) и большой черный еловый усач (*M. urussovi*)), распространенные на территории Беларуси, включены в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза как карантинные вредные организмы, ограниченно распространенные на его территории [6, 7]. Усачи рода *Monochamus* повреждают неокоренные лесоматериалы при их хранении и транспортировке, что снижает технические свойства древесины, нанося значительный материальный ущерб. На стадии дополнительного питания взрослые жуки усачей повреждают кору на верхушечных побегах, что приводит к усыханию здоровых хвойных деревьев. Усачи рода *Monochamus* являются также основными переносчиками сосновой стволовой нематоды (*Bursaphelenchus xylophilus*), которая вызывает гибель деревьев хвойных пород и включена в перечень карантинных вредных организмов в ряде стран Европы и Азии [8–11].

Эффективность защиты сосновых насаждений от насекомых-вредителей, оперативная локализация и ликвидация очагов их размножения возможны при своевременном выявлении поврежденных ими насаждений, что обуславливается результативностью лесопатологического мониторинга, составной частью которого является феромонный надзор, осуществляемый с использованием феромонных препаратов. Увеличение численности стволовых вредителей при постоянном феромонном мониторинге является биоиндикатором снижения биологической устойчивости насаждений. Результаты феромонного надзора наряду с другими видами лесопатологического мониторинга используются для оценки и прогноза лесопатологической ситуации в лесном фонде, планирования и проведения в них необходимых санитарно-оздоровительных мероприятий.

Цель настоящего исследования – оценка аттрактивности феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В», «ИПСВАБОЛ Ш» и «МОНВАБОЛ» для контроля численности стволовых вредителей в сосновых насаждениях.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований являлись стволовые вредители в сосновых насаждениях и феромонные препараты для мониторинга их численности.

Натурные испытания по оценке аттрактивности феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В», «ИПСВАБОЛ Ш» и «МОНВАБОЛ» были проведены в биологически ослабленных (поврежденных корневой губкой) 45–90-летних сосновых фитоценозах, в которых имелись ветровальные и буреломные деревья.

При проведении натурных испытаний аттрактивности феромонных препаратов использовали ловушки для отлова стволовых вредителей хвойных пород (ГУ ВУ 100984088.004-2017), выпускаемые ГУ «Беллесозащита». Ловушки оснащали феромонными диспенсерами, представля-

ющими собой пластину пористой вискозы, пропитанную определенной феромонной композицией и помещенную в полиэтиленовую оболочку. Препараты феромонные «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш» снабжены одним диспенсером, «МОНВАБОЛ» – двумя (верхним и нижним) [12, 13].

Ловушки, снабженные феромонными диспенсерами, вывешивали до начала лета поднадзорных насекомых: для вершинного и шестизубчатого короедов – до 25 апреля (25 июня, перед летом второго поколения вредителя, проводили замену диспенсеров), для усачей рода *Monochamus* – с третьей декады мая (ловушки находились в сосновых насаждениях до конца июля).

Ловушки на П-образной опоре вывешивали по определенному маршруту вдоль стены леса или на не покрытых лесом землях: при проведении натуральных испытаний феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В» и ИПСВАБОЛ Ш» – 1 ловушка на 1 га; при испытании препарата «МОНВАБОЛ» – 1 ловушка на 10 га. В качестве контроля использовали ловушки барьерного типа без диспенсера. Устанавливали по две линии из 10 ловушек: 5 с феромонным препаратом и 5 контрольных, при этом контрольные чередовали с ловушками, снабженными феромонными диспенсерами, и нумеровали отдельно по каждому участку соснового насаждения.

Феромонные препараты, принимаемые в качестве эталона, не использовали в связи с отсутствием в Республике Беларусь зарегистрированных и применяемых в практике лесозащиты средств мониторинга вершинного и шестизубчатого короедов, усачей рода *Monochamus*.

При проведении натуральных испытаний аттрактивности феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш» приемник ловушки (пластиковый стакан объемом 0,5 л) устанавливали на высоте 1,3–1,5 м от поверхности почвы, при испытании препарата «МОНВАБОЛ» – на высоте 1,0–1,5 м. С целью исключения возможности выползания жуков по стенкам приемника пластиковый стакан заполняли 3 %-ным раствором соли NaCl (50 % от объема), при мониторинге усачей – 3 %-ным раствором соли NaCl с добавлением жидкого мыла.

Критерием оценки аттрактивности феромонных препаратов являлось количество отловленных экземпляров вершинного и шестизубчатого короедов, усачей рода *Monochamus* за период лета. Учет стволовых вредителей в ловушках проводился через 7–10 дней, анализ – в лабораторных условиях. Количество жуков, отловленных ловушками с феромонными препаратами, сравнивали с количеством жуков данного вида в контрольных ловушках.

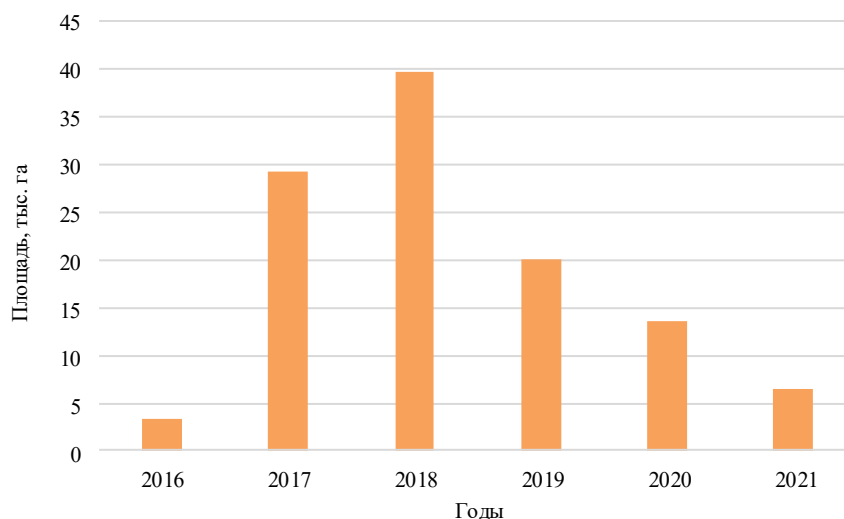
Результаты и их обсуждение. Проблема мониторинга, профилактики и борьбы с массовым усыханием сосновых деревьев заключается в сложности определения характера формирования и развития в их насаждениях очагов усыхания и выделения их буферной зоны, а также в отсутствии эффективных оперативных методов ранней диагностики жизнеспособности деревьев сосны, коротком цикле развития вершинного короеда и его высокой численности в порубочных остатках на лесосеках после проведения сплошных санитарных рубок.

На территории Беларуси в 2016–2021 гг. площадь сплошных санитарных рубок усохших сосновых насаждений составила 112,3 тыс. га. Своевременное выявление при проведении лесопатологического мониторинга усыхающих сосновых насаждений и оперативное проведение в них необходимых санитарно-оздоровительных мероприятий привело к снижению в 2021 г. площади их усыхания по сравнению с 2020, 2019 и 2018 гг. в 2,1; 3,3 и 6,1 раза соответственно (см. рисунок).

Применение синтетических феромонов является одним из самых экологически безопасных и оперативных методов мониторинга насекомых – вредителей лесных фитоценозов. Для мониторинга численности вершинного и шестизубчатого короедов в сосновых насаждениях разработаны отечественные агрегационные феромонные препараты «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш» [14].

Натурные испытания аттрактивности феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш» проведены в 45–50-летних сосновых насаждениях в Борщевском лесничестве Речицкого опытного лесхоза и Зябровском лесничестве ГЛХУ «Корневская ЭЛБ Института леса НАН Беларуси».

Полученные результаты свидетельствуют о высокой аттрактивности феромонного препарата «ИПСВАБОЛ В» по отношению к вершинному короеду. Количество отловленных в период лета жуков вершинного короеда одной ловушкой с феромонным препаратом «ИПСВАБОЛ В» составило 1204–5308 экз., контрольными ловушками – 0–2 экз.



Динамика площади сплошных санитарных рубок усохших сосновых насаждений в лесном фонде Беларуси в 2016–2021 гг.

Dynamics of the clear sanitary cuttings area of dieback pine stands in the forest fund of Belarus in 2016–2021

За весь период лета в сосновом насаждении Борщевского лесничества отловлено 32 645 экз. вершинного короеда, контрольными ловушками – 3 экз.; в Зябровском лесничестве – 16 387 и 7 экз. соответственно. По результатам учетов выявлено, что лет первого поколения вершинного короеда является наиболее массовым. Так, в сосновом насаждении Борщевского лесничества на протяжении первого лета вершинного короеда отловлено 26 759 экз., в период второго лета – 5886, в Зябровском лесничестве – 10 612 и 5775 экз., что соответственно в 4,5 и 1,8 раза выше численности второго лета (табл. 1).

Таблица 1. Показатели аттрактивности феромонного препарата «ИПСВАБОЛ В» в отношении жуков вершинного короеда в сосновых насаждениях

Table 1. Indicators of attractiveness of the synthetic pheromone “IPSVABOL V” (for the sharp-dentated bark beetle) in pine stands

Лесхоз, лесничество	Вариант	Кол-во ловушек, шт.	Кол-во отловленных жуков, экз.			Кол-во жуков, отловленных одной ловушкой за период лета, экз.	
			Первый лет	Второй лет	Всего	max	min
Речицкий опытный лесхоз, Борщевское лесничество НСР ₀₅	«ИПСВАБОЛ В»	10	26 759	5886	32 645	5308	2280
	Контроль	10	1	2	3	1	0
			518,86	208,85	682,84		
ГЛХУ «Корневская ЭЛБ Института леса НАН Беларуси», Зябровское лесничество НСР ₀₅	«ИПСВАБОЛ В»	10	10 612	5775	16 387	2098	1204
	Контроль	10	4	3	7	2	0
			115,44	126,46	238,61		

Результаты натуральных испытаний аттрактивности феромонного препарата «ИПСВАБОЛ Ш» в сосновом насаждении свидетельствуют о том, что за период лета шестизубчатого короеда в Борщевском лесничестве отловлено 2596 экз., контрольными ловушками – 3 экз.; в Зябровском лесничестве – 4987 и 2 экз. соответственно (табл. 2).

Установлено, что лет первого поколения жуков шестизубчатого короеда является также наиболее массовым. Так, в Борщевском лесничестве в течение первого лета отловлено 2060 экз. короеда, в период второго – 536, в Зябровском лесничестве – 4168 и 819 экз., что выше численности стволового вредителя в период второго лета в 3,8 и 5,1 раза соответственно.

Таблица 2. Показатели аттрактивности феромонного препарата «ИПСВАБОЛ Ш» в отношении жуков шестизубчатого кородея в сосновых насаждениях

Table 2. Indicators of attractiveness of the synthetic pheromone “IPSVABOL SH” (for six-toothed bark beetle) in pine stands

Лесхоз, лесничество	Вариант	Кол-во ловушек, шт.	Кол-во отловленных жуков, экз.			Кол-во жуков, отловленных одной ловушкой за период лета, экз.	
			Первый лет	Второй лет	Всего	max	min
Речицкий опытный лесхоз, Борщевское лесничество	«ИПСВАБОЛ Ш»	10	2060	536	2596	415	162
	Контроль	10	2	1	3	1	0
НСР ₀₅			50,45	13,56	60,45		
ГЛХУ «Кореневская ЭЛБ Института леса НАН Беларуси», Зябровское лесничество	«ИПСВАБОЛ Ш»	10	4168	819	4987	581	336
	Контроль	10	0	2	2	1	0
НСР ₀₅			46,91	9,68	52,68		

Таким образом, по данным натурных испытаний, феромонные препараты «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш» обладают высокой аттрактивностью в отношении жуков вершинного и шести-зубчатого короедов.

На основании полученных показателей аттрактивности феромонных препаратов разработаны шкалы оценки численности вершинного и шестизубчатого короедов в феромонных ловушках для их мониторинга в сосновых насаждениях (табл. 3, 4).

Таблица 3. Шкала оценки численности вершинного кородея в феромонных ловушках

Table 3. Scale for assessing the amount of sharp-dentated bark beetle in pheromone traps

Кол-во отловленных жуков первого поколения (III декада апреля – III декада мая), в среднем на одну ловушку	Оценка численности	Угроза возникновения очага
Менее 50	Очень низкая	Отсутствует
51–150	Низкая	Отсутствует
151–300	Средняя	Слабая
301–1000	Повышенная	Средняя
1001–3000	Высокая	Высокая
3001 и более	Очень высокая	Высокая

Таблица 4. Шкала оценки численности шестизубчатого кородея в феромонных ловушках

Table 4. Scale for assessing the amount of six-toothed bark beetle in pheromone traps

Кол-во отловленных жуков первого поколения (III декада апреля – III декада мая), в среднем на одну ловушку	Оценка численности	Угроза возникновения очага
Менее 50	Очень низкая	Отсутствует
51–100	Низкая	Отсутствует
101–150	Средняя	Слабая
151–300	Повышенная	Средняя
301 и более	Высокая	Высокая

Натурные испытания аттрактивности феромонного препарата «МОНВАБОЛ» проведены в 75–90-летних сосновых насаждениях на территории Головчицкого лесничества ГСЛХУ «Наровлянский спецлесхоз» и Чечерского лесничества ГСЛХУ «Чечерский спецлесхоз».

Установлено, что количество жуков-усачей рода *Monochamus*, отловленных ловушками с феромонным диспенсером, значительно выше, чем отловленных контрольными ловушками (табл. 5).

На протяжении периода лета в сосновом насаждении Головчицкого лесничества ловушками с феромонным препаратом отловлено 1156 экз. черного соснового усача (*Monochamus galloprovincialis*), что в 289 раз выше, чем отловлено контрольными ловушками (4 экз.), в Чечерском лесничестве – 827 и 3 экз. соответственно.

Т а б л и ц а 5. Показатели аттрактивности феромонного препарата «МОНВАБОЛ» в отношении жуков-усачей рода *Monochamus* в сосновых насажденияхTable 5. Indicators of attractiveness of the synthetic pheromone “MONVABOL” (for the longhorn (*Monochamus* spp.) beetles) in pine stands

Лесхоз, лесничество	Вариант	Кол-во ловушек, шт.	Кол-во отловленных жуков, экз.	Кол-во жуков, отловленных одной ловушкой за период лета, экз.	
				max	min
ГСЛХУ «Наровлянский спецлесхоз», Головчицкое лесничество	«МОНВАБОЛ»	10	1156	140	98
	Контроль	10	4	2	0
НСР ₀₅			8,73		
ГСЛХУ «Чечерский спецлесхоз», Чечерское лесничество	«МОНВАБОЛ»	10	827	109	51
	Контроль	10	3	1	0
НСР ₀₅			12,2		

Т а б л и ц а 6. Шкала оценки численности усачей рода *Monochamus* в феромонных ловушкахTable 6. Scale for assessing the amount of longhorn (*Monochamus* spp.) beetles in pheromone traps

Кол-во отловленных жуков-усачей за период лета (III декада мая – июль), в среднем на одну ловушку	Оценка численности
До 30	Низкая
31–300	Средняя
Более 300	Высокая

На основании результатов натурных испытаний аттрактивности препарата «МОНВАБОЛ» составлена шкала оценки численности усачей рода *Monochamus* в феромонных ловушках (табл. 6).

Разработаны методы феромонного мониторинга в сосновых насаждениях вершинного и шестизубчатого короедов с применением феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш» и ловушки для отлова стволовых вредителей хвойных пород, которые изложены в техническом правовом акте Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь «Рекомендации по применению феромонов для контроля за численностью вершинного и шестизубчатого короедов» [15]. Выпуск феромонных диспенсеров препаратов «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш» ежегодно осуществляется в БГУ в соответствии с заявками юридических лиц, ведущих лесное хозяйство. В лесном фонде Беларуси в 2016–2021 гг. для мониторинга численности вершинного и шестизубчатого короедов применялось 39 тыс. феромонных диспенсеров препаратов «ИПСВАБОЛ В» и «ИПСВАБОЛ Ш».

В сосновых насаждениях контроль численности усачей рода *Monochamus* осуществляется в соответствии с разработанным методом феромонного мониторинга с использованием феромонного препарата «МОНВАБОЛ» и ловушки для отлова усачей рода *Monochamus* (ТУ ВУ 100984088.007-202) [16–18].

Использование методов феромонного мониторинга в практике лесозащиты позволяет оперативно осуществлять контроль за численностью и территориальным распространением вершинного и шестизубчатого короедов, усачей рода *Monochamus*, своевременно назначать и проводить необходимые лесозащитные мероприятия в сосновых насаждениях Беларуси.

Заключение. Результаты проведенных в сосновых насаждениях натурных испытаний отечественных феромонных препаратов «ИПСВАБОЛ В», «ИПСВАБОЛ Ш» и «МОНВАБОЛ» свидетельствуют о их высокой аттрактивности в отношении вершинного, шестизубчатого короедов и усачей рода *Monochamus*. Количество отловленных жуков вершинного и шестизубчатого короедов за весь период лета одной ловушкой с феромонными препаратом «ИПСВАБОЛ В» составило 1204–5308 экз., препаратом «ИПСВАБОЛ Ш» – 162–581, контрольными ловушками – 0–1 и 0–1 экз. Ловушкой с феромонным препаратом «МОНВАБОЛ» отловлено 51–140 экз., контрольными ловушками – 0–2 экз. черного соснового усача.

Выявлено, что в сосновых насаждениях лет первого поколения вершинного и шестизубчатого короедов (III декада апреля – III декада мая) является наиболее массовым – соответственно в 1,8–4,5 и 3,8–5,1 раза выше численности данных стволовых вредителей второго лета.

Впервые разработаны специальные шкалы оценки численности стволовых вредителей, позволяющие определить угрозу возникновения их очагов, и методы феромонного мониторинга вершинного и шестизубчатого короедов и усачей рода *Monochamus*, обеспечивающие оперативность контроля их численности и распространения в сосновых насаждениях с целью своевременного назначения и проведения лесозащитных мероприятий.

Список использованных источников

1. Государственный лесной кадастр Республики Беларусь по состоянию на 01.01.2021. – Минск, 2021. – 63 с.
2. Faccoli, M. Effectiveness of different trapping protocols for outbreak management of the engraver pine beetle *Ips acuminatus* (Curculionidae, Scolytinae) / M. Faccoli, F. Colombari, V. Finozzi // Int. J. Pest Management. – 2012. – Vol. 58, N 3. – P. 267–273. <https://doi.org/10.1080/09670874.2011.642824>
3. Жигунов, А. В. Массовое усыхание лесов на северо-западе России / А. В. Жигунов, Т. А. Семакова, Д. А. Шабунин // Лесобиологические исследования на северо-западе таежной зоны России: итоги и перспективы : материалы науч. конф., посвящ. 50-летию Ин-та леса Карельск. науч. центра РАН (Петрозаводск, 3–5 октября 2007 г.). – Петрозаводск, 2007. – С. 42–52.
4. Мешкова, В. Л. Лесные условия и другие признаки благоприятных для короедов сосновых насаждений / В. Л. Мешкова, О. И. Борисенко, В. И. Пригорницкий // Изв. Лесн. акад. наук Украины. – 2018. – Т. 1. – С. 106–114.
5. Сазонов, А. А. Биологический пожар в сосновых лесах / А. А. Сазонов, В. Б. Звягинцев // Лесн. и охот. хоз-во. – № 6. – С. 9–13.
6. Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза: в редакции решения Совета Евразийской экономической комиссии от 15 июля 2022 г. № 108. – Режим доступа: https://ggiskzr.by/doc/quarantine/!%20158%20Ед.перечень%20КО%20в%20ред.%20Реш.%20№%20108%20от%2015.07.2022_c%2003.09.2022.pdf (дата обращения 15.09.2022).
7. Каталог жесткокрылых (Coleoptera, Insecta) Беларуси / О. Р. Александрович [и др.]. – Минск : Белорус. респ. фонд фонд. исслед., 1996. – 103 с.
8. Лесная энтомология / Е. Г. Мозолевская [и др.]. – М. : Академия, 2010. – 416 с.
9. Павлов, В. С. Лесохозяйственное значение усачей рода *Monochamus* на северо-западе Российской Федерации : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.03.03 / В. С. Павлов ; С.-Петерб. гос. лесотехн. акад. – СПб., 2009. – 21 с.
10. Плавильщиков, Н. Н. Животный мир СССР. Т. 23, вып. 1. Жуки-дровосеки. Пт. 3. Подсемейство Lamiinae. Часть 1. Жесткокрылые / Н. Н. Плавильщиков. – М. ; Ленинград, Изд-во АН СССР, 1958. – 592 с.
11. Бенедиктов, А. А. Жуки-усачи рода *Monochamus* / А. А. Бенедиктов // Лесн. вестн. – 2007. – Вып. 34. – С. 34–35.
12. Разработка феромонных композиций агрегусами рода *Monochamus* и оценка их аттрактивности / Б. В. Усеня [и др.] // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. – Гомель, 2019. – Т. 1. – С. 294–302.
13. Усеня, В. В. Аттрактивность феромонных композиций для мониторинга численности усачей рода *Monochamus* в хвойных насаждениях Беларуси / В. В. Усеня, Н. С. Блинова, Г. М. Помаз // Лесное хозяйство: материалы 84-й науч.-техн. конф. проф.-препод. состава, науч. сотр. и аспирантов (с междунар. участием), Минск, 03–14 февраля 2020 г. / Белорус. гос. технол. ун-т. – Минск, 2020. – С. 88–89.
14. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь. – Минск : Промкомплекс, 2020. – 742 с.
15. Рекомендации по применению феромонов для контроля численности острозубчатого и шестизубчатого короеда: введ. 06.02.2018. – Минск, 2018. – 12 с.
16. Усеня, В. В. Мониторинг численности усачей рода *Monochamus* с применением феромонного препарата МОНВАБОЛ на хвойных растениях / В. В. Усеня, Н. С. Блинова // Тр. БГТУ. Сер. 1, Лесное хозяйство, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов. – 2021. – Т. 2 (246). – С. 164–169.
17. Усеня, В. В. Методика феромонного мониторинга усачей рода *Monochamus* / В. В. Усеня, Н. С. Блинова, А. С. Зур // Лесное хозяйство: материалы 85-й науч.-техн. конф. проф.-препод. состава, науч. сотр. и аспирантов (с междунар. участием), Минск, 1–13 февраля 2021 г. / Белорус. гос. технол. ун-т. – Минск, 2021. – С. 148–149.
18. Усеня, В. В. Феромонный мониторинг усачей рода *Monochamus* на особо охраняемых природных территориях / В. В. Усеня, Н. С. Блинова, А. С. Зур // Лесное хозяйство : материалы 86-й науч.-техн. конф. проф.-препод. состава, науч. сотр. и аспирантов, Минск, 31 янв.–12 февр. 2022 г. / Белорус. гос. технол. ун-т. – Минск, 2022. – С. 335–337.

References

1. State Forest Cadastre of the Republic of Belarus as of 01.01.2021. Minsk, 2021. 63 p. (in Russian).
2. Faccoli M., Colombari F., Finozzi V. Effectiveness of different trapping protocols for outbreak management of the engraver pine beetle *Ips acuminatus* (Curculionidae, Scolytinae). *International Journal of Pest Management*, 2012, vol. 58, no. 3, pp. 267–273. <https://doi.org/10.1080/09670874.2011.642824>
3. Zhigunov A. V., Semakova T. A., Shabunin D. A. Mass drying up of forests in the north-west of Russia. *Lesobiologicheskie issledovaniya na severo-zapade taezhnoy zony Rossii: itogi i perspektivy: materialy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 50-letiyu Instituta lesa Karel'kogo nauchnogo tsentra RAN (Petrozavodsk, 3–5 oktyabrya 2007 goda)* [Proceedings of the scientific conference celebrating the 50th anniversary of the Forest Research Institute Karelian Research Centre of RAS (Petrozavodsk, October 3–5, 2007)]. Petrozavodsk, 2007, pp. 42–52 (in Russian).

4. Meshkova V. L., Borisenko O. I., Prigornitskii V. I. Forest site conditions and other features of Scots pine stands favorable for bark beetles. *Izvestiya Lesnoi akademii nauk Ukrainy* [Proceedings of the Forestry Academy of Sciences of Ukraine], 2018, vol. 16, pp. 106–114 (in Russian).
5. Sazonov A. A., Zvyagintsev V. B. Biological fire in pine forests. *Lesnoe i okhotnich'e khozyaistvo* [Forestry and hunting], 2016, no. 6, pp. 9–13 (in Russian).
6. *Unified list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union: as amended by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission No. 108 dated July 15, 2022*. Available at: https://ggiskzr.by/doc/quarantine/!%20158%20Ед.перечень%20КО%20в%20ред.%20Реш.%20№%20108%20от%2015.07.2022_c%2003.09.2022.pdf (accessed 15.09.2022) (in Russian).
7. Aleksandrovich O. R., Lopatin I. K., Pisanenko A. D., Tsinkevich V. A., Snitko S. M. *Catalog of Coleoptera (Coleoptera, Insecta) of Belarus*. Minsk, Belarusian Republican Foundation for Basic Research, 1996. 103 p. (in Russian).
8. Mozolevskaya E. G., Selikhovkin A. V., Izhevskii S. S., Zakharov A. A., Golosova M. A., Nikitskii N. B. *Forest entomology*. Moscow, Akademiya Publ., 2010. 416 p. (in Russian).
9. Pavlov V. S. *Forestry significance of longhorn beetles of the genus Monochamus in the North-West of the Russian Federation. Abstract of Ph. D.* St. Petersburg, 2009. 21 p. (in Russian).
10. Plavil'shnikov N. N. *Fauna of the USSR. Vol. 23, iss. 1. Beetles-lumberjacks. Pt. 3. Subfamily Lamiinae. Pt 1. Coleoptera*. Moscow, Leningrad, Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1958. 592 p. (in Russian).
11. Benediktov A. A. Longhorn beetles of the genus *Monochamus*. *Lesnoi vestnik* [Forest bulletin], 2007, no. 34, pp. 34–35 (in Russian).
12. Usenya B. B., Masalov H. B., Astashko D. A., Blinova H. C., Adamovich Yu. I., Teglenkov E. A. Development of pheromone compositions by agrees of the genus *Monochamus* and evaluation of their attractive activity. *Problemy lesovodeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forestry and forestry: a collection of scientific papers]. Gomel', 2019, vol. 79, pp. 294–302 (in Russian).
13. Usenya V. V., Blinova N. S., Pomaz G. M. Attractive activity of pheromone compositions for monitoring the abundance of longhorn beetles of the genus *Monochamus* in coniferous plantations of Belarus. *Lesnoe khozyaistvo: materialy 84-i nauchno-tehnicheskoi konferentsii professorsko-prepodavatel'skogo sostava, nauchnykh sotrudnikov i aspirantov (s mezhdunarodnym uchastiem) (Minsk, 03–14 fevralya 2020 goda)* [Forestry: materials of the 84th scientific and technical conference of faculty, researchers and graduate students (with international participation) (Minsk, February 03–14, 2020)]. Minsk, 2020, pp. 88–89 (in Russian).
14. *State Register of Plant Protection Products (Pesticides) and Fertilizers Permitted for Use on the Territory of the Republic of Belarus*. Minsk, Promkompleks Publ., 2020. 742 p. (in Russian).
15. *Recommendations on application of pheromones for control of the abundance of the of sharp-dentated and six-toothed bark beetle: Introduced 06.02.2018*. Minsk, 2018. 12 p. (in Russian).
16. Usenya V. V., Blinova N. S. Monitoring of the number of longhorn beetles of the genus *Monochamus* with the application of the pheromone Preparation MONVABOL in coniferous plants. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya 1, Lesnoe khozyaistvo, prirodopol'zovanie i pererabotka vozobnovlyaemykh resursov* [Proceedings of the Belarusian State Technological University. Series 1, Forestry, nature management and processing of renewable resources], 2021, no. 2 (246), pp. 164–169 (in Russian).
17. Usenya V. V., Blinova N. S., Zur A. S. Method of pheromone monitoring of longhorn beetles of the genus *Monochamus*. *Lesnoe khozyaistvo: materialy 85-i nauchno-tehnicheskoi konferentsii professorsko-prepodavatel'skogo sostava, nauchnykh sotrudnikov i aspirantov (s mezhdunarodnym uchastiem) (Minsk, 1–13 fevralya 2021 goda)* [Forestry: materials of the 85th scientific and technical conference of faculty, researchers and graduate students (with international participation) (Minsk, February 1–13, 2021)]. Minsk, 2020, pp. 148–149 (in Russian).
18. Usenya V. V., Blinova N. S., Zur A. S. Pheromone monitoring of longhorn beetles of the genus *Monochamus* in specially protected natural areas. *Lesnoe khozyaistvo: materialy 86-i nauchno-tehnicheskoi konferentsii professorsko-prepodavatel'skogo sostava, nauchnykh sotrudnikov i aspirantov (Minsk, 31 yanvarya–12 fevralya 2022 goda)* [Forestry: materials of the 86th scientific and technical conference of professors and teachers staff, researchers and graduate students (Minsk, January 31–February 12, 2022)]. Minsk, 2022, pp. 335–337 (in Russian).

Информация об авторах

Усеня Владимир Владимирович – академик, д-р с.-х. наук, профессор, заместитель директора. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246001, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: usenyaforinst@gmail.com

Шатравко Валентин Геннадьевич – канд. с.-х. наук, директор. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vshatravko@mail.ru

Блинова Наталья Сергеевна – науч. сотрудник. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246001, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: zachita-lesa@rambler.ru

Помаз Галина Михайловна – науч. сотрудник. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246001, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: galina-gomel@rambler.ru

Information about the authors

Vladimir V. Usenya – Academician, D. Sc. (Agric.), Professor, Deputy director. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: usenyaforinst@gmail.com

Valentin G. Shatravko – Ph. D. (Agric.), Director. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vshatravko@mail.ru

Natalya S. Blinova – Researcher. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: zachita-lesa@rambler.ru

Galina M. Pomaz – Researcher. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: galina-gomel@rambler.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 57.044; 581.19; 581.14

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-15-26>

Поступила в редакцию 01.09.2022

Received 01.09.2022

Н. А. Еловская¹, Ж. Н. Калацкая¹, Н. А. Ламан¹, К. С. Гилевская²,
А. Н. Красковский², В. И. Куликовская²

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

²Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ХИТОЗАНОМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Аннотация. В статье рассматривается влияние нанокompозитов (НК) на основе серебросодержащего хитозана, массовое соотношение хитозан-Ag 50:1 (Хит-Ag 50:1) и 100:1 (Хит-Ag 100:1), внесенных в питательную среду культивирования в разведениях 1:500 и 1:1000, на развитие микропобегов и микроклонов картофеля сорта Бриз (*Solanum tuberosum* L.). При клонировании растений-регенерантов картофеля и культивировании микропобегов непосредственно на модифицированных питательных средах выявлен ингибирующий эффект НК на развитие микроклонов, индукции ризогенеза не наблюдалось. При пересадке 3-недельных микроклонов картофеля с развитой корневой системой на питательные среды, модифицированные НК Хит-Ag 50:1, выявлено замедление роста и развития микроклонов по сравнению с контролем и при внесении хитозана. Включение Хит-Ag 100:1 в питательную среду не влияло на рост микроклонов по сравнению с контролем, однако биомасса корней снижалась по сравнению с таковой при внесении чистого хитозана. Сохранение содержания пролина на уровне контрольного варианта при снижении количества образующейся перекиси водорода свидетельствует об отсутствии стрессовой реакции сформированных микроклонов картофеля на исследуемые хитозан-Ag нанокompозитные смеси. Вероятно, более плотная оболочка, образующаяся при увеличении массового содержания хитозана в НК, способствует замедлению генерации ионов серебра Ag⁺ и снижает их токсичность.

Ключевые слова: картофель, хитозан, серебросодержащие нанокompозиты, *in vitro*, рост и развитие, фотосинтетические пигменты, пролин, перекись водорода

Для цитирования: Влияние стабилизированных хитозаном наночастиц серебра на физиолого-биохимическое состояние растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в культуре *in vitro* / Н. А. Еловская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. навук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 15–26. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-15-26>

Ninel A. Yalouskaya¹, Joanna N. Kalatskaja¹, Nikolai A. Laman¹, Kseniya S. Hileuskaya²,
Aliaksandr N. Kraskouski², Viktoriya I. Kulikouskaya²

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

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

INFLUENCE OF CHITOSAN-STABILIZED SILVER NANOPARTICLES ON THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STATE OF POTATO PLANTS (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) IN *IN VITRO* CULTURE

Abstract. The article contains the results of study of the influence of added to culture medium silver-containing chitosan-based nanocomposites (Chitosan-Ag) at a dilution of 1:500 and 1:1000 (the mass ratio of the components is 50:1 for Chit-Ag 50:1 and 100:1 for Chit-Ag 100:1) on the development of potato microshoots and microclones with a formed root system. Potato microshoots cultivated for 4 weeks on nutrient medium modified with nanocomposites were characterized by slow development and the absence of rhizogenesis, which indicates the toxic effect of the studied nanocomposite concentrations. When replacing the standard nutrient medium with nanocomposites modified for a potato microclone with developed roots, the Chit-Ag 50:1 reduced the rate of growth and development of microclones compared to control and pure chitosan. The Chit-Ag 100:1 nanocomposite had no influence on the microclone growth compared to the control, but reduced the root biomass compared to chitosan. The preservation of photosynthetic pigments and proline concentrations with decreasing the hydrogen peroxide level indicates the absence of the toxic effect of silver-containing chitosan-based nanocomposites on the formed potato microclones. The chitosan concentration increase in the nanocomposite composition helps us to reduce the toxic effect due to the formation of a dense stabilizing shell that delays the silver ion generation.

Keywords: potato, chitosan, silver-containing nanocomposites, *in vitro*, growth and development, photosynthetic pigments, proline, hydrogen peroxide

For citation: Yaloukaya N. A., Kalatskaja J. N., Laman N. A., Hileuskaya K. S., Kraskouski A. N., Kulikouskaya V. I. Influence of chitosan-stabilized silver nanoparticles on the physiological and biochemical state of potato plants (*Solanum tuberosum* L.) in *in vitro* culture. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 15–26 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-15-26>

Введение. Актуальным направлением современных исследований в области физиологии растений является изучение биологической активности новых препаратов для растениеводства на основе природного сырья, обладающих полифункциональными свойствами. Благодаря своему природному происхождению такие препараты легко включаются в экосистему, не нарушая взаимосвязей между ее элементами и не увеличивая пестицидную нагрузку. Даже в малых дозах они могут оказывать существенное положительное влияние на рост и развитие сельскохозяйственных культур, на их устойчивость к условиям среды, продуктивность и качество получаемой продукции. Наличие пролонгированного действия способствует сохранению эффекта в течение всего периода вегетации.

В качестве активного вещества таких препаратов рассматривают соединения на основе хитозана. Хитозан является производным хитина – основного компонента клеточной стенки грибов и экзоскелета артропод [1]. Хитозан легко подвергается химической модификации, что позволяет повысить эффективность препаратов на его основе за счет включения в его структуру различных физиологически активных соединений (например, органических кислот и др.), и достаточно быстро разлагается в окружающей среде [2, 3]. Хитозан обладает иммуностимулирующей активностью [4], снижает вероятность проникновения в клетки и распространения грибных, бактериальных и вирусных патогенов [5, 6]. Использование хитозана в качестве внекорневой подкормки в условиях открытого грунта или в качестве активного компонента питательной среды в условиях *in vitro* оказывает стимулирующий эффект на многие физиологические процессы растений, в том числе на синтез вторичных метаболитов, рост и продуктивность [2, 7–9].

Несмотря на то что во многих странах активно используются препараты, содержащие в качестве действующего вещества хитозан (например, Экогель, Biochit, Elexa), создание новых формуляций сопряжено с определенными трудностями. Эффект хитозана и его производных зависит от многих факторов: молекулярной массы, степени полимеризации и дезацетилирования, концентрации, вида растения, химического состава почвы и условий окружающей среды [10, 11].

Бактерицидное действие серебра известно давно. Однако только с развитием нанотехнологий биогенные металлы стали широко использоваться в сельском хозяйстве. На сегодняшний день препараты так называемой серебряной линейки зарегистрированы для применения в сельском хозяйстве России (Зеребра Агро, Зерокс), Средней Азии, странах Восточной Европы. Действующим веществом таких препаратов являются наночастицы (НЧ) серебра, стабилизированные с помощью биоразлагаемых и безопасных поверхностно-активных веществ.

НЧ серебра менее токсичны, чем ионы Ag^+ [12, 13], однако эффект НЧ определяется не только входящими в их состав веществами, но также их размером и концентрацией [14]. Немаловажную роль играет возраст и вид растения, условия проведения эксперимента и его продолжительность [13].

Частицы коллоидного серебра, модифицированные биологически активным полимером, оказывают комплексное действие: прямое (биоцидное) на патоген и косвенное (элиситорное) на растение. Механизм биоцидного действия НЧ заключается в нарушении работы мембранных белков клетки патогена, приводящем к ее гибели, а при взаимодействии с клеточной стенкой растений отмечаются активация синтеза активных форм кислорода (АФК) и запуск сигнальных реакций, связанных с формированием приобретенной системной устойчивости [15].

Несмотря на множество проведенных исследований взаимодействия НЧ серебра с растительными организмами, полученные данные весьма противоречивы [16].

Основная часть опубликованных исследований фокусируется на оценке эффекта обработки семян или опрыскивания листьев саженцев растворами, содержащими НЧ серебра в виде коллоидной взвеси, на отдельных физиолого-биохимических аспектах процессов роста и развития, однако практически отсутствуют исследования с использованием культуры *in vitro*.

В связи с этим актуальными представляются исследования о влиянии НЧ серебра, стабилизированных с помощью природного элиситора – хитозана, на процессы роста и развития сельскохозяйственных культур *in vitro*.

Культура *in vitro* представляет собой информативную модельную систему, которая позволяет исследовать метаболические процессы и реакции растительного организма на определенное воздействие, нивелируя другие, в строго контролируемых условиях.

Цель данной работы – изучение влияния наноконкомпозитов на основе серебросодержащего хитозана на морфометрические и биохимические показатели микроклонов растений картофеля в культуре *in vitro* в оптимальных условиях.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись растения-регенеранты картофеля среднераннего сорта Бриз белорусской селекции, предоставленные РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству».

В качестве соединений, потенциально обладающих ростстимулирующим действием, использовали синтезированные в Институте химии новых материалов НАН Беларуси наноконкомпозиты (НК) Хитозан-Ag, массовое соотношение хитозан:Ag в которых составляло 50:1 (Хит-Ag 50:1) и 100:1 (Хит-Ag 100:1). Первоначальные концентрации компонентов НК составляли: $c_{\text{хит}} = 15,5$ мг/мл и $c_{\text{Ag}} = 0,31$ мг/мл для Хит-Ag 50:1, $c_{\text{хит}} = 31$ мг/мл и $c_{\text{Ag}} = 0,31$ мг/мл для Хит-Ag 100:1. Начальная концентрация раствора хитозана – 31 мг/мл.

Исследование влияния выбранных НК на ростовые и биохимические показатели проводили в два этапа, различающихся условиями проведения эксперимента.

Этап 1. Материнские растения-регенеранты картофеля клонировали в стерильных условиях ламинар-бокса. Полученные микропобеги помещали на питательную среду Мурасиге–Скуга (МС-среда) [17] (агар – 14 г/л, сахароза – 30 г/л, аскорбиновая и никотиновая кислоты – по 1,0 мг/л, индолил-3-уксусная кислота – 0,5 мг/л, кинетин – 0,25 мг/л, pH = 5,6–5,8) согласно схеме: контроль (МС-среда без добавления хитозана и НК на его основе); контроль 2 (МС-среда с добавлением хитозана, 30 кДа; в разведении 1:500); варианты № 1 и № 2 (МС-среды с добавлением НК Хит-Ag 50:1 и Хит-Ag 100:1 в разведении 1:500 соответственно); контроль 3 (МС-среда с добавлением хитозана, 30 кДа в разведении 1:1000); варианты № 4 и № 5 (МС-среды с добавлением НК Хит-Ag 50:1 и Хит-Ag 100:1 в разведении 1:1000).

Растения выращивали при температуре 23–25 °С, освещенности 3000 лк и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) в течение 4 недель, после чего оценивали влияние внесенных в питательную среду соединений на основе хитозана на морфометрические показатели микроклонов.

Этап 2. Материнские растения картофеля клонировали в стерильных условиях ламинар-бокса. Полученные микропобеги помещали на стандартную МС-среду и выращивали в течение 3 недель, после чего измеряли длину стебля и корня, подсчитывали число междоузлий микроклонов картофеля и проводили замену агаризованной МС-среды на жидкую согласно схеме: контроль (МС-среда без добавления хитозана и НК на его основе); хитозан (МС-среда с добавлением хитозана, 30 кДа; в разведении 1:500); Хит-Ag 50:1 (МС-среда с добавлением НК Хит-Ag 50:1 в разведении 1:500); Хит-Ag 100:1 (МС-среда с добавлением НК Хит-Ag 100:1 в разведении 1:500).

На 21-е сутки проводили повторное измерение морфометрических показателей. Затем растительный материал фиксировали в жидком азоте и оценивали влияние внесенных в питательную среду соединений на основе хитозана на накопление основных фотосинтетических (ФС) пигментов и уровень развития оксидативного стресса по содержанию перекиси водорода (H_2O_2) и пролина.

ФС пигменты экстрагировали 100 %-ным ацетоном и рассчитывали согласно формулам А. А. Шлыка [18]. Содержание перекиси водорода (H_2O_2) определяли по цветной реакции с ксиленовым оранжевым [19], уровень пролина – по цветной реакции с нингидрином при нагревании [20]. Длину стебля и корней измеряли с помощью линейки. Массу стебля и корней определяли путем взвешивания на аналитических весах. Относительную скорость роста рассчитывали по формуле

$$v_{\text{рост}} = (a_2 - a_1) / t a_1 \cdot 100 \%,$$

где $v_{\text{рост}}$ – относительная скорость роста, %; a_1 – длина стебля при первом измерении, см; a_2 – длина стебля при втором измерении, см; t – время, сут [21].

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Statistics 22. Количественные данные проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Различия между вариантами оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим сравнением частных средних по тесту Дункана. Результаты представлены в виде $M \pm Sd$ (где M – среднее арифметическое значение, Sd – стандартное отклонение) трех биологических повторностей. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Буквами латинского алфавита a, b, c, d отмечено наличие достоверных различий между вариантами.

Результаты и их обсуждение. Ранее полученные результаты [22] показали, что внесенные в МС-среду НК в разных концентрациях (для Хит-Аг 50:1 при разведении 1:100 $c_{\text{хит}} = 0,155$ мг/мл, $c_{\text{Аг}} = 3,1$ мкг/мл и при разведении 1:250 $c_{\text{хит}} = 0,062$ мг/мл, $c_{\text{Аг}} = 1,24$ мкг/мл) оказывают негативный эффект на рост и развитие микропобегов картофеля. Также был отмечен ингибирующий эффект вносимых НК на процессы ризогенеза микроклонов картофеля. В связи с этим было решено уменьшить концентрацию НК Хит-Аг 50:1 и Хит-Аг 100:1, вносимых в МС-среду, а также изменить условия проведения эксперимента.

Этап 1. МС-среда с добавлением НК Хит-Аг 50:1 и Хит-Аг 100:1 в разведении 1:500 и 1:1000.

Несмотря на снижение концентрации, НК на основе серебросодержащего хитозана оказывают негативный эффект на рост и развитие микроклонов растений картофеля.

Длина стебля и число междоузлий микроклонов картофеля, культивируемых на МС-средах с добавлением НК, достоверно снизились как по сравнению с контролем, так и по сравнению с микроклонами, культивированными на среде с хитозаном (контроль 2 и 3) (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние нанокмпозитов хитозан-Аг на длину стебля и число междоузлий растений картофеля в культуре *in vitro*

Table 1. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on stem length and number of internodes of microclone potato plants in *in vitro* culture

Вариант	Стебель		Междоузлия	
	Длина, см	Снижение, %	Число, шт.	Снижение, %
Разведение 1:500				
Контроль	$3,6 \pm 0,16^a$	–	$6,0 \pm 0,20^a$	–
Контроль 2	$3,0 \pm 0,06^b$	16,7	$3,7 \pm 0,12^b$	38,3
Вариант № 1	$0,7 \pm 0,01^c$	80,6	$1,9 \pm 0,12^c$	68,3
Вариант № 2	$1,3 \pm 0,05^d$	63,9	$3,4 \pm 0,20^b$	43,3
Разведение 1:1000				
Контроль	$3,6 \pm 0,16^a$	–	$6,0 \pm 0,20^a$	–
Контроль 3	$2,4 \pm 0,16^b$	33,3	$4,1 \pm 0,12^b$	31,7
Вариант № 4	$0,6 \pm 0,08^c$	83,3	$2,1 \pm 0,31^c$	65,0
Вариант № 5	$0,8 \pm 0,14^c$	77,8	$2,1 \pm 0,31^c$	65,0

Аналогичный эффект хитозан и НК на его основе оказали на сырую и сухую массу стебля микроклонов картофеля (табл. 2).

Для культуры *in vitro* одним из важнейших показателей является формирование здоровой корневой системы. Внесение в МС-среду НК оказывает ингибирующий эффект на развитие корневой системы (рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на снижение концентрации, исследуемые НК хитозан-Аг оказывают сильное токсическое действие на микропобеги картофеля, культивируемые непосредственно на модифицированных МС-средах.

Т а б л и ц а 2. Влияние нанокмпозитов хитозан-Ag на сырую и сухую массы стебля микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

T a b l e 2. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on the wet and dry stem weight of microclone potato plants in *in vitro* culture

Вариант	Масса стебля			
	сырая, мг	снижение, %	сухая, мг	снижение, %
Разведение 1:500				
Контроль	55,07 ± 4,62 ^a	–	8,11 ± 0,68 ^a	–
Контроль 2	39,20 ± 0,40 ^b	28,8	6,09 ± 0,06 ^b	24,9
Вариант №1	41,40 ± 1,51 ^b	24,8	6,61 ± 0,24 ^b	18,5
Вариант №2	34,13 ± 2,25 ^c	38,0	5,15 ± 0,34 ^c	36,5
Разведение 1:1000				
Контроль	55,07 ± 4,62 ^a	–	8,11 ± 0,68 ^a	–
Контроль 3	47,87 ± 1,22 ^b	13,1	6,77 ± 0,17 ^b	16,5
Вариант № 4	25,27 ± 1,53 ^c	54,1	5,06 ± 0,31 ^c	37,5
Вариант № 5	30,67 ± 0,61 ^d	44,3	4,40 ± 0,09 ^c	45,7

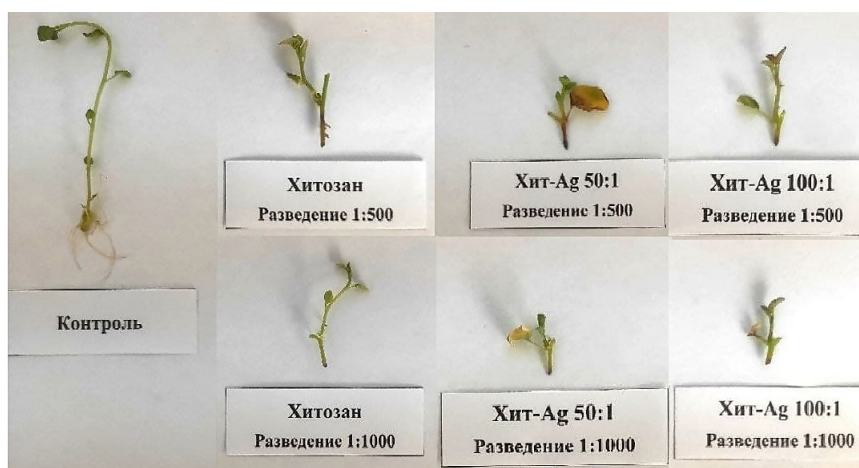


Рис. 1. Внешний вид микроклонов картофеля сорта Бриз после 4 недель культивирования на модифицированных хитозаном и нанокмпозитами на его основе питательных МС-средах

Fig. 1. Appearance of microclone potato plants after 4-week cultivation on MS-media modified with chitosan and silver-containing chitosan-based nanocomposites

Этап 2. МС-среда с добавлением НК Хит-Ag 50:1 и Хит-Ag 100:1 в разведении 1:500.

Для пересадки на жидкую МС-среду с НК отбирали микроклоны с одинаковой длиной стебля. Добавление НК Хит-Ag 50:1 в МС-среду привело к снижению как длины стебля (рис. 2, А), так и относительной скорости роста (рис. 2, В) опытных растений картофеля по сравнению с контролем.

Входящие в состав МС-среды НК Хит-Ag 50:1 и Хит-Ag 100:1 оказали положительный эффект на изменение массы стебля микроклонов картофеля. Сырая масса стебля микроклонов картофеля увеличилась на 22,3 и 32,7 % по сравнению с контролем (табл. 3). Под влиянием НК Хит-Ag 50:1 содержание сухой биомассы снизилось, в то время как НК Хит-Ag 100:1 усилили накопление сухой биомассы по сравнению с контролем (табл. 3).

Добавление НК на основе хитозана снизило количество междоузлий опытных вариантов по сравнению с контролем, но не по сравнению с чистым хитозаном в варианте Хит-Ag 50:1 (рис. 3, А).

Основными показателями ризогенеза у растений в культуре *in vitro* являются количество и длина корней [23]. Среднее число корней увеличилось на 24,5 % по сравнению с контролем при добавлении в МС-среду НК Хит-Ag 100:1 (рис. 3, В). При добавлении в МС-среду НК Хит-Ag 50:1 среднее число корней не изменилось по сравнению с контролем, но уменьшилось на 30,1 % по сравнению с таковым при внесении хитозана (рис. 3, В).

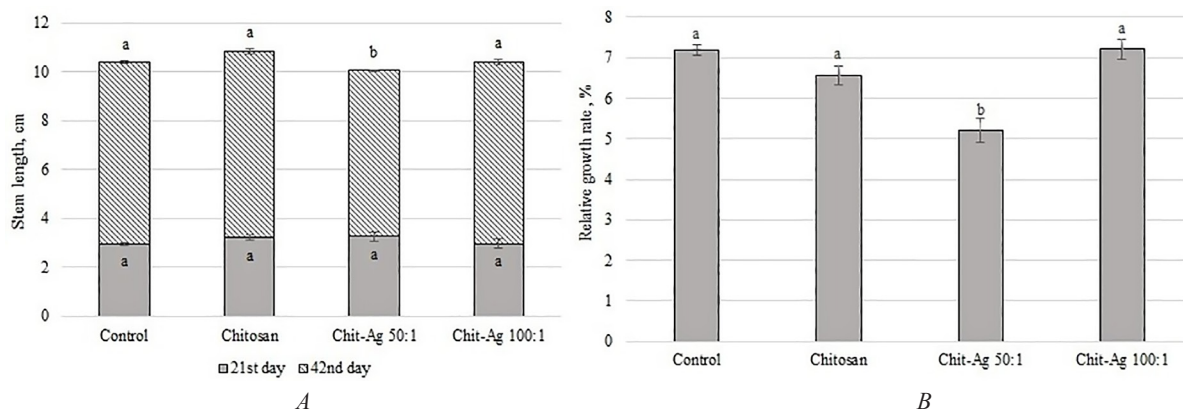


Рис. 2. Влияние нанокompозитов на основе серебросодержащего хитозана на длину стебля (A) и относительную скорость роста (B) микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Fig. 2. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on stem (A) and relative growth (B) of microclone potato plants in *in vitro* culture

Т а б л и ц а 3. Влияние нанокompозитов на основе серебросодержащего хитозана на сырую и сухую массу стебля микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Table 3. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on the wet and dry stem weight of microclone potato plants in *in vitro* culture

Вариант	Масса, мг	% к контролю	% к хитозану
Сырая масса стебля			
Контроль	133,67 ± 7,12 ^a	—	74,8
Хитозан	178,68 ± 6,06 ^b	133,7	—
Хит-Аг 50:1	163,52 ± 5,44 ^c	122,3	91,5
Хит-Аг 100:1	177,42 ± 3,21 ^b	132,7	99,3
Сухая масса стебля			
Контроль	14,12 ± 0,75 ^a	—	80,2
Хитозан	17,59 ± 0,60 ^b	124,6	—
Хит-Аг 50:1	12,35 ± 0,41 ^c	87,5	70,2
Хит-Аг 100:1	16,44 ± 0,30 ^d	116,4	93,4

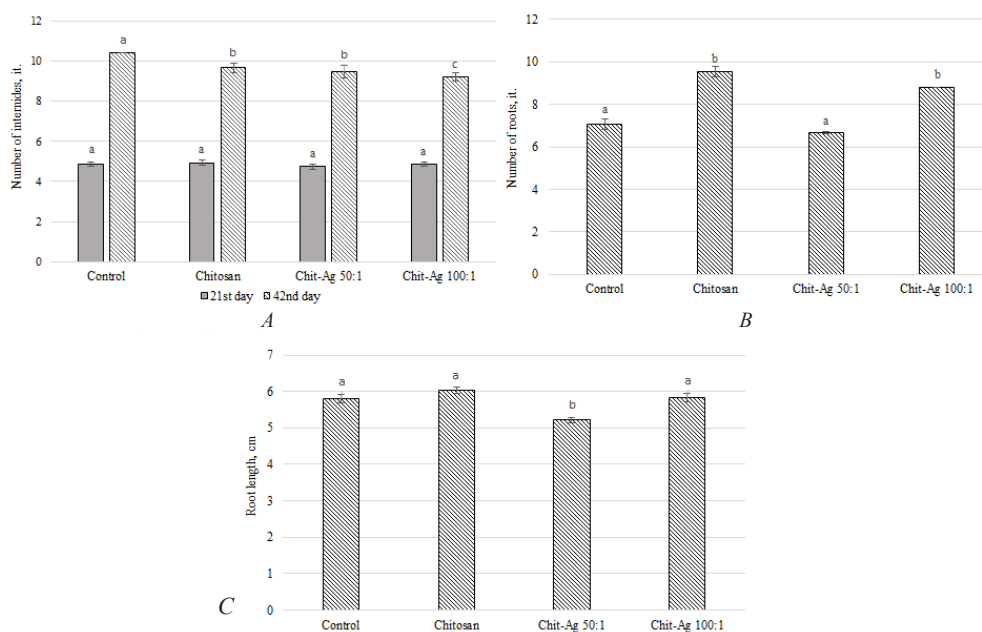


Рис. 3. Влияние нанокompозитов на основе серебросодержащего хитозана на число междоузлий (A), число корней (B) и длину корней (C) микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Fig. 3. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on the number of internodes (A), roots (B) and root length (C) of microclone potato plants in *in vitro* culture

Средняя длина корней снизилась на 10,3 % по сравнению с контролем и на 13,6 % при внесении хитозана у микроклонов картофеля, культивированных на МС-среде с добавлением НК Хит-Ag 50:1 (рис. 3, С).

Сырая масса корней увеличилась в опытных вариантах по сравнению с контролем и достоверно снизилась при добавлении хитозана (табл. 4). Внесенные в МС-среду НК на основе сереброросодержащего хитозана не оказали достоверного воздействия на накопление сухого вещества в микроклонах картофеля по сравнению с контролем, однако достоверно снизили данный показатель на 35,6 и 41,9 % по сравнению с таковым при внесении хитозана (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Влияние нанокompозитов на основе сереброросодержащего хитозана на сырую и сухую массу корней микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Table 4. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on the wet and dry root weight of microclone potato plants in *in vitro* culture

Вариант	Масса, мг	% к контролю	% к хитозану
Сырая масса корней			
Контроль	41,71 ± 0,60 ^a	–	51,1
Хитозан	81,59 ± 1,32 ^b	195,6	–
Хит-Ag 50:1	58,97 ± 5,25 ^c	141,4	72,3
Хит-Ag 100:1	50,13 ± 2,88 ^d	120,2	61,4
Сухая масса корней			
Контроль	4,81 ± 0,07 ^a	–	63,4
Хитозан	7,59 ± 0,12 ^b	157,8	–
Хит-Ag 50:1	4,89 ± 0,44 ^a	101,7	64,4
Хит-Ag 100:1	4,42 ± 0,25 ^a	91,7	58,1

Уровень содержания ФС пигментов характеризует степень сформированности фотосинтетического аппарата растений. Анализ накопления основных ФС пигментов микроклонов картофеля показал, что внесенные НК на основе сереброросодержащего хитозана в выбранных концентрациях не оказывают влияния на содержание Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов в опытных растениях как по сравнению с контролем, так и при внесении хитозана. Только при добавлении в МС-среду НК Хит-Ag 100:1 достоверно снижалось содержание Хл *a* (на 50,1 % по сравнению с контролем и на 36,7 % при внесении хитозана) (рис. 4).

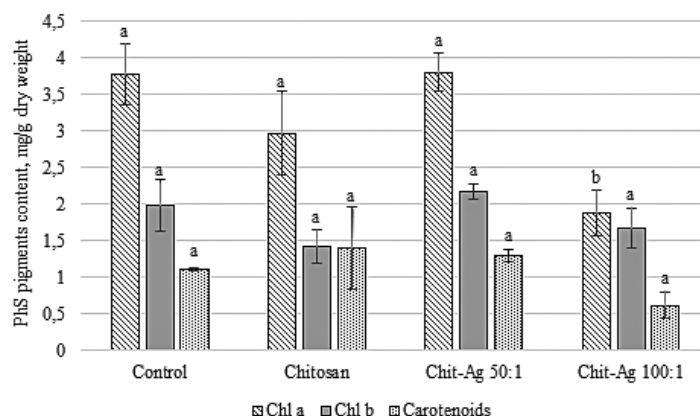


Рис. 4. Влияние нанокompозитов на основе сереброросодержащего хитозана на накопление основных фотосинтетических пигментов в микроклонах картофеля в культуре *in vitro*

Fig. 4. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on the basic photosynthetic pigment content of microclone potato plants in *in vitro* culture

Содержание перекиси водорода снижалось в опытных растениях на 23,7 и 41,8 % по сравнению с контролем, а при действии НК Хит-Ag 100:1 содержание перекиси водорода уменьшилось в микроклонах картофеля на 23,4 % по сравнению с таковым при внесении хитозана. Отсутствовали достоверные различия между воздействием Хит-Ag 50:1 и хитозана (рис. 5, А).

Внесение НК Хит-Аг 50:1 в МС-среду не влияло на содержание пролина по сравнению с контролем. В растениях, культивировавшихся на среде с добавлением Хит-Аг 100:1, уровень пролина был в 1,2 раза ниже, чем при добавлении хитозана (рис. 5, *B*).

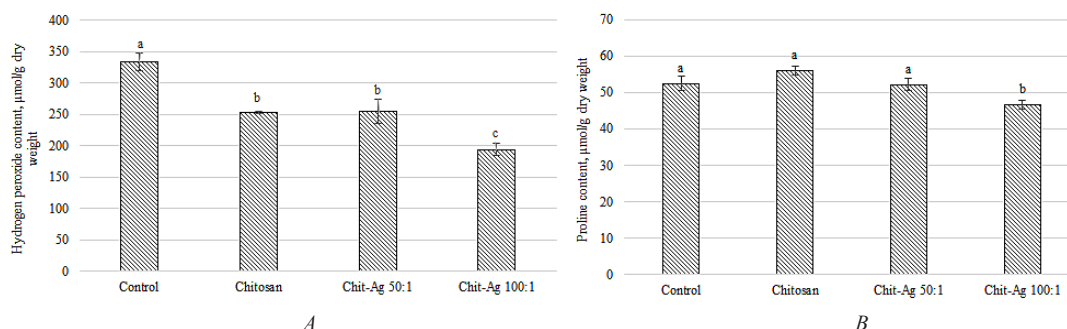


Рис. 5. Влияние нанокмпозитов на основе серебросодержащего хитозана на содержание перекиси водорода (*A*) и пролина (*B*) в микроклонах картофеля в культуре *in vitro*

Fig. 5. Influence of silver-containing chitosan-based nanocomposites on the content of hydrogen peroxide (*A*) and proline (*B*) of microclone potato plants in *in vitro* culture

Полученные нами результаты подтверждают зависимость эффекта НЧ серебра от степени сформированности микроклона. Так, при помещении свежеполученных микропобегов картофеля непосредственно на питательную среду, содержащую НК на основе серебросодержащего хитозана, выявлен сильный негативный эффект на ростовые процессы. Фитотоксическое действие исследуемых НК может быть связано с высвобождением ионов серебра Ag^+ , обладающих сильным токсичным эффектом.

Растения на ранних этапах развития более восприимчивы к действию НЧ. Так, показано, что внекорневая обработка саженцев огурца *Cucumis sativus* L. НЧ Ag оказала сильный отрицательный эффект на развитие. НЧ вызывали дегенерацию клеток коры корня и распад эндодермы [12]. У растений ряски *Spirodela polyrhiza* в ответ на обработку НЧ Ag снижалась общая биомасса и наблюдалось отмирание корней [24]. Присутствие в среде культивирования НЧ Ag в концентрации 0,3 мг/мл ингибировало удлинение корней и рост листьев растений *Arabidopsis thaliana* [25]. Добавление НЧ Ag в концентрациях 100 и 500 мг/л в раствор для гидропоники приводило к снижению биомассы цукини *Cucurbita pepo* [26].

Предпосевная обработка семян растворами НЧ Ag также имела негативный эффект на развитие растений, хоть и в меньшей степени, что может быть связано с защитной ролью семенных покровов. Инкрустация семян проса *Pennisetum glaucum* НЧ Ag в концентрации 2–6 мМ оказала ингибирующий эффект на удлинение корней и стебля, а также на накопление биомассы [13].

Однако при предпосевной обработке семян кресс-салата *Lepidium sativum* L. НЧ Ag, стабилизированные биополимером арабиногалактаном, в концентрации 2,34–9,38 мкг/мл достоверно увеличивали энергию прорастания, всхожесть, длину гипокотеля. Такой положительный эффект на ростовые процессы может быть связан с улучшенным поглощением воды и минеральных веществ за счет формирования многочисленных проводящих элементов корня [27]. В исследовании, проведенном на эксплантах картофеля *Solanum tuberosum*, показано, что модифицирование питательной среды НЧ Ag (5, 10, 15 и 20 мг/л) ингибирует удлинение побегов при усилении развития корневой системы [28]. Одной из причин отсутствия токсического эффекта НЧ Ag является достаточно медленное высвобождение ионов Ag^+ из их структуры, что позволяет развивающемуся растению адаптироваться к условиям среды. К тому же НЧ Ag могут участвовать в активации синтеза ауксинов в меристематических тканях, стимулируя ростовые процессы [29].

В нашем исследовании при использовании 3-недельных микроклонов с развитой корневой системой НК Хит-Аг 50:1 стимулировали накопление биомассы, замедляя при этом дальнейший рост стебля.

Количественное содержание и качественный состав пигментов, изменение их соотношения в листьях – это важные и чувствительные показатели физиологического состояния растений

и их фотосинтетического аппарата, направленности адаптивных реакций при воздействии стрессовых условий. Анализ содержания основных ФС пигментов микроклонов картофеля после 3 недель культивирования на питательной среде с добавлением НК показал отсутствие достоверных изменений. Только НК Хит-Аг 100:1 снижал содержание Хл а, что может свидетельствовать о возможной перестройке ФС аппарата.

Согласно литературным данным, НЧ стимулируют выработку АФК и значительно усиливают образование малонового диальдегида и перекиси водорода, что запускает синтез низкомолекулярных антиоксидантов – пролина и фенольных соединений [12, 13]. Однако в нашем исследовании уровень пролина в растениях при замене питательной среды на модифицированную стабилизированными хитозаном НЧ Аг был на уровне или ниже контрольных значений, а низкий уровень содержания перекиси водорода может свидетельствовать об отсутствии стрессового воздействия выбранной концентрации нанокompозитной смеси. Обнаруженный нами эффект может быть связан со структурой НК: неорганическое ядро Ag^0 , стабилизированное полимерной оболочкой полисахарида хитозана (core-shell-структура), может обеспечивать снижение токсичности НЧ Аг для микроклонов картофеля. Увеличение массового содержания хитозана в составе НК способствует снижению токсического эффекта за счет формирования плотной стабилизирующей ядро оболочки, замедляющей процесс образования ионов серебра Ag^+ .

Вывод. НК на основе серебросодержащего хитозана в разведениях 1:500 и 1:1000 оказывают тормозящий эффект на рост и развитие микроклонов, культивируемых непосредственно на модифицированных питательных средах: уменьшаются длина стебля, число междоузлий, накопление биомассы. Сильный отрицательный эффект исследуемые НК оказывают на развитие корневой системы микропобегов. Ингибирующее воздействие НК на основе серебросодержащего хитозана может быть связано с токсичным действием НЧ серебра, способных проникать в клетку, служить источником ионов серебра Ag^+ и вызывать окислительный стресс.

При изменении условий проведения эксперимента и использовании микроклонов с развитой корневой системой НК Хит-Аг 50:1 и Хит-Аг 100:1 в разведении 1:500 оказали положительный эффект на накопление биомассы, при этом Хит-Аг 50:1 замедлял дальнейший рост стебля и корневой системы. Результаты анализа накопления ФС пигментов, содержания перекиси водорода и пролина свидетельствуют об отсутствии стрессового воздействия у исследуемых серебросодержащих НК. Микроклоны с развитой корневой системой менее восприимчивы к действию НК Хит-Аг и способны к дальнейшему развитию.

Благодарности. Работа выполнена при частичной поддержке БРФФИ, грант Б21В-002.

Acknowledgements. This work was supported in part by the BRFFR, grant B21V-002.

Список использованных источников

1. Камская, В. Е. Хитозан: структура, свойства и использование / В. Е. Камская // Науч. обозрение. Биол. науки. – 2016. – № 6. – С. 36–42.
2. Тютюрев, С. Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам / С. Л. Тютюрев // Вестн. защиты растений. – 2015. – № 1 (83). – С. 3–13.
3. Evaluation of quaternary ammonium chitosan derivatives differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antifungal activity / L. Wei [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 129. – P. 1127–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.099>
4. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты / В. П. Варламов [и др.] // Успехи биол. химии. – 2020. – Т. 60. – С. 317–368.
5. Павлова, Н. А. Биологическая эффективность некоторых индукторов болезнестойчивости в системе оздоровления и защиты картофеля от болезней в оригинальном семеноводстве / Н. А. Павлова // Вестн. защиты растений. – 2015. – № 3 (85). – С. 21–26.
6. Васюкова, Н. И. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота / Н. И. Васюкова, О. Л. Озерцовская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 4. – С. 405–411.
7. Баданова, Е. Г. Препараты на основе хитозана для сельского хозяйства / Е. Г. Баданова, И. М. Давлетбаев, А. С. Сироткин // Вестн. технол. ун-та. – 2016. – Т. 19, № 16. – С. 89–95.
8. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture / K. L. Nge [et al.] // Plant Sci. – 2006. – Vol. 170, N 6. – P. 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.006>
9. Asghari-Zakaria, R. Effect of *in vitro* chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. // R. Asghari-Zakaria, B. Maleki-Zanjani, E. Sedghi // Plant Soil Environment. – 2009. – Vol. 55, N 6. – P. 252–256. <https://doi.org/10.17221/1018-pse>

10. Chitosan in plant protection / A. El Hadrami [et al.] // *Marine Drugs*. – 2010. – Vol. 8, N 4. – P. 968–987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>
11. Chirkov, S. N. The antiviral activity of chitosan (review) / S. N. Chirkov // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2002. – Vol. 38, N 1. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1023/A:1013206517442>
12. Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNPs) in *Cucumis sativus* L. / A. Tripathi [et al.] // *Plant Gene*. – 2017. – Vol. 11, Pt. B. – P. 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.005>
13. Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) seedlings exposed to silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNPs) / I. Khan [et al.] // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2019. – Vol. 16, N 13. – Art. 2261. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132261>
14. Role of nanoparticles in plants / M. H. Siddiqui [et al.] // *Nanotechnology and Plant Sciences* / eds. : M. Siddiqui, M. Al-Whaibi, F. Mohammad. – Cham, 2015. – P. 19–35.
15. Препарат «Зерокс» на основе химически модифицированного высокодисперсного серебра как элемент эффективной борьбы с бактериальными и грибными эпифитотиями сельскохозяйственно значимых растений / П. М. Жеребин [и др.] // *Защита картофеля*. – 2014. – № 2. – С. 43–45.
16. Дыкман, Л. А. Взаимодействие растений с наночастицами благородных металлов / Л. А. Дыкман, С. Ю. Щёголев // *Сельскохозяйств. биология*. – 2017. – Т. 52, № 1. – С. 13–24.
17. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
18. Шлык, А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык // *Биохимические методы в физиологии растений* : сб. ст. / отв. ред. О. А. Павлинова. – М., 1971. – С. 154–170.
19. Extracellular H₂O₂ induced by Oligagalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants / D. Bellincampi [et al.] // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 122, N 4. – P. 1379–1385. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
20. Bates, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L. S. Bates, R. P. Waldren, J. D. Teare // *Plant Soil*. – 1973. – Vol. 39, N 1. – P. 205–207. <https://doi.org/10.1007/bf00018060>
21. Макеева, И. Ю. Физиолого-биохимические ответы *Solanum tuberosum* на действие кофейной кислоты : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05 / И. Ю. Макеева. – Орел, 2017. – 122 л.
22. Влияние нанокомпозитов на основе серебросодержащего хитозана на развитие микроклонов растений картофеля / Н. А. Еловская [и др.] // *Проблемы оценки, мониторинга и сохранения биоразнообразия* : сб. материалов IV Респ. науч.-практ. экол. конф., Брест, 25 нояб. 2021 г. / Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина ; редкол. : Н. М. Матусевич, Н. В. Шкуратова, М. В. Левковская. – Брест, 2021. – С. 121–125.
23. Эрастова, М. А. Изучение процесса ризогенеза растений картофеля *in vitro* / М. А. Эрастова, Ю. Н. Федорова // *Вестн. Алтайск. гос. аграр. ун-та*. – 2009. – № 5 (55). – С. 21–23.
24. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrrhiza* / H. Sh. Jiang [et al.] // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2012. – Vol. 31, N 8. – P. 1880–1886. <https://doi.org/10.1002/etc.1899>
25. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants / A. Sosan [et al.] // *Plant J.* – 2016. – Vol. 85, N 2. – P. 245–257. <https://doi.org/10.1111/tpj.13105>
26. Stampoulis, D. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants / D. Stampoulis, S. K. Sinha, J. C. White // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 43, N 24. – P. 9473–9479. <https://doi.org/10.1021/es901695c>
27. О биологической активности стабилизированных арабиногалактаном наночастиц серебра в отношении кресс-салата *Lepidium sativum* L. Curled и фитопатогенного микромицета *Fusarium sambucinum* / О. И. Гудкова [и др.] // *Сельскохозяйств. биология*. – 2021. – Т. 56, № 3. – С. 500–510.
28. Бугара, И. А. Особенности влияния композиций наносеребра на процессы морфогенеза в культуре картофеля *in vitro* / И. А. Бугара, С. Н. Жалдак, Р. В. Трускавецкий // *Sci. Time*. – 2015. – № 11 (23). – С. 87–91.
29. Almutairi, Z. M. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants / Z. M. Almutairi, A. A. Alharbi // *J. Adv. Agricult.* – 2015. – Vol. 4, N 1. – P. 280–285. <https://doi.org/10.24297/jaa.v4i1.4295>

References

1. Kamskaya V. E. *Chitosan: structure, properties and using*. *Nauchnoe obozrenie. Biologicheskie nauki* [Scientific review. Biological sciences], 2016, no. 6, pp. 36–42 (in Russian).
2. Tyuterev S. L. Ecologically safe inducers of plant resistance to diseases and physiological stresses. *Vestnik zashchity rastenii = Plant protection news*, 2015, no. 1 (83), pp. 3–13 (in Russian).
3. Wei L., Mi Y., Zhang J., Li Q., Dong F., Guo Z. Evaluation of quaternary ammonium chitosan derivatives differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, vol. 129, pp. 1127–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.099>
4. Varlamov V. P., Il'ina A. V., Shagdarova B. C., Lun'kov A. P., Mysyakina I. S. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental and applied aspects. *Uspekhi biologicheskoi khimii* [Advances in biological chemistry], 2020, vol. 60, pp. 317–368 (in Russian).
5. Pavlova N. A. Biological efficiency of some disease resistance inducers in the system of rehabilitation and protection of potato against diseases in original seedage. *Vestnik zashchity rastenii = Plant protection news*, 2015, no. 3 (85), pp. 21–26 (in Russian).
6. Vasyukova N. I., Ozeretskovskaya O. L. Induced plant resistance and salicylic acid: a review. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology], 2007, vol. 43, no. 4, pp. 405–411 (in Russian).

7. Badanova E. G., Davletbaev I. M., Sirotkin A. S. Preparations based on chitosan for agriculture. *Vestnik Tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Technological University], 2016, vol. 19, no. 16, pp. 89–95 (in Russian).
8. Nge K. L., Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W. F. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, 2006, vol. 170, no. 6, pp. 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.006>
9. Asghari-Zakaria R., Maleki-Zanjani B., Sedghi E. Effect of *in vitro* chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. *Plant Soil and Environment*, 2009, vol. 55, no. 6, pp. 252–256. <https://doi.org/10.17221/1018-pse>
10. El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F. Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 2010, vol. 8, no. 4, pp. 968–987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>
11. Chirkov S. N. The antiviral activity of chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002, vol. 38, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1023/A:1013206517442>
12. Tripathi A., Liu S., Singh P. K., Kumar N., Pandey A. Ch., Tripathi D. K., Chauhan D. K., Sahi Sh. Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNPs) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene*, 2017, vol. 11, pt. B, pp. 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.005>
13. Khan I., Raza M. A., Bin Khalid M. H., Awan S. A., Raja N. I., Zhang X., Min S., Wu B. Ch., Hassan M. J., Huang L. Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) seedlings exposed to silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNPs). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, vol. 16, no. 13, art. 2261. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132261>
14. Siddiqui M. H., Al-Wahaibi M. H., Firoz M., Al-Khaishany M. Y. Role of nanoparticles in plants. *Nanotechnology in Plant Science*. Cham, 2015, pp. 19–35.
15. Zherebin P. M., Ignatov A. N., Elanskii S. N., Pobedinskaya M. A., Lisichkin G. V., Denisov A. N., Krutyakov Yu. A. “Zeroks”-silver-based preparate for an effective control of bacterial and fungal epidemic diseases of agricultural plants. *Zashchita kartofelya* [Potato protection], 2014, no. 2, pp. 43–45 (in Russian).
16. Dykman L. A., Shchegolev S. Yu. *Interactions of plants with noble metal nanoparticles (review)*. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2017, vol. 52, no. 1, pp. 13–24 (in Russian).
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, vol. 15, no. 3, pp. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
18. Shlyk A. A. Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaf extracts. *Biochemical methods in plant physiology: collection of articles*. Moscow, 1971, pp. 154–170 (in Russian).
19. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by Oligagalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *roIB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 2000, vol. 122, no. 4, pp. 1379–1385. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
20. Bates L. S., Waldren R. P., Teare J. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 1973, vol. 39, no. 1, pp. 205–207. <https://doi.org/10.1007/bf00018060>
21. Makeeva I. Yu. *Physiological and biochemical responses of Solanum tuberosum to the action of caffeic acid*. Ph. D. diss. Orel, 2017. 122 p. (in Russian).
22. Elovskaya N. A., Kalatskaya Zh. N., Nedved' E. L., Gilevskaya K. S. The influence of silver-containing chitosan-based nanoparticles on the development of potato microclones. *Problemy otsenki, monitoringa i sokhraneniya bioraznoobraziya: sbornik materialov IV Respublikanskoi nauchno-prakticheskoi ekologicheskoi konferentsii (Brest, 25 noyabrya 2021)* [Problems of assessment, monitoring and conservation of biodiversity: collection of materials of the IV Republican scientific and practical ecological conference (Brest, November 25, 2021)]. Brest, 2021, pp. 121–125 (in Russian).
23. Erastova M. A., Fedorova Yu. N. Study of rhizogenesis of potato mini-plants *in vitro*. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of Altai State Agricultural University], 2009, no. 5 (55), pp. 21–23 (in Russian).
24. Jiang H. Sh., Li M., Chang F. Y., Li W., Yin L. Y. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, vol. 31, no. 8, pp. 1880–1886. <https://doi.org/10.1002/etc.1899>
25. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., Tsiurkina K., Anderson D., Sokolik A., Colbeck I., Demidchik V. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal*, 2016, vol. 85, no. 2, pp. 245–257. <https://doi.org/10.1111/tpj.13105>
26. Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science and Technology*, 2009, vol. 43, no. 24, pp. 9473–9479. <https://doi.org/10.1021/es901695c>
27. Gudkova O. I., Bobkova N. V., Fel'dman N. B., Lufarov A. N., Gromovykh T. I., Samylina I. A., Ananyan M. A., Lutsenko S. V. Study of the biological activity of arabinogalactan-stabilized silver nanoparticles towards watercress *Lepidium sativum* L. Curled and plant pathogenic micromycete *Fusarium sambucinum*. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2021, vol. 56, no. 3, pp. 500–510 (in Russian).
28. Bugara I. A., Zhaldak S. N., Truskavetskii R. V. Features of the influence of nanosilver compositions on the processes of morphogenesis in potato culture *in vitro*. *Science Time*, 2015, no. 11 (23), pp. 87–91 (in Russian).
29. Almutairi Z. M., Alharbi A. A. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *Journal of Advances in Agriculture*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 280–285. <https://doi.org/10.24297/jaa.v4i1.4295>

Информация об авторах

Еловская Нинель Анатольевна – аспирант. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yalousskaya92@mail.ru

Калацкая Жанна Николаевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kalatskayaj@mail.ru

Ламан Николай Афанасьевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Гилевская Ксения Сергеевна – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 2200141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: k_hilevskay@mail.ru

Красковский Александр Николаевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 2200141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleks.kraskovsky@gmail.com

Куликовская Виктория Игоревна – канд. хим. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 2200141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulikousskaya@gmail.com

Information about the authors

Ninel A. Yalousskaya – Postgraduate student. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yalousskaya92@mail.ru

Joanna N. Kalatskaja – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kalatskayaj@mail.ru

Nikolai A. Laman – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Kseniya S. Hilevskaya – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k_hilevskay@mail.ru

Aliaksandr N. Kraskouski – Ph. D. (Chem.), Senior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleks.kraskovsky@gmail.com

Viktoryia I. Kulikousskaya – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulikousskaya@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.355: 582.663:58.032.3

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-27-37>

Поступила в редакцию 25.08.2022

Received 25.08.2022

Т. Н. Виск, И. Н. Доманская, А. В. Мартысюк, Л. Ф. Кабашникова*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ХАРАКТЕРИСТИКА ФОНДА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ
В ПРОРОСТКАХ РАЗНЫХ СОРТОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ
ПРИ ПОРАЖЕНИИ ГРИБОМ *BIPOLARIS SOROKINIANA* (SACC.) SHOEM.**

Аннотация. Объектами исследований являлись первые листья зеленых проростков ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сортов белорусской селекции – пленчатых (Магутны, Рейдер) и голозерного (Адамант). Проростки разного возраста (3-, 5- и 10-дневные) заражали спорами гриба *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. – возбудителя гельминтоспориоза и через 2 дня после заражения анализировали. Обнаружены сортовые и онтогенетические различия между сортами ячменя по морфологическим параметрам первого листа, содержанию фотосинтетических пигментов (хлорофиллов (Хл) и каротиноидов) и соотношению спектральных форм Хл на стадии проростков. Установлены разные амплитуды изменения фонда фотосинтетических пигментов у сортов ячменя при гельминтоспориозе на разных этапах развития первого листа.

Ключевые слова: проростки, хлорофилл, каротиноиды, флуоресценция хлорофилла, сорта, яровой ячмень, *Hordeum vulgare* L., гельминтоспориоз, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.

Для цитирования: Характеристика фонда фотосинтетических пигментов в проростках разных сортов ярового ячменя при поражении грибом *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. / Т. Н. Виск [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 27–37. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-27-37>

Tatsiana N. Viks, Irina N. Domanskaya, Hanna V. Martysiuk, Liudmila F. Kabashnikova*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***FEATURE OF THE PHOTOSYNTHETIC PIGMENT FUND IN SEEDLINGS OF DIFFERENT VARIETIES OF SPRING BARLEY WHEN AFFECTED BY THE FUNGUS *BIPOLARIS SOROKINIANA* (SACC.) SHOEM.**

Abstract. The objects of research were the first leaves of green seedlings of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) of the varieties of Belarusian breeding – filmy (Magutny, Raider) and naked (Adamant). Seedlings of different age (3, 5, and 10 days old) were infected with spores of the fungus *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. – a causative agent of helminthosporiosis, and were analyzed 2 days after infection. Varietal and ontogenetic differences between barley cultivars in morphological parameters of the first leaves, the content of photosynthetic pigments (chlorophylls (Chl) and carotenoids), and the ratio of spectral forms of Chl at the seedling stage were found. Different amplitudes of changes in the photosynthetic pigment content between the barley varieties with helminthosporiosis at different stages of development of the first leaf were established.

Keywords: seedling, chlorophyll, carotenoids, chlorophyll fluorescence, variety, spring barley, *Hordeum vulgare* L., helminthosporiosis, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.

For citation: Viks T. N., Domanskaya I. N., Martysiuk H. V., Kabashnikova L. F. Feature of the photosynthetic pigment fund in seedlings of different varieties of spring barley when affected by the fungus *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 27–37 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-27-37>

Введение. Уровень урожая и его качество во многом зависят не только от системы агротехники и генетического потенциала конкретного сорта, но и от факторов, которые могут нанести вред растениям или снизить их продуктивность. К таким факторам относятся грибковые заболевания зерновых культур, которые могут вызывать снижение урожайности на 15–20 %, а иногда даже на 60 % [1].

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.), одна из старейших возделываемых культур, в настоящее время является четвертой по значимости зерновой культурой во всем мире и важнейшей зерновой культурой в Беларуси. Серьезной проблемой при выращивании ячменя является вызываемая грибом *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoem. (синоним – *Helminthosporium sativum*) темно-

бурая пятнистость (гельминтоспориоз), которая вызывает снижение урожайности, а также качества зерна. Показано, что для развития этого возбудителя наиболее благоприятны высокая температура и повышенная относительная влажность. Таким образом, данное заболевание рассматривается как возрастающая угроза возделыванию ячменя в условиях изменяющегося климата [2].

Установлено, что гриб *Bipolaris sorokiniana* активнее поражает ослабленные растения, чем и объясняется более высокая вредоносность болезни в неблагоприятных климатических условиях. Патоген также может поражать листья, вызывая образование темных или темно-серых пятен, слегка вытянутых вдоль центральной жилки. Во влажную погоду, при влажности свыше 90 %, поражается колос. Гриб проникает в перикарпий и эндосперм и вызывает побурение зоны зародыша. В результате зерно остается недоразвитым и шуплым. Поскольку корневая система ячменя мочковатая, роль узловых (вторичных) корней в питании растений очень велика. В период засухи или недостатка влаги они формируются слабо или отсутствуют, что ослабляет растения. С другой стороны, при переувлажнении корни развиваются также слабо, продвижение их вглубь тормозится, они располагаются в основном в верхнем слое. Поэтому при, казалось бы, сравнительно одинаковой степени поражения растений ячменя и пшеницы болезнью вредоносность корневой гнили первой культуры всегда выше [3].

Сорт в современной земледелии является одним из основных факторов получения стабильных и высоких урожаев любой сельскохозяйственной культуры. Мировая практика и результаты научно-исследовательских работ свидетельствуют о том, что в общем повышении урожайности зерновых культур на долю сорта приходится от 25 до 50 %. За счет возделывания нового районированного сорта без дополнительных затрат получают прибавки урожая зерна на 10–15 % и более [4]. С учетом расширения ассортимента сортов ярового ячменя, а также увеличения климатических и производственных рисков оценка устойчивости к болезням и пластичности сортов ярового ячменя приобретает важнейшее значение для агропроизводства [5].

В ходе эволюции у растений выработались защитные системы против широкого круга патогенов [6] с мембранными рецепторами, распознающими определенные молекулярные мотивы патогена, называемые патоген-ассоциированными (или микроб-ассоциированными [7, 8] молекулярными паттернами (РАМР/МАМР)), которые рассматриваются как центральные элементы взаимодействия растительной клетки и патогена [9]. Это узнавание быстро инициирует последующие события, в том числе такие, как активация сигнальных путей, перепрограммирование транскрипции и защитный ответ [10]. Кроме того, важно отметить взаимодействие между сигнальными путями биотического и абиотического происхождения, суточными ритмами, фото-периодической и гормональной системами растений. В результате могут возникать перекрестные сигналы, приводящие как к синергическим, так и к антагонистическим реакциям, развитие которых сложно предсказать.

Изучение механизмов защитных реакций растений при патогенезе неизбежно приводит к необходимости определения роли хлоропластов как сенсоров, тонко реагирующих на внешние раздражители. Особая роль пластид в иммунной системе связана также с их участием в биосинтезе нескольких типов ключевых защитных молекул, в том числе гормонов (салицилат, жасмонат, абсцизовая кислота) и вторичных мессенджеров, таких как кальций, активные формы кислорода [11], которые активируют митоген-активируемые протеинкиназы [12]. Исследования, посвященные роли пластид в иммунной системе, в основном сосредоточены на проблеме взаимодействия хлоропластов с про- и антиоксидантными системами растений [13].

Хорошо известно, что проростки злаков разного возраста характеризуются различной скоростью фотосинтетических реакций. Фотосинтетическая активность снижается по мере старения листа [14,15], что обусловлено разрушением электрон-транспортной цепи в хлоропластах и инактивацией ферментов цикла Кальвина. Поэтому можно предположить, что разновозрастные проростки могут обладать вариабельной устойчивостью в стрессовых условиях, в том числе при патологическом процессе. В ходе настоящей работы использовали проростки ярового ячменя *Hordeum vulgare* L., содержащие хлоропласты, обладающие разным количеством фотосинтетических пигментов и характеризующиеся разной фотосинтетической активностью. Патогенный

гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (B. S.) применялся как возбудитель, вызывающий темно-бурую пятнистость [16]; заражение осуществлялось на свету. Следует также отметить, что структурно-функциональное состояние хлоропластов разных сортов зерновых культур, отличающихся по продуктивности и устойчивости к разным стрессовым факторам внешней среды, существенно различается как на стадии проростков, так и в период вегетации [17]. В связи с этим возникает необходимость в выяснении характера устойчивости хлоропластов разных сортов ярового ячменя при патологическом процессе.

Целью данной работы являлась характеристика фонда фотосинтетических пигментов на нескольких стадиях развития проростков у разных сортов ярового ячменя при инфицировании грибным патогеном *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись первые листья зеленых проростков ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сортов белорусской селекции – пленчатых (Магутны, Рейдер) и голозерного (Адамант). Зеленые проростки выращивали на водопроводной воде в климатической камере на полихроматическом белом свету ($120 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) с фотопериодом 16 ч свет/8 ч темноты при температуре 22 °С. Интактные зеленые проростки ячменя разного возраста (3-, 5- и 10-дневные) обрабатывали суспензией, содержащей споры гриба *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (10^6 спор/мл) – возбудителя гельминтоспориоза, и анализировали через 48 ч после заражения. Отрицательным контролем служили растения, обработанные дистиллированной водой.

Для экстракции пигментов использовали высечки из мезофилла листа. Экстракцию хлорофиллов (Хл) и каротиноидов производили 99,5 %-ным ацетоном в трехкратной биологической повторности. Количество пигментов в экстрактах определяли по спектрам поглощения на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Содержание пигментов рассчитывали по формулам, предложенным в работе [18]:

$$C_a = 9,784E_{662} - 0,99E_{644},$$

$$C_b = 21,426E_{644} - 4,65E_{662},$$

$$C_{car} = 4,695E_{440,5} - 0,268(C_a + C_b),$$

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

Содержание фотосинтетических пигментов рассчитывали на 1 г сырой массы листа.

Содержание каротиноидов определяли в ацетоновых экстрактах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа Shimadzu LC20 Prominence (Япония) и колонки Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 3×150 мм) (Macherey Nagel, Германия) [19]. Пигменты регистрировали спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей SPD-M20A Prominence (Shimadzu, Япония) по спектрам поглощения в диапазоне 200–700 нм.

Спектры флуоресценции листьев ячменя регистрировали при комнатной температуре на спектрофлуориметре Solar LSF 222 (Минск, Беларусь) с использованием приставки для регистрации флуоресценции в твердых объектах. Количественную оценку формы спектров осуществляли по соотношению интенсивности двух полос в спектре испускания – при F_{685} и F_{735} нм ($\omega = F_{735}/F_{685}$) в одинаковых участках первых листьев [20, 21]. Число повторностей – от 7 до 10.

Для статистической обработки данных использовали стандартные пакеты программ Excel 2016, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [22]. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Различия по сравнению с контролем считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Проведенный анализ параметров роста первого листа позволил установить морфологические различия и разную скорость развития проростков изученных сортов ячменя при выращивании в лабораторных условиях на свету (рис. 1). У проростков сорта Адамант наблюдали ускоренный выход первого листа из колеоптиля и появление второго листа уже в 5-дневном возрасте, в то время как размеры проростков у сортов Магутны и Рейдер были меньше. Поскольку все изученные сорта примерно одинаковы по срокам созревания, ускоренное

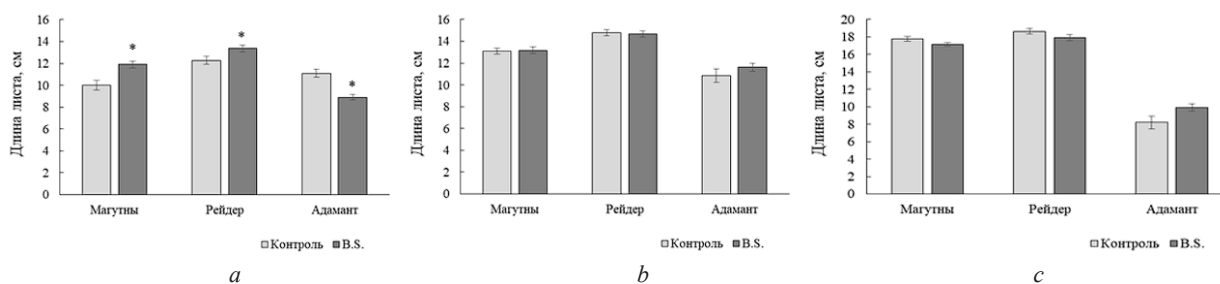


Рис. 1. Сортовые особенности изменения длины первого листа у здоровых и инфицированных *Bipolaris sorokiniana* (B. S.) проростков ячменя 5- (a), 7- (b) и 12-дневного (c) возраста

Fig. 1. Varietal features of changes in the length of the first leaf in healthy and *Bipolaris sorokiniana* (B. S.) infected barley seedlings of different 5- (a), 7- (b) and 12-day-old (c) seedlings age

развитие проростков голозерного сорта Адамант можно объяснить отсутствием пленчатости зерна, что ускоряет поступление воды в зерновку. При грибном инфицировании в 5-дневном возрасте обнаружено ускорение роста первого листа у пленчатых сортов Магутны и Рейдер, тогда как у сорта Адамант наблюдали достоверное снижение его размеров.

Пигменты пластид являются компонентами фотосинтетического аппарата, структура которого изменяется в онтогенезе растений и при воздействии внешних факторов. Поэтому при изучении механизмов повреждающего действия неблагоприятных факторов исследователи часто обращают внимание на количественное изменение пигментов. В литературе хорошо документировано снижение количества фотосинтетических пигментов в растениях разных культур при грибном поражении [23].

Проведенный анализ содержания фотосинтетических пигментов (Хл и каротиноидов) в ацетоновых экстрактах из первых листьев ячменя выявил сортовые различия как по абсолютным величинам, так и по характеру их изменения в процессе развития здоровых проростков. Обнаружено, что наиболее высокими пигментными показателями отличается сорт Рейдер, у которого содержание Хл и каротиноидов в первом листе по сравнению с их содержанием у сортов Магутны и Адамант оказалось максимальным уже в 5-дневном возрасте и практически не изменялось до 12-дневного возраста. Минимальное количество пигментов отмечено в 5-дневных проростках сорта Магутны, хотя в процессе развития их количество довольно быстро возрастало и к 12-дневному возрасту этот показатель уже был сопоставим с таковым у других сортов. У голозерного сорта Адамант максимальное количество пигментов накапливалось в 7-дневных проростках и оставалось относительно постоянным до 12-дневного возраста.

При этом устойчивость пигментного фонда к грибной инфекции также существенно различалась у разных сортов ячменя и зависела от возраста проростков. Так, у сорта Адамант содержание Хл (a + b) и каротиноидов в 5-дневных инфицированных листьях снижалось наиболее значительно – на 36,1 и 46,5 % соответственно, тогда как у сорта Рейдер снижение количества Хл и каротиноидов составило только 18–23 %, а у сорта Магутны содержание Хл практически не изменялось на фоне увеличения содержания каротиноидов на 54,6 % (рис. 2). С увеличением возраста первого листа устойчивость пигментного аппарата к грибному патогену у сортов Рейдер и Адамант увеличивалась, достигая максимума к 7-дневному возрасту, и практически не изменялась к 12-дневному возрасту. Ранее в наших работах [24] было показано, что наиболее устойчивыми к стрессовым воздействиям, таким как повышенная температура и обезвоживание, являются проростки ячменя 7-дневного возраста с хорошо сформированными хлоропластами, тогда как молодые и стареющие проростки наиболее чувствительны к неблагоприятным воздействиям внешней среды. Полученные нами результаты позволяют считать, что такие же тенденции наблюдаются и в условиях биотического стресса, вызванного грибной инфекцией, поскольку молодые проростки ячменя с незрелыми хлоропластами оказались более чувствительны к инфицированию возбудителем гельминтоспориоза, чем более зрелые.

Основным механизмом подавления биосинтеза Хл и каротиноидов при грибном заражении, по данным [25], является ингибирование ключевых ферментов их биосинтеза – Mg-хеталазы H

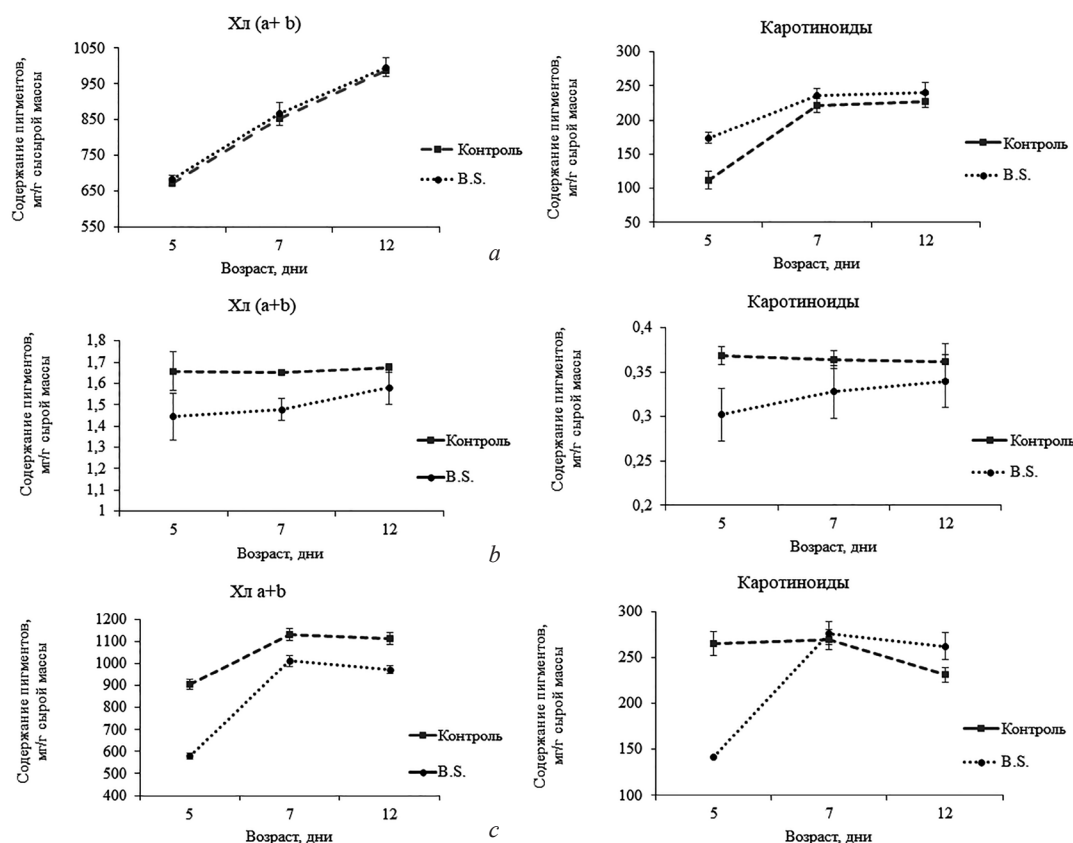


Рис. 2. Сортвые особенности изменения содержания Хл (a + b) и каротиноидов в здоровых и инфицированных *Bipolaris sorokiniana* (B. S.) проростках ячменя сортов Магутны (a), Рейдер (b) и Адамант (c) разного возраста
 Fig. 2. Varietal features of changes in the content of Chl (a + b) and carotenoids in healthy and *Bipolaris sorokiniana* (B. S.) infected barley seedlings Mahutny (a), Raider (b) and Adamant (c) of different age

и фитоендесатуразы соответственно, что ведет к более быстрому появлению симптомов гиперчувствительной реакции при заражении пшеницы гембиотрофным грибом *Zyzo-septoria tritici*. Кроме того, в работе [26] в ткани листа риса через 3 дня после заражения грибным возбудителем *Rhizoctonia solani* выявлена структурная дезинтеграция мембраны хлоропластов (организация гран, тилакоидов и стромы), что также может приводить к снижению содержания фотосинтетических пигментов.

Желтые пигменты, каротины и ксантофиллы, синтезируются в оболочке пластид [27]. Каротиноиды входят в состав светособирающих комплексов фотосинтетических мембран хлоропластов и передают энергию электронного возбуждения на молекулы Хл. Эти пигменты выполняют также фотопротекторную функцию как тушители триплетного состояния Хл и синглетного кислорода [28]. При повышенной освещенности и температуре наблюдается накопление молекул зеаксантина в результате деэпоксидации виолаксантина при функционировании ксантофиллового цикла, что способствует большей стабильности тилакоидных мембран, препятствует резкому увеличению их проницаемости, защищает фотосистемы. В работе [29] было показано, что уровень деэпоксидации виолаксантина коррелирует с устойчивостью аппарата фотосинтеза.

Методом ВЭЖХ был определен количественный и качественный состав каротиноидов в проростках ячменя разных сортов (табл. 1). В 5-дневных здоровых проростках пленчатых сортов Магутны и Рейдер содержание всех изученных форм каротиноидов, за исключением β-каротина, оказалось ниже, чем у голозерного сорта Адамант. Однако к 7-дневному возрасту эти показатели у сортов Рейдер и Адамант были сопоставимы в абсолютных величинах, хотя и существенно снизились по сравнению с таковыми у более молодых проростков. В 7-дневных проростках сорта Магутны наблюдалось некоторое увеличение по сравнению с более молодыми проростками

Т а б л и ц а 1. Изменение содержания каротиноидов (мкг/г сырой массы), измеренное методом ВЭЖХ, в здоровых и инфицированных *Bipolaris sorokiniana* (B. S.) листьях проростков ячменя разных сортов в процессе развития

Table 1. Change in the content of carotenoids (µg/g fresh weight) measured by HPLC, in healthy and *Bipolaris sorokiniana* (B. S.) infected leaves of barley seedlings of different varieties during development

Сорт	Неоксантин	Виолаксантин	Антераксантин	Лютеин	β-каротин
5-дневные проростки					
Адамант (контроль)	76,3 ± 0,7 (100 %)	37,6 ± 0,3 (100 %)	31,3 ± 0,9 (100 %)	101,2 ± 0,2 (100 %)	106,0 ± 0,4 (100 %)
Адамант + B. S.	42,7 ± 0,5* (56,0 %)	27,1 ± 0,4* (72,0 %)	20,7 ± 0,5* (66,1 %)	89,3 ± 0,2* (88,2 %)	94,6 ± 0,6* (89,2 %)
Рейдер (контроль)	34,1 ± 0,5 (100 %)	22,6 ± 0,1 (100 %)	14,4 ± 0,4 (100 %)	73,1 ± 0,8 (100 %)	73,7 ± 0,8 (100 %)
Рейдер + B. S.	52,2 ± 0,4* (153,0 %)	35,0 ± 0,4* (154,0 %)	19,6 ± 0,2* (136,1 %)	111,3 ± 0,3* (152,2 %)	121,6 ± 0,4* (165,0 %)
Магутны (контроль)	41,5 ± 10,2 (100 %)	46,6 ± 5,3 (100 %)	16,5 ± 4,9 (100 %)	81,8 ± 2,8 (100 %)	103,6 ± 6,9 (100 %)
Магутны + B. S.	36,1 ± 10,9 (87,0 %)	41,0 ± 2,8 (88,0 %)	16,2 ± 2,5 (98,2 %)	82,2 ± 4,9 (100,5 %)	89,8 ± 2,4 (86,7 %)
7-дневные проростки					
Адамант (контроль)	28,2 ± 1,1 (100 %)	20,7 ± 0,8 (100 %)	13,1 ± 0,3 (100 %)	71,9 ± 1,1 (100 %)	77,3 ± 3,6 (100 %)
Адамант + B. S.	52,3 ± 0,6* (185,5 %)	33,5 ± 0,8* (161,8 %)	26,1 ± 0,1* (199,3 %)	108,6 ± 1,8* (151,0 %)	133,0 ± 1,1* (172,0 %)
Рейдер (контроль)	26,5 ± 1,1 (100 %)	22,4 ± 0,4 (100 %)	13,8 ± 0,2 (100 %)	68,4 ± 1,2 (100 %)	76,2 ± 1,4 (100 %)
Рейдер + B. S.	46,9 ± 0,7* (177,0 %)	37,2 ± 0,9* (166,0 %)	20,1 ± 0,3* (145,6 %)	99,4 ± 0,7* (145,3 %)	111,1 ± 1,8* (145,8 %)
Магутны (контроль)	75,5 ± 11,5 (100 %)	48,7 ± 0,7 (100 %)	17,5 ± 1,3 (100 %)	100,1 ± 2,1 (100 %)	126,8 ± 0,2 (100 %)
Магутны + B. S.	69,1 ± 8,3 (91,5 %)	56,3 ± 1,8 (115,6 %)	14,3 ± 0,2 (81,7 %)	120,3 ± 4,8 (120,2 %)	150,8 ± 8,6* (118,9 %)
12-дневные проростки					
Адамант (контроль)	36,5 ± 1,3 (100 %)	26,2 ± 0,4 (100 %)	20,9 ± 1,0 (100 %)	92,1 ± 1,5 (100 %)	73,5 ± 1,6 (100 %)
Адамант + B. S.	50,1 ± 0,9* (137,2 %)	39,7 ± 0,6* (151,5 %)	24,1 ± 1,1 (115,3 %)	101,1 ± 1,1 (109,8 %)	113,3 ± 1,2* (154,1 %)
Рейдер (контроль)	49,4 ± 1,2 (100 %)	34,2 ± 0,9 (100 %)	23,0 ± 0,8 (100 %)	108,8 ± 1,3 (100 %)	114,8 ± 1,3 (100 %)
Рейдер + B. S.	28,1 ± 1,4* (56,9 %)	24,0 ± 0,2* (70,2 %)	13,5 ± 0,1* (58,7 %)	80,4 ± 0,9* (73,9 %)	79,3 ± 1,3* (69,1 %)
Магутны (контроль)	44,7 ± 16,3 (100 %)	52,6 ± 5,0 (100 %)	87,6 ± 12,3 (100 %)	137,9 ± 9,6 (100 %)	163,1 ± 13,2 (100 %)
Магутны + B. S.	5,4 ± 1,7* (16,4 %)	45,9 ± 7,1* (69,3 %)	76,0 ± 4,2 (117,8 %)	109,9 ± 11,3* (71,9 %)	136,8 ± 11,3* (84,5 %)

Примечание. * – различия достоверны между контролем и вариантом B. S.

содержания неоксантина, лютеина и β-каротина, а кроме того, у этого сорта содержание всех форм каротиноидов в этом возрасте было выше, чем у сортов Рейдер и Адамант. К 12-дневному возрасту количество каротиноидов снова возрастало у всех изученных сортов ячменя, причем более заметно у сорта Магутны. В молодых инфицированных проростках относительное содержание каротиноидов у сорта Адамант снижалось, у сорта Магутны оставалось без изменений, а у сорта Рейдер возрастало в среднем в 1,5 раза. В зрелых инфицированных проростках наблюдали повышение (по сравнению с контролем) относительного содержания всех форм каротиноидов у сортов Адамант и Рейдер, особенно выраженное у сорта Адамант по содержанию антераксантина и β-каротина, а у сорта Магутны – по содержанию неоксантина, лютеина и β-каротина. В стареющих инфицированных проростках сорта Адамант также отмечено повышение содержания каротиноидов, особенно виолаксантина и β-каротина, тогда как у сортов Рейдер и Магутны происходило в основном снижение количества каротиноидов относительно контроля. Следует отметить, что в наших исследованиях, несмотря на изменение содержания антераксантина и виолаксантина, не обнаружено зеаксантина, что не позволяет судить об активации ксантофиллового цикла в изученных условиях. Таким образом, несмотря на выявленные онтогенетические и сортовые особенности качественного и количественного состава каротиноидов в проростках ячменя, можно сделать заключение, что у 5-дневных проростков голозерного сорта Адамант содержание всех форм каротиноидов снижалось относительно контроля, тогда как пленчатые сорта демонстрировали более высокую болезнеустойчивость по данным показателям. Исходя из полученных данных, при гелиминтоспориозе ячменя на стадии проростков наиболее сильно изменяется содержание антераксантина, виолаксантина, лютеина и β-каротина в сравнении с физиологическими условиями. Следует также отметить, что изменение содержания желтых пигментов у изученных сортов ячменя хорошо согласуется с изменением содержания Хл при инфицировании грибным патогеном, что демонстрирует тесное взаимодействие систем биосинтеза фотосинтетических пигментов в хлоропластах.

В целом результаты анализа содержания фотосинтетических пигментов указывают на существенные различия в структуре фотосинтетических мембран у изученных сортов ячменя как в процессе развития, так и при инфицировании грибным патогеном.

В связи с этим были изучены особенности структурного состояния фотосинтетических мембран по спектрам флуоресценции здоровых и зараженных грибом *Bipolaris sorokiniana* Sacc. (Shoem.) в разном возрасте проростков трех сортов ячменя – Магутны, Рейдер (пленчатые) и Адамант (голозерный). Спектры флуоресценции клеток, тканей и гомогенатов растений при комнатной температуре обычно имеют два широких максимума в красной области. Один пик флуоресценции находится в интервале длин волн 682–686 нм (F_{685}), а другой – в интервале 730–742 нм (F_{740}) [20, 30]. Существует несколько точек зрения на механизм возникновения люминесценции в области 685 и 740 нм. Предполагается, что флуоресценция на длине волны около 685 нм обусловлена Хл фотосистемы 2 (ФС2), а на длине волны 740 нм – ФС1 [31]. Считается также, что соотношение максимумов в спектре флуоресценции определяется степенью агрегированности форм Хл и реабсорбцией излучения [32]. Для количественной характеристики формы спектра был введен параметр ω , равный отношению максимальных значений интенсивности флуоресценции в области 730–750 и 685 нм ($\omega = F_{740}/F_{685}$) [20]. Было показано, что жизненный цикл фотосинтезирующего листа связан с возрастанием и последующим спадом длинноволновой флуоресценции. Как у молодых, так и у отмирающих тканей (независимо от причин гибели) интенсивность флуоресценции в области 730–750 нм была низкой, а значение параметра ω – минимальным [33].

В табл. 2 представлены усредненные значения спектров флуоресценции Хл в листьях ячменя при комнатной температуре. Видно, что амплитуда изменения исследованного показателя $\omega = F_{733}/F_{685}$ на заражение у голозерного сорта Адамант оказалась меньше, чем у двух пленчатых сортов Магутны и Рейдер.

Считают, что повышение параметра ω при увеличении содержания Хл указывает на высокие адаптационные возможности хлоропластов [20, 21]. В работе [34] было показано, что с увеличением количества Хл величина длинноволнового пика флуоресценции меняется незначительно, в то время как коротковолновая флуоресценция в красной области спектра существенно возрастает, а затем уменьшается из-за реабсорбции испускаемой флуоресценции в полосе поглощения Хл. Причиной реабсорбции является перекрытие коротковолновой области спектра флуоресценции Хл с длинноволновой областью его спектра поглощения. Есть данные о высокой положительной корреляции между отношением длинноволнового пика к коротковолновому и содержанием Хл в пересчете на площадь [35] и биомассу [36].

Следовательно, полученные по флуоресценции данные необходимо сопоставить с изменением содержания Хл. На основании проведенных экспериментов выявлены по крайней мере две

Т а б л и ц а 2. Изменение соотношения интенсивностей флуоресценции Хл двух полос (F_{733}/F_{685}) в спектрах флуоресценции при комнатной температуре в контрольных и инфицированных *Bipolaris sorokiniana* (В. S.) проростках разных сортов ячменя

Table 2. Change in the ratio of Chl fluorescence intensities of two bands (F_{733}/F_{685}) in fluorescence spectra at room temperature in control and *Bipolaris sorokiniana* (В. S.) infected seedlings of different barley varieties

Сорт	$\omega (F_{733}/F_{685})$		2:1, %
	1 (контроль)	2 (инфицирование В. S.)	
5-дневные проростки			
Магутны	0,968 ± 0,039	0,860 ± 0,035	112,6
Рейдер	1,033 ± 0,041	0,884 ± 0,039	116,9
Адам	0,917 ± 0,031	0,893 ± 0,028	102,7
7-дневные проростки			
Магутны	1,104 ± 0,041	0,942 ± 0,039	117,2
Рейдер	1,270 ± 0,017	0,959 ± 0,029	132,4
Адам	1,149 ± 0,021	1,092 ± 0,028	105,2

закономерности изменения величины ω . Во-первых, в 7-дневных здоровых листьях у всех изученных сортов ячменя происходит повышение параметра ω относительно 5-дневного возраста, что, вероятно, связано с увеличением реадсорбции испускаемой флуоресценции в полосе поглощения Хл в связи с существенным возрастанием количества хлорофилловых пигментов. Во-вторых, величина соотношения интенсивности двух полос испускания (F_{735}/F_{685}) в зарегистрированных при комнатной температуре спектрах флуоресценции одинаковых участков первых листьев проростков ячменя 5- и 7-дневного возраста снижалась в большей степени при заражении грибом *Bipolaris sorokiniana* Sacc. (Shoem.) более устойчивых пленчатых сортов Магутны и Рейдер по сравнению с менее устойчивым голозерным сортом Адамант. Это можно объяснить структурными изменениями фотосинтетических мембран, приводящими к уменьшению реадсорбции формы F_{735} и возрастанию флуоресценции, испускаемой коротковолновой формой F_{685} .

Заключение. В результате проведенных исследований обнаружены существенные различия по морфологии и скорости формирования первого листа у проростков разных сортов ячменя. Голозерный сорт Адамант отличался от пленчатых сортов Магутны и Рейдер меньшими размерами первого листа, более быстрым его выходом из колеоптиля и появлением второго листа уже у 5-дневных проростков. В результате инфицирования обнаружено ускорение роста первого листа у пленчатых сортов Магутны и Рейдер в 5-дневном возрасте, тогда как у голозерного сорта Адамант наблюдали достоверное снижение его размеров. Поскольку изученные сорта ячменя слабо различаются по срокам созревания и среднеустойчивы к корневым гнилям, выявленные особенности развития проростков, вероятно, обусловлены более быстрым поступлением воды в зерновку у голозерного сорта и генотипическими детерминантами развития.

Наиболее высокий уровень пигментов выявлен у проростков сорта Рейдер, у которого содержание Хл ($a + b$) и каротиноидов в первом листе оказалось максимальным уже в 5-дневном возрасте по сравнению с таковым у сортов Магутны и Адамант и практически не изменялось с увеличением возраста листа. В молодых листьях при инфицировании наиболее сильное снижение содержания Хл ($a + b$) и каротиноидов было характерно для сорта Адамант (36,1–46,5 %), тогда как у сорта Рейдер оно составило только 18–23 %, а у сорта Магутны – практически не изменялось на фоне увеличения содержания каротиноидов на 54,6 %. В процессе развития проростков устойчивость пигментного фонда к грибному патогену у сортов Рейдер и Адамант увеличивалась, достигая максимума к 7-дневному возрасту, и практически не изменялась к 12-дневному возрасту. Анализ качественного и количественного состава каротиноидов методом ВЭЖХ показал, что у 5-дневных проростков голозерного сорта Адамант содержание всех форм каротиноидов снижается при инфицировании грибным патогеном, тогда как пленчатые сорта Магутны и Рейдер отличаются более высокой устойчивостью состава каротиноидов. Впервые установлено, что инфицирование грибом *Bipolaris sorokiniana* оказывает наиболее сильное действие на содержание антраксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина в проростках ячменя, чем физиологические условия.

Проведенный анализ спектров флуоресценции Хл при комнатной температуре показал, что в 7-дневных здоровых листьях у всех изученных сортов ячменя происходит повышение величины соотношения интенсивности двух полос испускания (F_{735}/F_{685} , параметр ω) относительно 5-дневного возраста, что, вероятно, связано с существенным возрастанием количества хлорофилловых пигментов. При заражении грибом *Bipolaris sorokiniana* Sacc. (Shoem.) параметр ω в проростках пленчатых сортов Магутны и Рейдер снижался в большей степени, чем у голозерного сорта Адамант, что связано со структурными изменениями фотосинтетических мембран, приводящими к возрастанию флуоресценции Хл в коротковолновой области (F_{685}).

Таким образом, установленные особенности изменения фонда фотосинтетических пигментов у сортов ячменя при гелиминтоспориозе на разных этапах развития первого листа создают научные и методические предпосылки для дальнейшего изучения механизмов формирования устойчивости генотипов ярового ячменя к этому заболеванию.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ведущему лабораторией ячменя, канд. с/х наук А. А. Зубковичу РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» за научную консультацию и предоставленный семенной материал сортов ярового ячменя.

Acknowledgements. The authors are grateful to the head of the laboratory of barley, Ph. D. A. A. Zubkovich RUP “SPC NAS of Belarus for agriculture” for scientific advice and provided seed material of spring barley varieties.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Różewicz, M. The Most Important Fungal Diseases of Cereals – Problems and Possible Solutions / M. Różewicz, M. Wyzińska, J. Grabiński // *Agronomy*. – 2021. – Vol. 11, N 4. – Art. 714. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040714>
2. Variation for infection response to *Bipolaris sorokiniana* and identification of trait specific sources in barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm / S. Tejveer [et al.] // *Aust. J. Crop Sci.* – 2014. – Vol. 8, N 6. – P. 909–915. <https://doi.org/10.3316/informit.479808826504515>
3. Биологическое обоснование выбора протравителей для обработки семян яровых зерновых культур [Электронный ресурс] / А. Жуковский [и др.] // Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь. – 2019. – Режим доступа: <https://mshp.gov.by/information/materials/zem/plant-protection/cee6770945a612a0.html>. – Дата доступа: 27.07.2022.
4. Постовалов, А. А. Характеристика устойчивости к корневой гнили и экологическая пластичность сортов ярового ячменя в Курганской области / А. А. Постовалов, М. Н. Ткаченко // *Вестн. Курган. гос. с.-х. акад.* – 2018. – № 3. – С. 57–59.
5. Экологическая пластичность сортов ярового ячменя в условиях Республики Татарстан / Р. И. Сафин [и др.] // *Вестн. Казан. гос. аграр. ун-та.* – 2015. – Т. 10, № 2. – С. 161–163.
6. Jones, J. D. The plant immune system / J. D. Jones, J. L. Dangl // *Nature*. – 2006. – Vol. 444. – P. 323–332. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
7. Ausubel, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? / F. M. Ausubel // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>
8. Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism / T. A. Koropatnick [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 306, N 5699. – P. 1186–1188. <https://doi.org/10.1126/science.1102218>
9. Monaghan, J. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane / J. Monaghan, C. Zipfel // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – Vol. 15, N 4. – P. 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>
10. Light-dependent expression of flg22-induced defense genes in *Arabidopsis* / S. Sano [et al.] // *Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00531>
11. Serrano, I. Chloroplasts at work during plant innate immunity / I. Serrano, C. Audran, S. Rivas // *Exp. Botany*. – 2016. – Vol. 67, N 13. – P. 3845–3854. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw088>
12. Muthamilarasan, M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism / M. Muthamilarasan, M. Prasad // *J. Biosci.* – 2013. – Vol. 38, N 2. – P. 433–449. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9302-2>
13. Yurina, N. P. Signal transduction pathways of plant mitochondria retrograde regulation / N. P. Yurina, M. S. Odintsova // *Rus. J. Plant Physiol.* – 2010. – Vol. 57. – P. 7–19. <https://doi.org/10.1134/S1021443710010024>
14. Tobias, D. J. Leaf senescence patterns and photosynthesis in four leaf flushes of two deciduous oak (*quercus*) species / D. J. Tobias, A. Ikemoto, T. Nishimura // *Photosynthetica*. – 1995. – Vol. 31, N 2. – P. 231–239.
15. Pshybytko, N. L. The various mechanisms of photosynthesis limitation in heated barley seedlings of different ages / N. L. Pshybytko, L. N. Kalituho, L. F. Kabashnikova // *Bulg. J. Plant Physiol. Spec. iss.* – 2003. – P. 304–313.
16. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control / J. Kumar [et al.] // *Mol. Plant Pathol.* – 2002. – Vol. 3, N 4. – P. 185–195. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00120.x>
17. Кабашникова, Л. Ф. Фотосинтетический аппарат и потенциал продуктивности хлебных злаков / Л. Ф. Кабашникова. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 327 с.
18. Шлык, А. А. Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык // *Биохимические методы в физиологии растений : сб. ст. / отв. ред. О. А. Павлинова.* – М., 1971. – С. 154–170.
19. Rodrigues-Amaya, D. B. Handbook for Carotenoid Analysis / D. B. Rodrigues-Amaya, M. Kimura. – Washington : Harvest Plus, 2004. – 58 p.
20. Krause, G. H. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics / G. H. Krause, E. Weis // *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 42. – P. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
21. Четвериков, А. Г. Принципы исследования реальных спектров флуоресценции фотосинтезирующих объектов / А. Г. Четвериков // *Биофизика*. – 1989. – Т. 24, № 1. – С. 82–90.
22. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Изд. 3-е, испр. – Минск : Вышэйш. шк., 1973. – 320 с.
23. Chloroplasts and plant immunity: where are the fungal effectors? / M. Kretschmer [et al.] // *Pathogens*. – 2019. – Vol. 9, N 1. – Art. 19. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010019>
24. Влияние теплового шока и водного дефицита на состояние фотосинтетических мембран хлоропластов в листьях *Hordeum vulgare* L. разного возраста / Н. Л. Пшибытко [и др.] // *Биол. мембраны*. – 2002. – Т. 20, № 2. – С. 121–127.
25. Deregulation of plant cell death through disruption of chloroplast functionality affects asexual sporulation of *Zymoseptoria tritici* on wheat / W.-S. Lee [et al.] // *Mol. Plant-Microbe Interactions*. – 2014. – Vol. 28, N 5. – P. 590–604. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0346-R>
26. Ghosh, S. Alterations in rice chloroplast integrity, photosynthesis and metabolome associated with pathogenesis of *Rhizoctonia solani* / S. Ghosh, P. Kanwar, G. Jha // *Sci. Reports*. – 2017. – Vol. 7. – Art. 41610. <https://doi.org/10.1038/srep41610>
27. Joyard, J. Molecular aspects of plastid envelope biochemistry / J. Joyard, M. A. Block, R. Douce // *J. Biochem.* – 1991. – Vol. 199, N 3. – P. 489–509. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16148.x>

28. Demmig-Adams, B. Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants / B. Demmig-Adams, A. M. Gilmore, W. W. Adams // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10, N 4. – P. 403–412. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.4.8647339>
29. Bjorkman, O. Some viewpoints on photosynthetic response and adaptation to environmental stress / O. Bjorkman // *Photosynthesis (Plant biology) : proceedings of the C. S. french symposium, July 17–23, 1988, Stanford, California* / ed. W. R. Briggs. – N. Y., 1989. – P. 45–58.
30. A CCD-OMA device for the measurement of complete chlorophyll fluorescence emission spectra of leaves during the fluorescence induction kinetics / K. Szabó [et al.] // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1992. – Vol. 31, N 2. – P. 153–160. <https://doi.org/10.1007/BF01211213>
31. Кочубей, С. М. Организация пигментов фотосинтетических мембран как основа энергообеспечения фотосинтеза / С. М. Кочубей. – Киев : Наук. думка, 1986. – 188 с.
32. Литвин, Ф. Ф. Биохимия и биофизика фотосинтеза / Ф. Ф. Литвин. – М. : Наука, 1963. – 96 с.
33. Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла (техника биомониторинга) / К. Б. Асланиди [и др.]. – Пушкино : Науч. центр биол. исслед., 1988. – 42 с.
34. Buschmann, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves / C. Buschmann // *Photosynth. Res.* – 2007. – Vol. 92, N 2. – P. 261–271. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9187-8>
35. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology / H. K. Lichtenthaler [et al.] // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1986. – Vol. 25, N 4. – P. 297–308. <https://doi.org/10.1007/BF01214643>
36. Флуоресценция листьев бобов, выращенных при пониженной освещенности / О. А. Калмацкая [и др.] // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия.* – 2013. – № 6. – С. 31–34.

References

1. Rózewicz M., Wyzńska M., Grabiński J. The Most Important Fungal Diseases of Cereals – Problems and Possible Solutions. *Agronomy*, 2021, vol. 11, no. 4, art. 714. <https://doi.org/10.3390/agronomy1104071>
2. Tejveer S., Vinod K., Mishra L. C., Prasad R. C. Variation for infection response to *Bipolaris sorokiniana* and identification of trait specific sources in barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm. *Australian Journal of Crop Science*, 2014, vol. 8, no. 6, pp. 909–915. <https://doi.org/10.3316/informit.479808826504515>
3. Zhukovskii A., Buga S., Radyna A., Zherdetskaya T., Zhuk E. Biological substantiation of the choice of disinfectants for the treatment of seeds of spring crops. *Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus*, 2019. Available at: <https://mshp.gov.by/information/materials/zem/plant-protection/cee6770945a612a0.html> (accessed 27.07.2022) (in Russian).
4. Postovalov A. A., Tkachenko M. N. Characteristics of resistance to root rot and environmental plasticity of spring barley varieties in the Kurgan region. *Vestnik Kurganskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* [Bulletin of the Kurgan State Agricultural Academy], 2018, no. 3, pp. 57–59 (in Russian).
5. Safin R. I., Karimova L. Z., Turnin S. L., Nizhegorodtseva L. S. Ecological plasticity of spring barley varieties in the conditions of the Republic of Tatarstan. *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of Kazan State Agrarian University], 2015, vol. 2, no. 36, pp. 161–163 (in Russian).
6. Jones J. D., Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*, 2006, vol. 444, pp. 323–332. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
7. Ausubel F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 2005, vol. 6, pp. 973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>
8. Koropatnick T. A., Jacquelyn E. T., Apicella M. A., Stabb E. V., Goldman W. E., McFall-Ngai M. J. Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science*, 2004, vol. 306, no. 5699, pp. 1186–1188. <https://doi.org/10.1126/science.1102218>
9. Monaghan J., Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 2012, vol. 15, no. 4, pp. 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>
10. Sano S., Aoyama M., Nakai K., Shimotani K., Yamasaki K., Sato M. H., Tojo D., Suwastika I. N., Nomura H., Shiina T. Light-dependent expression of flg22-induced defense genes in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2014, vol. 5, art. 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00531>
11. Serrano I., Audran C., Rivas S. Chloroplasts at work during plant innate immunity. *Experimental Botany*, 2016, vol. 67, no. 13, pp. 3845–3854. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw088>
12. Muthamilarasan M., Prasad M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 2013, vol. 38, no. 2, pp. 433–449. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9302-2>
13. Yurina N. P., Odintsova M. S. Signal transduction pathways of plant mitochondria retrograde regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, vol. 57, pp. 7–19. <https://doi.org/10.1134/S1021443710010024>
14. Tobias D. J., Ikemoto A., Nishimura T. Leaf senescence patterns and photosynthesis in four leaf flushes of two deciduous oak (*quercus*) species. *Photosynthetica*, 1995, vol. 31, pp. 231–239.
15. Pshybytko N. L., Kalituho L. N., Kabashnikova L. F. The various mechanisms of photosynthesis limitation in heated barley seedlings of different ages. *Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special issue*, 2003, pp. 304–313.
16. Kumar J., Schäfer P., Hüchelhoven R., Langen G., Baltruschat H., Stein E., Nagarajan S., Kogel K. H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 2002, vol. 3, no. 4, pp. 185–195. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00120.x>
17. Kabashnikova L. F. *Photosynthetic apparatus and potential productivity of bread wheat*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 327 p. (in Russian).
18. Shlyk A. A. Determination of chlorophyll and carotenoids in green leaf extracts. *Biochemical methods in plant physiology: collection of articles*. Moscow, 1971, pp. 154–170 (in Russian).

19. Rodrigues-Amaya D. B., Kimura M. *Handbook for Carotenoid Analysis*. Washington, Harvest Plus, 2004. 58 p.
20. Krause G. H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, vol. 42, pp. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
21. Chetverikov A. G. Principles of studying the real fluorescence spectra of photosynthetic objects. *Biofizika* [Biophysics], 1989, vol. 24, no. 1, pp. 82–90 (in Russian).
22. Rokitskii P. F. *Biological statistics. 3rd ed.* Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 320 p. (in Russian).
23. Kretschmer M., Damoo D., Djamei A., Kronstad J. Chloroplasts and plant immunity: where are the fungal effectors? *Pathogens*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 19. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010019>
24. Pshibytko N. L., Kalitukho L. N., Zhavoronkova N. B., Kabashnikova L. F. Effect of heat shock and water deficit on the state of photosynthetic chloroplast membranes in *Hordeum vulgare* L. leaves of different ages. *Biologicheskie membrany* [Biological membranes], 2002, vol. 20, no. 2, pp. 121–127 (in Russian).
25. Lee W.-S., Devonshire B. J., Hammond-Kosack K. E., Rudd J. J., Kanyuka K. Deregulation of plant cell death through disruption of chloroplast functionality affects asexual sporulation of *Zymoseptoria tritici* on wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, vol. 28, no. 5, pp. 590–604. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0346-R>
26. Ghosh S., Kanwar P., Jha G. Alterations in rice chloroplast integrity, photosynthesis and metabolome associated with pathogenesis of *Rhizoctonia solani*. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, art. 41610. <https://doi.org/10.1038/srep41610>
27. Joyard J., Block M. A., Douce R. Molecular aspects of plastid envelope biochemistry. *Journal of Biochemistry*, 1991, vol. 199, no. 3, pp. 489–509. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16148.x>
28. Demmig-Adams B., Gilmore A. M., Adams W. W. Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal*, 1996, vol. 10, no. 4, pp. 403–412. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.4.8647339>
29. Bjorkman O. Some viewpoints on photosynthetic response and adaptation to environmental stress. *Photosynthesis (Plant biology) : proceedings of the C. S. french symposium, July 17–23, 1988, Stanford, California*. New York, 1989, pp. 45–58.
30. Szabó K., Lichtenthaler H. K., Kocsányi Z., Richter P. A CCD-OMA device for the measurement of complete chlorophyll fluorescence emission spectra of leaves during the fluorescence induction kinetics. *Radiation and Environmental Biophysics*, 1992, vol. 31, no. 2, pp. 153–160. <https://doi.org/10.1007/BF01211213>
31. Kochubei S. M. *Organization of pigments of photosynthetic membranes as a basis for energy supply of photosynthesis*. Kyiv, Naukova dumka Publ., 1986. 188 p. (in Russian).
32. Litvin F. F. *Biochemistry and biophysics of photosynthesis*. Moscow, Nauka Publ., 1963. 96 p. (in Russian).
33. Aslanidi K. B., Shalapenok A. A., Karnaukhov V. N., Berestovskaya N. G., Shavkin V. I. *Method for determining the functional state of plants by chlorophyll fluorescence spectra (biomonitoring technique)*. Pushchino, Scientific Center for Biological Research, 1988. 42 p. (in Russian).
34. Buschmann C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research*, 2007, vol. 92, no. 2, pp. 261–271. <https://doi.org/10.1007/s1120-007-9187-8>
35. Lichtenthaler H. K., Buschmann C., Rinderle U., Schmuck G. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation and Environmental Biophysics*, 1986, vol. 25, no. 4, pp. 297–308. <https://doi.org/10.1007/BF01214643>
36. Kalmatskaya O. A., Levykina I. P., Patsaeva S. V., Karavaev V. A., Yuzhakov V. I. Fluorescence of leaves of beans grown in low light. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 3: Fizika. Astronomiya* [Bulletin of the Moscow University. Series 3. Physics. Astronomy], 2013, no. 6, pp. 31–34 (in Russian).

Информация об авторах

Викс Татьяна Николаевна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tania_gavrilenko@mail.ru

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

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

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

Information about the authors

Tatsiana N. Viks – Postgraduate student, 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: tania_gavrilenko@mail.ru

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

Hanna V. Martysiuk – 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: anya.mart@list.ru

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

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.62; 578.22
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-38-46>

Поступила в редакцию 02.08.2022
Received 02.08.2022

Ж. С. Абай, С. О. Садикалиева, К. А. Шораева, Б. А. Еспембетов, А. С. Нурпейсова

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
нгт. Гвардейский, Республика Казахстан*

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВЕКТОРОВ ГРИППА, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ *MYCOBACTERIUM BOVIS*, С ПОМОЩЬЮ ОТ-ПЦР И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Аннотация. Профилактика туберкулеза крупного рогатого скота путем иммунизации традиционными вакцинами и регулярное диагностирование долгое время были основными методами борьбы против данной инфекции. Однако степень защиты от туберкулеза, обеспечиваемая традиционной вакциной БЦЖ, варьируется, и на сегодняшний день причины успешного или неудачного ее применения не ясны. Следовательно, разработка альтернативных безопасных вакцин с более высокой и устойчивой защитой, чем у вакцины БЦЖ, является актуальной. В то же время в основе любой новой вакцины или стратегии вакцинации лежит, как правило, технология изготовления и применения вакцины БЦЖ. Разработанные на основе гриппозных векторов рекомбинантные векторные вакцины показывают большой потенциал и преимущества в обеспечении специфического иммунного ответа.

Цель исследования – оценка ростовых свойств сконструированных рекомбинантных штаммов вируса гриппа, экспрессирующих протективные белки микобактерии, для дальнейшего их использования при создании векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота.

В статье представлены результаты работы по культивированию и репродукции рекомбинантных штаммов вируса гриппа. Методами обратной генетики были сконструированы рекомбинантные штаммы вируса гриппа, несущие микобактериальные белки *Mycobacterium bovis* ESAT-6 и TB10.4, в последовательности гена NS. По результатам проведенных работ определены оптимальные условия культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа. Оба варианта рекомбинантного штамма показали репродуктивную активность в системе развивающихся куриных эмбрионов при оптимальных условиях культивирования.

Оценка с помощью метода ОТ-ПЦР генетической стабильности вставки микобактериальных белков в NS ген вируса гриппа показала, что сегмент гена NS содержит вставку микобактериальных белков TB10.4 и ESAT-6, которая сохраняется на протяжении исследованных пяти пассажей.

Ключевые слова: рекомбинантный вирус гриппа, экспрессия, *Mycobacterium bovis*, культивирование, векторы, генетическая стабильность, ОТ-ПЦР

Для цитирования: Оценка генетической стабильности рекомбинантных векторов гриппа, кодирующих белки *Mycobacterium bovis*, с помощью ОТ-ПЦР и оптимизация условий их культивирования / Ж. С. Абай [др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 38–46. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-38-46>

Zhandos S. Abay, Sandugash O. Sadikalieva, Kamshat A. Shorayeva, Bolat A. Espembetov, Ainur S. Nurpeisova

Research Institute of Biological Safety Problems, Guardskii uts, Republic of Kazakhstan

EVALUATION OF THE GENETIC STABILITY OF RECOMBINANT FLU VECTORS ENCODING *MYCOBACTERIUM BOVIS* PROTEINS USING RT-PCR AND OPTIMIZATION OF THEIR CULTIVATION CONDITIONS

Abstract. Prevention by immunizing cattle against tuberculosis with traditional vaccines and regular testing has long been the main method of controlling this infection. However, the non-specificity of the traditional method shows the need for alternative approaches in the creation of anti-infective vaccines. The development of recombinant vector vaccines based on influenza vectors shows great potential and advantages in providing a specific immune response.

The purpose of the study is to evaluate the growth properties of the recombinant influenza virus strains expressing protective proteins of mycobacteria for further use in creating a vector vaccine against bovine tuberculosis.

This article presents the results of work on the cultivation and reproduction of recombinant influenza virus strains. Using reverse genetics methods, recombinant strains of the influenza virus carrying the mycobacterial *Mycobacterium bovis* ESAT-6 and TB10.4 proteins in the NS gene sequence were constructed. Based on the results of the work carried out, the optimal conditions for cultivating recombinant influenza virus strains were determined. Both variants of the recombinant strain showed reproductive activity in the developing chick embryo system, under optimal cultivation conditions.

The evaluation of the genetic stability of the insertion of mycobacterial proteins into the NS gene of the influenza virus was confirmed using the RT-PCR method. As a result, it was found that the NS gene segment contains an insertion of mycobacterial proteins TB10.4 and ESAT-6, which is retained throughout the studied 5 passages.

Keywords: recombinant influenza virus, expression, *Mycobacterium bovis*, cultivation, vectors, genetic stability, RT-PCR

For citation: Abay Zh. S., Sadikalieva S. O., Shorayeva K. A., Espembetov B. A., Nurpeisova A. S. Evaluation of the genetic stability of recombinant flu vectors encoding *Mycobacterium bovis* proteins using RT-PCR and optimization of their cultivation conditions. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 38–46 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-38-46>

Введение. Туберкулез крупного рогатого скота (КРС) – это хроническое инфекционное заболевание, возбудителем которого является бактерия *Mycobacterium bovis* [1–3]. Преодолев межвидовой барьер, *M. bovis* может вызывать туберкулез и у многих других домашних и диких животных. Кроме того, туберкулез КРС является зоонозным заболеванием, т. е. при определенных условиях он может естественным образом передаваться от животных к человеку [4–6].

Во многих промышленно развитых странах для полноценного роста и развития сельскохозяйственных животных проводятся профилактические мероприятия, основанные на регулярном тестировании на туберкулин и удалении инфицированных животных, что способствует снижению и даже искоренению заболеваемости туберкулезом в стадах КРС [7]. Таким образом, вакцинация является одним из основных инструментов, позволяющих остановить распространение инфекции.

За последние десятилетия иммунизация классическими инактивированными и живыми аттенуированными вакцинами позволила успешно контролировать многие инфекции и существенно снизить уровень заболеваемости. Однако остается достаточно большое число бактериальных патогенов, для которых иммунизация при помощи традиционных подходов нецелесообразна. Чаще всего это обусловлено недостаточной безопасностью таких вакцин, а также узкой специфичностью вырабатываемого иммунитета и высокой степенью вариабельности антигенных свойств патогена, позволяющих ему легко уходить от иммунного барьера организма-хозяина [8].

Альтернативой традиционным подходам является разработка векторных вакцин против различных инфекций, с помощью которых можно осуществлять доставку в клетки хозяина и экспрессировать фрагменты генов специфических антигенов. Эффективный дизайн векторной вакцины позволит добиться комплексной стимуляции иммунного ответа, его высокой специфичности и обеспечения безопасности препарата [8].

Вирусные векторы – перспективный путь адресной доставки и эффективной презентации интересующего антигена иммунной системе организма-реципиента. Допустимость и рациональность использования вируса в качестве вектора определяются по следующим критериям: безопасность; отсутствие предсуществующего и возможность преодоления вырабатываемого при вакцинации иммунитета к самому вирусному вектору, которые необходимы для эффективной выработки иммунного ответа на целевой антиген при первичной и повторной вакцинации; возможность производства векторных вакцин в больших масштабах и др. [8].

Многими исследователями описано применение вируса гриппа в качестве векторной системы [9]. Вирусные векторные вакцины на основе вируса гриппа представляют собой привлекательную альтернативу инактивированным вакцинам, так как гриппозные векторы обеспечивают нативную экспрессию встроенных белков и их доставку в участки индуктивного иммунитета. Кроме того, легкость манипуляции гриппозными векторами дает возможность быстро производить новые векторные вакцины [10].

Цель исследования – оптимизация условий культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа птиц и изучение генетической стабильности данных штаммов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись рекомбинантные вирусы гриппа птиц, кодирующие протективные белки микобактерии *M. bovis*. Вставленные гены кодируют белки ранней секреции ESAT-6 и TB10.4. Конструкция плазмид была любезно предоставлена лабораторией векторных вакцин НИИ гриппа имени А. А. Смородинцева.

Трансфекция клеток Vero. Клетки Vero, адаптированные к росту в бессывороточной среде на 140-м пассаже, пересеивали однократно в среде DMEM/F12 с добавлением 10 %-ной фетальной

бычьей сыворотки и 2 мМ L-glutamine. Для получения рекомбинантных вирусов клетки Vero были трансфицированы соответствующими плазмидами путем электропорации с использованием оборудования Nucleofector II (Амаха). Часть трансфицированных клеток высевали в лунку 6-луночного культурального планшета, содержащего 4 мл среды с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, другую часть вносили в 10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Через 6 ч после трансфекции среду заменяли на 4 мл среды Opti-Pro SFM (Gibco, США) с добавлением 2 % культуральной добавки GlutaMax (Gibco, США) и трипсина (1 мкг/мл) (Sigma). Через 2 дня после развития цитопатического эффекта собирали супернатант и использовали его для заражения РКЭ.

Оценка инфекционной активности вирусов при пассировании штаммов в РКЭ. РКЭ разных возрастов (10, 11 и 12 сут) были инфицированы вирусами в дозе 10^{-4} в объеме 0,2 мл и инкубированы в условиях разного температурного режима и относительной влажности воздуха 55 ± 5 % на протяжении 48 и 72 ч для определения накопляемости, инфекционной и гемагглютинирующей активности вирусов.

Оценка стабильности генетической вставки методом ОТ-ПЦР. Для оценки генетической стабильности вируса проведено пять пассажей в РКЭ при температуре инкубации 34 °С.

Для подтверждения наличия вставки была проведена амплификация гена NS методом ОТ-ПЦР для определения его размера в сравнении с диким штаммом. РНК выделяли из 100 мкл вирус-содержащей жидкости с использованием набора RNeasy kit (Qiagen, США). При проведении одноступенчатой ОТ-ПЦР использовали набор реагентов One-Step RT-PCR+PCR (Ambion, США), ПЦР осуществляли в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл One-Step buffer, 1 мкл смеси dNTP, 1 мкл смеси ферментов Enzyme Mix, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 11 мкл воды и 5 мкл РНК.

Для реакции были использованы следующие праймеры: NS-RT-Len (прямой праймер) – AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG; PR8-NS1-3UTR (обратный праймер) – GAAACAAGGGTGTTTTTTATTATTAAT. ПЦР проводили в амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) согласно следующему режиму амплификации: 50 °С – 30 мин, 95 °С – 15 мин, затем 35 циклов: 94 °С – 50 с, 54 °С – 50 с, 68 °С – 1 мин, 68 °С – 10 мин.

Результаты ОТ-ПЦР оценивали с помощью горизонтального электрофореза образцов в 1,7 %-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В качестве маркера молекулярного веса использовали Start250 («Биолаб Микс», Россия). Электрофорез осуществляли в камере Sub-Cell GT (Bio-rad, США) при 140 В в течение 1,5 ч. Для детекции результатов использовали систему геледокументирования GelDoc Go (Bio-Rad, США).

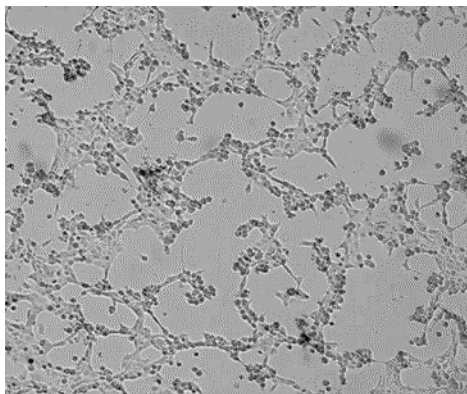
Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета Statistica (версия 8,0). Полученные результаты представляли в виде следующих показателей описательной статистики: среднегеометрических титров при доверительном интервале 95 %-ного двустороннего дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты и их обсуждение. В результате трансфекции методом электропорации восьми плазмид вируса гриппа в клетки Vero были получены два рекомбинантных штамма, экспрессирующих микобактериальные антигены. Оба рекомбинантных штамма содержали генные сегменты PB2, PB1, PA, NP, соответствующие последовательностям вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1), поверхностные антигены HA, NA и M от вируса гриппа A/Астана/5/05, модифицированный ген NS вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1), кодирующий укороченный до 124 аминокислот белок NS1, слитый в одной рамке считывания с целевыми микобактериальными антигенами.

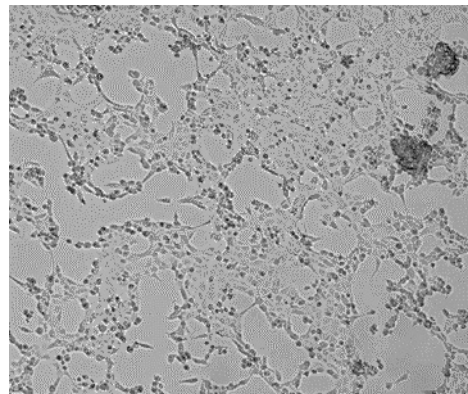
Часть трансфекционного материала высевали в 6-луночные планшеты. Полученный на данном этапе материал культуральной или аллантоисной жидкости содержал «нулевой» пассаж вирусных штаммов. Через сутки после трансфекции на клетках Vero выраженного цитопатического действия (ЦПД) вируса не наблюдалось. Первые признаки развития ЦПД на культуре клеток Vero для обоих штаммов были отмечены через 36 ч после трансфекции. Через 48 ч клеточный монослой у обоих рекомбинантных штаммов был полностью разрушен вследствие развития вирусного ЦПД.

Анализ аллантаоисной жидкости, содержащей «нулевой» пассаж рекомбинантных вирусных штаммов, показал отсутствие гемагглютинации для обоих штаммов. Результаты трансфекции представлены на рис. 1.

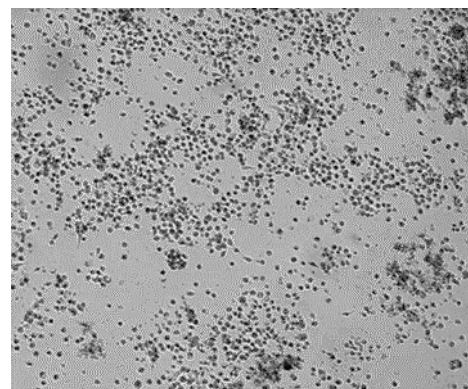
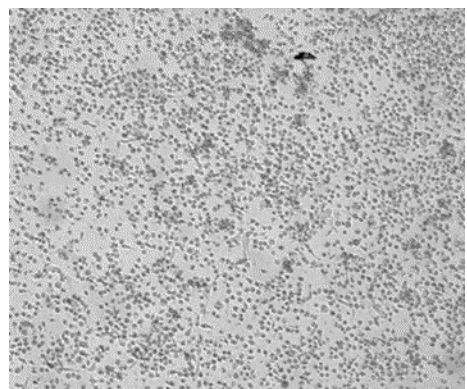
Рекомбинантный штамм, экспрессирующий ТВ10.4



Рекомбинантный штамм, экспрессирующий Esat6



Начало развития ЦПД (через 36 ч после трансфекции)



Полностью развитое ЦПД (через 48 ч после трансфекции)

Рис. 1. Развитие цитопатического действия рекомбинантных вирусных штаммов на культуре клеток Vero после трансфекции

Fig. 1. Development of the cytopathic effect of recombinant viral strains on Vero cell culture after transfection

Для проведения следующего этапа восстановления рекомбинантных штаммов в РКЭ были взяты аликвоты «нулевого» пассажа, полученные на культуре клеток и имеющие положительный результат в реакции гемагглютинации (РГА).

Для восстановления вируса и получения первого эмбрионального пассажа рекомбинантных вирусных штаммов в РКЭ использовали культуральную жидкость, содержащую «нулевой» пассаж штаммов (V0). С целью получения вирусной массы с более высокой инфекционной активностью в условиях использования в качестве субстрата для выращивания куриных эмбрионов из благополучных по гриппу птиц типа А птицеводческих хозяйств Республики Казахстан нами оптимизированы культуральные свойства вирусов в РКЭ. Для достижения указанной цели необходимо было определить оптимальный возраст эмбрионов в условиях НИИПББ. Для этого были использованы 10-, 11- и 12-суточные РКЭ. Одновременно определяли влияние температуры инкубирования на накапливаемость рекомбинантных штаммов (рис. 2).

Выбранные температурные режимы инкубирования не оказывали заметного влияния на накапливаемость вирусов и инфекционную активность рекомбинантных штаммов вируса гриппа, выращенных при различных температурных режимах. Однако, согласно результатам проведенного 5-кратного пассажа (V5), наивысший показатель инфекционной активности испытанного материала был достигнут в условиях температурного режима $34 \pm 0,5$ °C при использовании 12-суточных РКЭ (для штамма, экспрессирующего белок ESAT-6, активность составила 8,95lg ЭИД50, для штамма, экспрессирующего белок ТВ10.4, – 10,2lg ЭИД50).

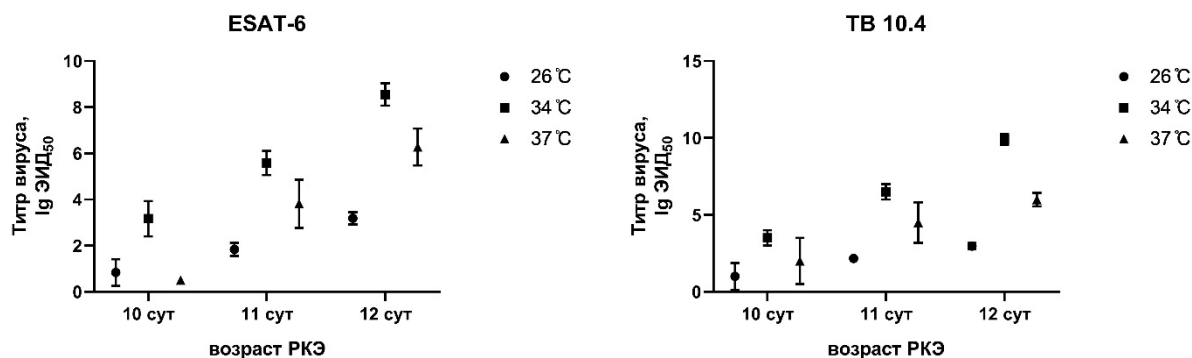


Рис. 2. Этап восстановления рекомбинантных штаммов в РКЭ

Fig. 2. Recovery stage of recombinant strains in ECE

Далее были изучены оптимальные сроки инкубирования инфицированных РКЭ. Зараженные эмбрионы инкубировали на протяжении 48 и 72 ч. В результате 72-часового инкубирования получены вирусодержащие материалы с высокой гемагглютинирующей активностью (для штамма, экспрессирующего белок ESAT-6, она составила 1:32, для штамма, экспрессирующего белок TB10.4, – 1:64) (рис. 3).

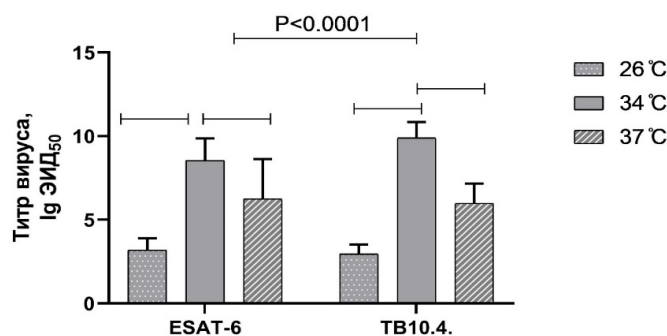


Рис. 3. Оптимизированные условия культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа в РКЭ

Fig. 3. Optimized conditions for cultivation of recombinant strains of influenza virus in ECE

Таким образом, в ходе дальнейшего исследования рекомбинантные вирусы гриппа инкубировали в течение 72 ч при $34 \pm 0,5$ °C.

Генетическую стабильность микобактериальной вставки в гене *NS* оценивали в ОТ-ПЦР после каждого из пяти пассажей в РКЭ. На электрофореграмме видно, что длина сегмента гена *NS*, содержащего вставки микобактериальных белков, увеличена и составляет 1170 п. о. для TB10.4 и 1175 п. о. для продукта ESAT-6 (рис. 4).

Таким образом, установлено, что сегмент гена *NS* содержит вставку микобактериальных белков TB10.4 и ESAT-6, которая сохраняется на протяжении исследованных пяти пассажей.

Наиболее экономически эффективными средствами предупреждения распространения инфекционных заболеваний являются раннее выявление возбудителя, система оповещения и, естественно, вакцинация. Своевременная профилактика инфекционных и особо опасных заболеваний является основой обеспечения ветеринарной безопасности государства. Разработка профилактических средств нового поколения на основе рекомбинантных белков будет способствовать эпизоотическому благополучию Казахстана. Технология разработки ветеринарных вакцин на основе генетического материала представляет собой новый способ получения вакцин с использованием вирусов в качестве вектора для доставки антигенов.

Потенциал вирусных векторов в качестве кандидатов на новые вакцины особенно высок в случае острой потребности в революционных вакцинах, которые индуцируют широкий защитный иммунитет против широкого спектра антигенов. Основным преимуществом вирусных

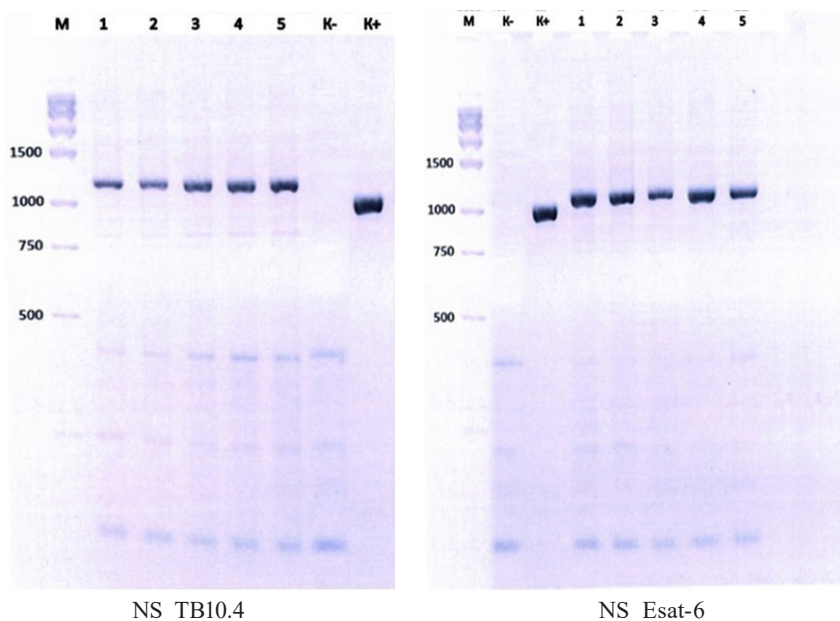


Рис. 4. Электрофореграмма сегмента гена *NS*, содержащего микобактериальные вставки (дорожки 1–5 – вставки в гене *NS*; М – маркер молекулярного веса; К– – отрицательный контроль (деионизированная вода); К+ – положительный контроль (дикий *NS*))

Fig. 4. Electropherogram of the *NS* gene segment containing mycobacterial inserts (lines 1–5, inserts in the *NS* gene; M – molecular weight marker; K– – negative control (deionized water); K+ – positive control (wild *NS*))

векторов является возможность экспрессии любого чужеродного антигена с модификацией или без нее *in vivo*. Поскольку белки экспрессируются в своей нативной активности, индуцируются ответы антител желаемой специфичности. Кроме того, вирусные векторы обеспечивают синтез белка *de novo* в цитоплазме инфицированных клеток, способствуя пролиферации специфических CD8⁺ Т-клеток [9].

Использование вирусов гриппа в качестве вектора является эффективной системой для создания векторных вакцин. В сравнении с другими вирусными векторами данный вирус имеет ряд преимуществ: осуществляют целевую экспрессию и доставку вставленных антигенов, увеличивая иммунный ответ в организме животных и людей; модификация гена *NS* различными чужеродными вставками не изменяет антигенные свойства вируса гриппа, так как не участвует в образовании структуры вириона [11, 12]; гриппозный вектор является более безопасным по сравнению с другими вирусами из-за его неспособности интегрироваться в хромосомы реципиента [13, 14].

При конструировании гриппозных векторов одной из перспективных для генетических манипуляций мишеней является неструктурный NS1 белок вируса гриппа, который в ходе естественной гриппозной инфекции в больших количествах синтезируется в зараженных клетках и вызывает выраженный антительный и Т-клеточный иммунный ответ [15]. В работах последних лет была показана высокая толерантность *NS* гена вируса гриппа к вставкам чужеродных нуклеотидных последовательностей в рамке считывания NS1 белка [16].

При этом за счет основной функции полноразмерного NS белка как антагониста системы интерферонов I типа подобные штаммы теряют способность к полноценной репликации в организме хозяина, что обеспечивает безопасность их использования в качестве вакцинных препаратов [17]. В то же время в зоне вирусной репликации происходит выработка большого количества цитокинов, которые способствуют поляризации иммунного ответа в сторону Th-1 звена [18].

В нашей работе в качестве вектора был использован вирус гриппа А с открытой рамкой считывания NS1 белка, а в качестве исходного штамма – A/PuertoRico/8/ NS-117 с модифицированным по длине геном *NS*, кодирующим 117 аминокислот N-терминальной области белка (нормальный размер белка NS1 составляет 230 аминокислотных остатков).

В качестве бактериального антигена были выбраны протективные микобактериальные белки, кодирующие гены TB10.4, ESAT-6. Известно, что открытием последних лет является созда-

ние векторных вакцин на основе антигенов *M. bovis*, кодирующих протективные белки [19]. К их числу относятся хорошо изученные белки комплекса Ag85 – TB10.4 и ESAT-6 [20]. По литературным данным, эти белки в моделях на животных показывали высокий уровень защиты от туберкулеза [21].

Таким образом, генно-инженерным методом обратной генетики получены два рекомбинантных штамма с химерным геномным фрагментом гена *NS*, кодирующим антигены *M. bovis* TB10.4 и ESAT6 в составе рамки считывания укороченного белка NS1. Оба рекомбинантных штамма успешно восстановлены в системе куриных эмбрионов. Первый этап клонирования показал сохранность генетической химерной конструкции в *NS*-геномном сегменте, что подтверждено результатами электрофореза продуктов амплификации ОТ-ПЦР.

Специфичность и защитную эффективность антител, вырабатываемых при иммунизации полученной векторной вакциной, туберкулеза КРС с нативным антигеном *M. bovis* предстоит оценить в последующих экспериментах.

Заключение. По результатам анализа репродуктивной активности в РКЭ, а также генетической стабильности в ОТ-ПЦР, рекомбинантные штаммы, экспрессирующие микобактериальные белки ESAT-6 и TB10.4, были отобраны в качестве наиболее перспективных кандидатов новой противотуберкулезной векторной вакцины. Планируются дальнейшие исследования защитной эффективности данной вакцины на экспериментальных моделях животных (морские свинки и белые мыши).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта № AP09259683 «Разработка технологии изготовления векторной вакцины для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Acknowledgements. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the framework of grant project No. AP09259683 “Development of technology for the manufacture of a vector vaccine for the prevention of tuberculosis in cattle” of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

Список использованных источников

1. A review on bovine tuberculosis in India / A. K. Refaya [et al.] // Tuberculosis. – 2020. – Vol. 122. – Art. 101923. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101923>
2. Bovine tuberculosis in domestic pigs: Genotyping and distribution of isolates in Argentina / S. Barandiaran [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2015. – Vol. 103. – P. 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.013>
3. Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain / F. Cardoso-Toset [et al.] // Prev. Vet. Med. – 2017. – Vol. 137. – Pt. A. – P. 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.016>
4. Good, M. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication / M. Good, A. Duignan // Vet. Med. Int. – 2011. – Vol. 2011. – Art. 410470. <https://doi.org/10.4061/2011/410470>
5. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans / B. Muller [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 19, N 6. – P. 899–908. <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543>
6. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries / O. Cosivi [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 4, N 1. – P. 59–70. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>
7. Buddle, B. M. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle / B. M. Buddle, P. G. Livingstone, G. W. de Lisle // NZ Vet. J. – 2009. – Vol. 57, N 4. – P. 173–180. <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36899>
8. Конструирование векторной вакцины на основе холодо-адаптированного вируса гриппа для защиты от бактериальной инфекции, вызываемой стрептококками группы В / Т. А. Смолоногина [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2019. – Т. 37, № 1. – С. 25–34.
9. de Vries, R. D. Viral vector-based influenza vaccines / R. D. de Vries, G. F. Rimmelzwaan // Hum. Vaccines Immunother. – 2016. – Vol. 12, N 11. – P. 2881–2901. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1210729>
10. Tripp, R. A. Virus-vectored influenza virus vaccines / R. A. Tripp, S. M. Tompkins // Viruses. – 2014. – Vol. 6, N 8. – P. 3055–3079. <https://doi.org/10.3390/v6083055>
11. Generation of an Influenza A Virus Vector Expressing Biologically Active Human Interleukin-2 from the NS Gene Segment / C. Kittel [et al.] // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, N 16. – P. 10672–10677. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.16.10672-10677.2005>
12. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 / H. Jin [et al.] // Virology. – 2003. – Vol. 306, N 1. – P. 18–24. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00035-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00035-1)
13. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice / B. Ferko [et al.] // Virology. – 2001. – Vol. 75, N 19. – P. 8899–8908. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.19.8899-8908.2001>

14. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice / N. Takasuka [et al.] // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20, N 11–12. – P. 1579–1585. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00491-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00491-1)
15. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells / A. Egorov [et al.] // *J. Virol.* – 1998 – Vol. 72, N 8. – P. 6437–6441. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6437-6441.1998>
16. Influenza Viral Vectors Expressing Two Kinds of HA Proteins as Bivalent Vaccine Against Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses of Clade 2.3.4.4 H5 and H7N9 / J. Li [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 604. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00604>
17. Король, О. И. Туберкулез у детей и возможности его предупреждения / О. И. Король // Туберкулез: проблемы диагностики, лечения и профилактики: тр. Всерос. науч.-практ. конф., 13–14 нояб. 2003 г. / под ред. Ю. Н. Левашева. – СПб., 2003. – С. 100–104.
18. Медуницын, Н. В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней : учеб. пособие / Н. В. Медуницын, В. И. Покровский. – М. : Геотар-Медиа, 2005. – 528 с.
19. Identification of Novel *Mycobacterium bovis* Antigens by Dissection of Crude Protein Fractions / V. Meike [et al.] // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol. 16, N 9. – P. 1352–1359. <https://doi.org/10.1128/cvi.00211-09>
20. Pollock, J. M. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis / J. M. Pollock, P. Andersen // *J. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 175, N 5. – P. 1251–1254. <https://doi.org/10.1086/593686>
21. Immune responses and protective efficacy of the gene vaccine expressing Ag85B and ESAT6 fusion protein from *Mycobacterium tuberculosis* / Sh. Chang-hong [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2008. – Vol. 27, N 4. – P. 199–207. <https://doi.org/10.1089/dna.2007.0648>

References

1. Refaya A. K., Bhargavi G., Mathew N. Ch., Rajendran A., Krishnamoorthy R., Swaminathan S., Palaniyandi K. A review on bovine tuberculosis in India. *Tuberculosis*, 2020, vol. 122, art. 101923. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101923>
2. Barandiaran S., Martínez Vivot M., Pérez A. M., Cataldi A. A., Zumárraga M. J. Bovine tuberculosis in domestic pigs: Genotyping and distribution of isolates in Argentina. *Research in Veterinary Science*, 2015, vol. 103, pp. 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.013>
3. Cardoso-Toset F., Luque I., Carrasco L., Jurado-Martos F., Rialde M. A., Venteo A. [et al.]. Evaluation of five serologic assays for bovine tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017, vol. 1, no. 137, pt. A, pp. 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.016>
4. Good M., Duignan A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB. *Veterinary Medicine International*, 2011, vol. 2011, art. 410470. <https://doi.org/10.4061/2011/410470>
5. Müller B., Dürr S., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C. J. M., Parsons S. D. C., van Helden P. D., Zinsstag J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, vol. 19, no. 6, pp. 899–908. <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543>
6. Cosivi O., Grange J. M., Daborn C. J., Raviglione M. C., Fujikura T., Cousins D. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 1998, vol. 4, no. 1, pp. 59–70. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>
7. Buddle B. M., Livingstone P. G., de Lisle G. W. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 2009, vol. 57, no. 4, pp. 173–180. <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36899>
8. Smolonogina T. A., Isakova-Sivak I. N., Kotomina T. S., Evsina A. S., Stepanova E. A., Prokopenko P. I., Leont'eva G. F., Suvorov A. N., Rudenko L. G. Design of a vector vaccine based on a cold-adapted influenza virus to protect against a bacterial infection caused by group B streptococci. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* [Molecular Genetics, Microbiology and Virology], 2019, vol. 37, no. 1, pp. 25–34 (in Russian).
9. de Vries R. D., Rimmelzwaan G. F. Viral vector-based influenza vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016, vol. 12, no. 11, pp. 2881–2901. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1210729>
10. Tripp R. A., Tompkins S. M. Virus-vectored influenza virus vaccines. *Viruses*, 2014, vol. 6, no. 8, pp. 3055–3079. <https://doi.org/10.3390/v6083055>
11. Kittel C., Ferko B., Kurz M., Voglauer R., Sereinig S., Romanova J., Stiegler G., Katinger H., Egorov A. Generation of an Influenza A Virus Vector Expressing Biologically Active Human Interleukin-2 from the NS Gene Segment. *Journal of Virology*, 2005, vol. 79, no. 16, pp. 10672–10677. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.16.10672-10677.2005>
12. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma Ch., Zhao J., Yang Ch.-F., Kemble G., Greenberg H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*, 2003, vol. 306, no. 1, pp. 18–24. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00035-1](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00035-1)
13. Ferko B., Stasakova J., Sereinig S., Romanova J., Katinger D., Niebler B., Katinger H., Egorov A. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *Virology*, 2001, vol. 75, no. 19, pp. 8899–8908. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.19.8899-8908.2001>
14. Takasuka N., Enami M., Itamura S., Takemori T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 11–12, pp. 1579–1585. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00491-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00491-1)
15. Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D., Grassauer A., Alexandrova G., Katinger H., Muster T. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *Journal of Virology*, 1998, vol. 72, no. 8, pp. 6437–6441 <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6437-6441.1998>

16. Li J., Hou G., Wang Y., Wang S., Peng C., Yu X., Jiang W. Influenza Viral Vectors Expressing Two Kinds of HA Proteins as Bivalent Vaccine Against Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses of Clade 2.3.4.4 H5 and H7N9. *Frontiers in Microbiology*, 2018, vol. 9, art. 604. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00604>

17. Korol' O. I. Tuberculosis in children and the possibilities of its prevention. *Tuberkulez. Problemy diagnostiki, lecheniya i profilaktiki: trudy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, 13–14 noyabrya 2003 goda* [Tuberculosis. Problems of diagnostics, treatment and prevention: proceedings of the All-Russian scientific and practical conference, November 13–14, 2003]. Saint Petersburg, 2003, pp. 100–104 (in Russian).

18. Medunitsyn N. V., Pokrovskii V. I. Fundamentals of immunoprophylaxis and immunotherapy of infectious diseases. *Study guide*. Moscow, Geotar-Media Publ., 2005. 528 p. (in Russian).

19. Meikle V., Alito A., Llera A. S., Gioffré A., Peralta A., Buddle B. M., Cataldi A. Identification of Novel *Mycobacterium bovis* Antigens by Dissection of Crude Protein Fractions. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009, vol. 16, no. 9, pp. 1352–1359. <https://doi.org/10.1128/cvi.00211-09>

20. Pollock J. M., Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, vol. 175, no. 5, pp. 1251–1254. <https://doi.org/10.1086/593686>

21. Chang-hong Sh., Wang X.-W., Zhang H., Zhang T.-F., Wang L.-M., Xu Zh.-K. Immune responses and protective efficacy of the gene vaccine expressing Ag85B and ESAT6 fusion protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA and Cell Biology*, 2008, vol. 27, no. 4, pp. 199–207. <https://doi.org/10.1089/dna.2007.0648>

Информация об авторах

Абай Жандос Сайлаубекулы – магистр естеств. наук, мл. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: abaizh097@mail.ru

Садикалиева Сандугаши Оразбековна – магистр естеств. наук, ст. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: sadikalieva86@mail.ru

Шораева Камшат Абитхановна – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: k.a.shorayeva@mail.ru

Еспембетов Болат Аманбаевич – канд. ветеринар. наук, профессор, заведующий лабораторией. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: espembetov@mail.ru

Нурпейсова Айнура Султановна – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (ул. Б. Момышулы, 15, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан). E-mail: ainurnurpeisova@mail.ru

Information about the authors

Zhandos S. Abay – Master of Natural Sciences, Junior Researcher. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: abaizh097@mail.ru

Sandugash O. Sadikalieva – Master of Natural Sciences, Senior Researcher. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: sadikalieva86@mail.ru

Kamshat A. Shorayeva – Ph. D. (Chem.), Head of the Laboratory. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: k.a.shorayeva@mail.ru

Bolat A. Espembetov – Ph. D. (Veterinary), Professor, Head of the Laboratory. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: espembetov@mail.ru

Ainur S. Nurpeisova – Ph. D. (Veterinary), Leading Researcher. Scientific Research Institute of Biological Safety Problems (15, Momysuly Str., 080409, Guardeyskii, Republic of Kazakhstan). E-mail: ainurnurpeisova@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 581.552:57.055
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-47-54>

Поступила в редакцию 03.11.2022
 Received 03.11.2022

Ю. К. Виноградова¹, Е. В. Спиридович², В. Н. Решетников²

¹Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Москва, Российская Федерация

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ ПРОТОКОЛОВ ОЦЕНКИ И КОНТРОЛЯ ИНВАЗИОННЫХ ВИДОВ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ

Аннотация. Изучение инвазионных чужеродных видов проводится в широком масштабе, поскольку экономический и экологический ущерб, наносимый биологическими инвазиями, огромен. Однако до сих пор не выработан единый подход к описанию инвазионных популяций. В рамках инвентаризации чужеродных растений впервые разработан «Протокол оценки инвазионных видов», который является инструментом для оценки, категоризации и внесения в «black»-листы инвазионных чужеродных видов растений в соответствии с их воздействием на аборигенные виды и природное биоразнообразие на большой географической территории. Протокол содержит пять основных элементов инвентаризации: 1) таксономическая принадлежность, жизненная форма и естественный ареал вида; 2) экологическое воздействие; 3) текущее распространение и численность популяции; 4) тенденции изменения площади и численности популяции; 5) возможность контроля расселения данного вида. Протокол представлен в виде бланка описания локальной инвазионной популяции. Описание очень краткое, но при необходимости в него можно внести дополнительную информацию о процессе инвазии того или иного чужеродного вида. Предложены специфические дополнения к протоколу для различных объектов (местообитаний): железных дорог, интродукционных учреждений, особо охраняемых природных территорий (ООПТ). Приведены примеры использования протокола при инвентаризации инвазионных видов на Транссибирской магистрали, в Главном ботаническом саду им. Н. В. Цицина РАН (Москва, Россия) и на некоторых ООПТ.

Ключевые слова: инвазия, чужеродные виды, бланк описания, протокол, экологическое воздействие, железная дорога, ботанический сад, особо охраняемые природные территории

Для цитирования: Виноградова, Ю. К. Особенности разработки протоколов оценки и контроля инвазионных видов для различных типов растительных сообществ / Ю. К. Виноградова, Е. В. Спиридович, В. Н. Решетников // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 47–54. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-47-54>

Yulia K. Vinogradova¹, Alena V. Spiridovich², Vladimir N. Reshetnikov²

¹N. V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

FEATURES OF DEVELOPMENT OF INVASIVE SPECIES ASSESSMENT AND CONTROL PROTOCOLS FOR DIFFERENT GROUPS OF PLANT COMMUNITIES

Abstract. The study of invasive alien species is carried out on a large scale because the economic and ecological damage caused by biological invasions is enormous. However, no unified approach to describing invasive populations has been developed so far. In the framework of alien plant inventory in Russia, the authors have developed the “Invasive Species Assessment Protocol”, which is a tool for assessing, categorizing and including in the “black”-lists any invasive alien plant species according to its impact on native species and natural biodiversity over a large geographic area. “The Protocol” contains five basic elements of the inventory: 1) taxonomic affiliation, life form, and natural range of species; 2) ecological impact; 3) current distribution and population size; 4) trends in abundance of populations or its size; and 5) ability to control alien species dissemination. “Protocol” is presented as the special blank for description of local invasive population. The description is very brief but, if necessary, additional information about the process of invasion of each alien species can be added to it. Specific additions to the protocol for some national economic objects: railroads, introduction institutions, Specially Protected Natural Areas (SPNA) are offered. Examples of using the Protocol during the inventory of invasive species on the Trans-Siberian Railway, in the NV Tsitsin Main Botanical Garden, and in the some Protected Natural Areas are given.

Keywords: invasion, alien species, description form, protocol, ecological impact, railroad, botanical garden, protected areas

For citation: Vinogradova Yu. K., Spiridovich A. V., Reshetnikov V. N. Features of development of invasive species assessment and control protocols for different groups of plant communities. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 47–54 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-47-54>

Введение. Изучение инвазионных видов ведется в настоящее время в масштабах всей планеты [1–4]. И это неудивительно, поскольку экономический и экологический ущерб, наносимый биологическими инвазиями, огромен. В Европе общие затраты на контроль инвазионных видов составили в 2020 г. 116,61 млрд евро [5]. На территории России экономический ущерб от инвазионных видов оценивается не менее чем в 1,38 трлн рублей [6].

Результаты инвентаризации инвазионных видов представлены в многочисленных статьях и научных отчетах [7]. Ежегодно проводятся конференции по проблеме инвазионных видов в рамках программ Neobiota, EMAPi (Ecology and Management of Alien Plant invasions), Weeds, NAISMA (North American Invasive Species Management) и др. [8].

В связи с этим актуальным (и вместе с тем наипростейшим) является вопрос о создании минимальных стандартов картирования инвазионных видов для повышения возможности обмена картографической информацией. Необходимо, чтобы основная информация об инвазионных видах была совместима с информацией организаций разных юрисдикций. Поэтому для того, чтобы инвентаризация вида была объективной и систематической, целью нашей работы стала подготовка «Протокола оценки инвазионных видов», который является инструментом для оценки, категоризации и внесения в «black»-листы инвазионных чужеродных видов растений в соответствии с их воздействием на аборигенные виды и природное биоразнообразие на большой географической территории.

Материалы и методы исследования. Для разработки протокола использованы бланки классических геоботанических описаний, зарубежные литературные источники и собственные заметки, сделанные в ходе многочисленных экспедиционных поездок для изучения инвазионных популяций. Протокол разработан впервые и одобрен участниками Международного научного семинара «Стратегии и методы ботанических садов по сохранению и устойчивому использованию биологического разнообразия природной флоры – VII».

Результаты и их обсуждение. Протокол контроля инвазионных видов растений содержит пять основных элементов инвентаризации (см. рисунок): таксономическая принадлежность, жизненная форма и естественный ареал вида, экологическое воздействие, текущее распространение и численность популяций, тенденции изменения современного распространения и численности популяций, возможность контроля численности данного вида.

Протокол рекомендуется заполнять на каждую спонтанную инвазионную популяцию чужеродного вида. Рассмотрим каждый элемент подробнее.

1. Таксономическая принадлежность, жизненная форма и естественный ареал вида.

1.1 – латинское название вида, выверенное по базе данных World Flora Online [9]. Рекомендован сбор гербарного материала для верификации определения.

1.2 – естественный ареал вида.

1.3 – жизненная форма по упрощенной классификации (дерево/кустарник/травянистое многолетнее корневищное растение/травянистое многолетнее стержнекорневое растение/малолетнее травянистое растение).

1.4 – репродуктивная характеристика (семенное/вегетативное размножение).

1.5 – пункт произрастания чужеродного инвазионного вида (с географическими координатами).

1.6 – дата находки и коллектор инвазионного вида.

1.7 – фенофаза. Указание фенологических аспектов в сочетании с другими данными помогает выработать соответствующие меры борьбы с видом или может быть включено в программы моделирования и помочь будущим исследователям в определении сроков жизненного цикла для данного вида в конкретном местообитании.

2. Экологическое воздействие.

2.1 – площадь, занятая инвазионным видом.

2.2 – характеристика местообитания. Определение типа экосистемы может содержать данные про тип почвы, климат/погодные условия. Обязательно прописать название растительного сообщества, желательно с указанием доминантов каждого яруса. Сведения об экосистеме, где в настоящее время встречается инвазионный вид, могут быть использованы в будущем при моделировании потенциального распространения видов. Документирование экосистемы может

помочь также в идентификации видов, поскольку многие виды заселяют только определенные территории.

2.3 – оценка воздействия вида на экосистему (по четырехбалльной шкале):

вид оказывает существенное воздействие на экосистемные процессы и общесистемные параметры;

вид воздействует на структуру растительного сообщества;

вид воздействует на флористический состав фитоценоза;

вид воздействует на отдельные виды аборигенных растений;

2.4 – природоохранное значение сообществ и аборигенных видов, находящихся под угрозой.

3. Текущее распространение и численность популяций.

3.1 – статус инвазионной популяции (оценка по трехбалльной шкале):

Инвазионная популяция № _____

- 1.1 – латинское название вида _____
- 1.2 – естественный ареал вида _____
- 1.3 – жизненная форма: дерево кустарник
 травянистое многолетнее корневищное растение травянистое многолетнее стержнекорневое растение
 одно-двулетник
- 1.4 – размножение: семенное вегетативное
- 1.5 – географические координаты N _____ E _____
- 1.6 – дата находки: « _____ » 20____ коллектор (ФИО) _____
- 1.7 – фенофаза: вегетирует цветет
 плодоносит вегетирует после плодоношения
- 2.1 – площадь, занятая инвазионным видом, м² _____
- 2.2 – почва _____
 доминанты фитоценоза _____
- 2.3 – оценка воздействия вида на экосистему:
 оказывает существенное воздействие на экосистемные процессы
 воздействует на структуру растительного сообщества
 воздействует на флористический состав фитоценоза
 воздействие на отдельные виды аборигенных растений
- 2.4 – природоохранное значение x сообществ и аборигенных видов, находящихся под угрозой (редкие растения, ООПТ) _____
- 3.1 – статус инвазионной популяции:
 интродукционная
 спонтанная натурализовавшаяся
 сокращающая численность (например, в результате химической/механической обработки или применения агентов биологического контроля)
- 3.2 – доля ювенильных, имматурных и генеративных особей: Ю И Г
- 3.3 – площадь ареала вида в регионе _____
- 3.4 – доля занимаемой видом площади, на которой он негативно влияет на биоразнообразие _____
- 3.5 – разнообразие местообитаний, в которые внедряется инвазионный вид _____
- 4.1 – текущая тенденция изменения вторичного ареала в регионе или изменение численности популяций _____
- 4.2 – доля потенциального ареала, занятая в настоящее время _____
- 4.3 – возможность расселения на большие расстояния в пределах региона _____
- 4.4 – способность вида вторгаться в природоохранные зоны и другие места обитания местных видов _____
- 4.5 – способность вида вторгаться в природоохранные зоны в других регионах _____
- 5.1 – общая сложность контроля численности вида _____
- 5.2 – минимальные денежные и временные затраты на борьбу с данным видом _____
- 5.3 – доступность территории, на которую вторгся инвазионный вид _____
- 5.4 – статус популяции по применяемым мерам борьбы:
 1) инвазионная популяция обнаружена, борьба с видом не проведена
 2) инвазионная популяция обнаружена, и на ней во время исследования проведен метод борьбы с инвазионным видом (химический, механический и др.)
 3) инвазионная популяция, на которой ранее был осуществлен какой-либо метод борьбы с инвазионным видом

Бланк описания инвазионной популяции

Description form of the invasive population

интродукционная = популяция чужеродного вида не является (пока) самоподдерживающейся; спонтанная натурализовавшаяся (самоподдерживающаяся) популяция; сокращающаяся численность инвазионная популяция.

В данном документе предполагается, что исчезновение локальной популяции произошло в результате вмешательства человека (например, в результате химической/механической обработки или применения агентов биологического контроля).

3.2 – соотношение иматурных и генеративных особей в популяции.

3.3 – площадь ареала вида в регионе.

3.4 – доля занимаемой видом площади, на которой он негативно влияет на биоразнообразие.

3.5 – разнообразие местообитаний, в которые внедряется инвазионный вид.

4. Тенденции изменения современного распространения и численности популяций.

4.1 – текущая тенденция изменения вторичного ареала в регионе или изменение численности популяций.

4.2 – доля потенциального ареала, занятая в настоящее время.

4.3 – возможность расселения на большие расстояния в пределах региона.

4.4 – способность вида вторгаться в природоохранные зоны и другие места обитания местных видов.

4.5 – способность вида вторгаться в природоохранные зоны в других регионах.

5. Возможность контроля численности данного вида.

5.1 – общая сложность управления расселением вида.

5.2 – минимальные денежные и временные затраты на борьбу с данным видом.

5.3 – доступность территории, на которую вторгся инвазионный вид.

5.4 – статус популяции по применяемым мерам борьбы. Этот пункт позволяет указать, является ли популяция объектом, на котором проводится борьба с инвазионным видом (оценка по трехбалльной шкале):

инвазионная популяция обнаружена, борьба с инвазионным видом не проведена;

инвазионная популяция обнаружена, и на ней во время исследования проведен какой-либо метод борьбы с инвазионным видом (химический, механический и др.);

инвазионная популяция, на которой ранее был осуществлен какой-либо метод борьбы с инвазионным видом.

Это позволит последующим пользователям данных знать, что проводилось – мониторинг или какая-либо обработка популяции.

Знакомство с другими аналогичными протоколами [10, 11] показало, что они излишне детальны и составление их занимает очень много времени, которое исследователь «отрывает» от времени полевых наблюдений. Руководство к использованию этого протокола, например, представляет собой брошюру из 40 страниц. Предлагаемый же нами протокол максимально удобен для использования, но при этом содержит всю информацию, необходимую на каждом уровне управления инвазионными видами – от местного до регионального, национального и международного. Работа в соответствии с этим протоколом необходима для совместимости с большинством существующих инвентаризаций инвазионных видов. Вместе с тем минимальные стандарты данного протокола ни в коей мере не препятствуют сбору дополнительной информации о процессе инвазии того или иного чужеродного вида.

Для различных типов растительных сообществ требуется своя (особая) дополнительная информация. Поскольку в последнее десятилетие мы работали главным образом с тремя различными объектами (железные дороги, интродукционные учреждения, ООПТ), попытаемся кратко охарактеризовать специфику протоколов контроля инвазионных видов именно для них.

Железные дороги. На структуру «железнодорожной флоры» влияют не только климатические, но и социально-экономические факторы (интенсивность движения, объем перевозок, расстояние от районов застройки населенных пунктов, уровень урбанизации населенного пункта и др.). Поэтому важно отражать эти данные в протоколе. При изучении флоры Транссибирской магистрали на основании таких данных нами, например, был сделан вывод [12], что по снижению значимости влияния на локальную «железнодорожную флору» социально-экономические

факторы располагаются в ряду: пассажиропоток → плотность населения → численность населения → площадь населенного пункта. Крайне незначительно влияние социально-экономических факторов на численность аборигенных видов растений «железнодорожной флоры» и на численность малолетних видов (как аборигенных, так и чужеродных).

Кроме того, на железных дорогах меры борьбы с инвазионными видами различаются в зависимости от местообитания. На полотне используют неспецифические гербициды, на откосах предпочтительнее кошение, в дренажных канавах – механическое удаление растений. Следовательно, в протоколе необходимо отразить и конкретное местообитание инвазионного вида.

Ботанические сады. В ботанических садах (например, в Главном ботаническом саду им. Н. В. Цицина РАН, ГБС РАН) применяется классификация интродуцированных видов по статусам инвазионной активности [13]. Эти статусы описаны в таблице. По данной методике составлены списки чужеродных видов спонтанной флоры ГБС РАН и некоторых других ботанических садов: городов Минска [14], Батуми [15], а также Воронежского [16], Тверского [17] и Калининградского [18] государственных университетов.

Дополнительная информация в протоколах контроля инвазионных видов для некоторых местообитаний
Additional information in the control protocols of invasive species for some habitats

Железные дороги	Интродукционные учреждения	ООПТ
I. Местообитание: на перегоне на грузовой станции на пассажирской станции в городе на пассажирской станции в поселке на пассажирской станции в селе	Статус 1 – чужеродный вид, массово распространенный как на территории ГБС РАН, так и за ее пределами	Вид отмечен только на кордоне
II. Подробная характеристика местообитания: железнодорожное полотно откосы дренажная канава прилегающая территория на расстоянии до 5 м от железной дороги	Статус 2 – вид, активно расселяющийся по территории ГБС РАН, не занятой коллекцией Статус 3 – вид, сформировавший локальные спонтанные популяции вне коллекции, а в случае вегетативного разрастания – устойчивые клоны, утратившие физическую связь с материнскими растениями Статус 4 – вид, хотя бы единожды отмеченный вне коллекционного участка	Хотя бы несколько растений отмечено в естественных ценозах Сформировались устойчивые инвазионные популяции

В ГБС РАН подобные исследования проводятся не только в целом по саду, но и на отдельных экспозициях. Так, изучен инвазионный потенциал растений экспозиции флоры Кавказа [19]. Для выявления признаков, способствующих потенциальному успеху инвазии, проведено сравнение натурализовавшихся и ненаатурализовавшихся видов. Из преднамеренно интродуцированных в течение 76 лет 1246 таксонов успешно натурализовались 57 (4,5 %) видов, а реально «сбежали» за пределы экспозиции 12 (менее 1 %). За три года, прошедшие с предыдущей ревизии, еще 17 видов перешли в фазу натурализации. Наибольшую степень натурализации проявили виды семейств *Apiaceae* и *Uraginaceae*. В наибольшей степени приспособились к условиям Москвы представители субальпийского высокогорья и лесных сообществ Кавказа. Ни один вид, приуроченный к полупустыням, аридным редколесьям, нагорно-ксерофитным сообществам, степям, альпийским лугам, высокогорным скалам и осыпям и субтропическим лесам Колхиды и Талыша, не стал инвазионным. Среди натурализующихся растений преобладали коротко- и длиннокорневищные многолетние травянистые растения.

Сделан вывод, что наибольшую вероятность трансформации из преднамеренно интродуцированных растений в инвазионные имеют следующие виды:

диаспоры которых получены из других интродукционных учреждений, а не из естественного ареала;

представители субальпийского высокогорья и лесного пояса гор Центрального и Западного Кавказа;

представители семейств *Apiaceae*, *Caprifoliaceae*, *Asteraceae*, *Asparagaceae*;

короткорневищные многолетние травянистые растения, способные самовозобновляться как семенным, так и вегетативным способом.

Культивируемые растения, обладающие всем этим комплексом признаков, требуют повышенных мер контроля их расселения. Результаты анализа инвазионной активности видов Кавказа будут использованы для предотвращения введения в культуру агрессивных чужеродных растений и разработки научно обоснованного подхода к экспонированию растений.

ООПТ. В Российской Федерации, в отличие от многих стран мира, борьба с чужеродными видами на ООПТ законодательно не разрешена. Неоднократные обращения ученых РАН в Минприроды пока не привели к действенным результатам. Мероприятия по уничтожению инвазионных видов сотрудниками ООПТ проводятся разово (например, для уничтожения того же борщевика или амброзии) и требуют многочисленных согласований с местной администрацией [20]. Не сомневаемся, что такой подход скоро изменится, потому что именно на ООПТ особенно актуальна борьба с инвазионными видами. На сохранение каких экотопов тратятся деньги? Ведь не на мертвопокровные же кленовики из *Acer negundo*! Поэтому нельзя допускать преднамеренной интродукции чужеродных декоративных растений для озеленения территорий кордонов заповедников, а следует активнее воздействовать на местную администрацию для проведения кампаний по изъятию всех инвазионных растений из естественных ценозов, как это практикуется в других странах [21].

Заключение. Впервые разработан «Протокол оценки инвазионных видов», который является инструментом для оценки, категоризации и внесения в «black»-листы инвазионных чужеродных видов растений в соответствии с их воздействием на аборигенные виды и природное биоразнообразие. Раскрыта специфика и перечислена дополнительная информация, которую следует учитывать при проведении исследований на железной дороге, в интродукционных учреждениях и на особо охраняемых природных территориях.

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания ГБС РАН «Инвазионные растения России: инвентаризация, биоморфологические особенности и эффективные методы контроля расселения» (№ 19-122042600141-3) при поддержке гранта РФФИ 19-54-26010.

Acknowledgements. The work is carried out within the framework of the state task of the NV Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences “Invasive plants of Russia: inventory, biomorphological features and effective methods of dispersal control” (No. 19-122042600141-3) supported by the RFBR grant 19-54-26010.

Список использованных источников

1. Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species / ed. D. Pimentel. – Boca Raton : CRC Press, 2002. – 369 p.
2. Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species / ed. D. Pimentel. – 2nd ed. – Boca Raton : CRC Press, 2011. – 449 p.
3. Encyclopedia of biological invasions / ed. : D. Simberloff, M. Rejmánek. – Berkeley; Los Angeles; London : Univ. of California Press, 2011. – 765 p.
4. Impact of biological invasions on ecosystem services / eds. : M. Vilà, Ph. Hulme. – Cham : Springer, 2017. – 354 p.
5. Economic costs of invasive alien species across Europe / Ph. J. Haubrock [et al.] // NeoBiota. – 2021. – Vol. 67. – P. 153–190. <https://doi.org/10.3897/neobiota.67.58196>
6. Economic costs of biological invasions in terrestrial ecosystems in Russia / N. Kirichenko [et al.] // NeoBiota. – 2021. – Vol. 67. – P. 103–130. <https://doi.org/10.3897/neobiota.67.58529>
7. An inventory of alien species and their threat to biodiversity and economy in Switzerland. CABI Bioscience Switzerland Centre report to the Swiss Agency for Environment, Forests and Landscape. The environment in practice no. 0629 / ed. R. Wittenberg. – Bern : Federal Office for the Environment, 2005. – 155 p.
8. NEOBIOTA 2022 : Book of abstracts 12th International conference on biological invasions biological invasions in a changing world, Tartu, Estonia 12–16 September 2022 / ed. M. Linder. – Tartu : Estonian Naturalists' Society, 2022. – 156 p.
9. World Flora Online [Electronic resource]. – Available at: <http://www.worldfloraonline.org> (accessed October 15, 2022).
10. An Invasive Species Assessment Protocol: Evaluating Non-Native Plants for Their Impact on Biodiversity. Version 1 / L. E. Morse [et al.] // NatureServe, Arlington, Virginia, 2004. – 40 p.
11. The Invasive Species Assessment Protocol: A Tool for Creating Regional and National Lists of Invasive Nonnative Plants That Negatively Impact Biodiversity / J. M. Randall [et al.] // Invasive Plant Sci. Management. – 2008. – Vol. 1, N 1. – P. 36–49. <https://doi.org/10.1614/IPSM-07-020.1>
12. Котенко, О. В. Влияние социально-экономических факторов на флору Амурского участка Транссибирской магистрали / О. В. Котенко, Ю. К. Виноградова // Соц.-эколог. технологии. – 2022. – Т. 12, № 3. – С. 16–21.
13. Виноградова, Ю. К. Спонтанная флора территории Главного ботанического сада как отражение динамики внедрения чужеродных видов растений в естественные экосистемы / Ю. К. Виноградова, С. Р. Майоров, И. О. Яценко. – М. : Т-во науч. изданий КМК. – 2020. – 385 с.

14. Растения, которые дичают в ЦБС НАН Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://hbc.bas-net.by/hbcinfo/wildingmi.php> . – Дата доступа: 15.10.2022.
15. Гваришвили, Н. Коллекция ботанического сада как источник инвазивных видов / Н. Гваришвили, Н. Ломтатидзе // Роль ботанических садов в сохранении биоразнообразия растений : материалы юбил. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Батум. бот. сада. (Батуми, 8–10 мая 2013 г.). – Батуми, 2013. – Ч. 1. – С. 69–71.
16. Лепешкина, Л. А. Спонтанная флора ботанического сада Воронежского государственного университета / Л. А. Лепешкина. – Воронеж : Науч. книга, 2017. – 97 с.
17. Нотов, А. А. Некоторые результаты анализа инвазионной активности видов в ботаническом саду Тверского государственного университета / А. А. Нотов, В. А. Нотов // Проблемы изучения адвентивной и синантропной флор России и стран ближнего зарубежья : материалы IV Междунар. науч. конф. (Ижевск, 4–7 декабря 2012 г.) / под ред. О. Г. Барановой, А. Н. Пузырева. – Ижевск, 2012. – С. 154–157.
18. Губарева, И. Ю. Влияние интродукции растений на разнообразие естественной флоры и растительности Калининградской области / И. Ю. Губарева, Е. А. Глуховских // Роль ботанических садов в сохранении биоразнообразия растений : материалы юбил. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Батум. бот. сада (Батуми, 8–10 мая 2013 г.). – Батуми, 2013. – Ч. 1. – С. 66–69.
19. Соколова, В. В. Инвазионный потенциал растений экспозиции флоры Кавказа в Главном ботаническом саду им. Н. В. Цицина РАН / В. В. Соколова, М. И. Хомутовский, Ю. К. Виноградова // Рос. журн. биол. инвазий. – 2022. – № 4. – С. 20–28.
20. Виноградова, Ю. К. Клен ясенелистный (*Acer negundo* L.): морфология, биология и оценка инвазивности / Ю. К. Виноградова, С. Р. Майоров, М. В. Костина. – М. : Т-во науч. изданий КМК, 2022. – 218 с.
21. Виноградова, Ю. К. Теория и практика сохранения естественного биологического разнообразия / Ю. К. Виноградова, С. Р. Майоров, М. В. Костина // Систематические и флористические исследования северной Евразии : материалы Междунар. конф. (к 90-летию со дня рождения профессора А. Г. Еленевского), Москва, 5–8 дек. 2018 г. / под общ. ред. В. П. Викторова. – М., 2018. – Т. 1. – С. 140–143.

References

- Pimentel D. (ed.). *Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species*. Boca Raton, CRC Press, 2002. 369 p.
- Pimentel D. (ed.). *Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species. 2nd ed.* Boca Raton, CRC Press, 2011. 449 p.
- Simberloff D., Rejmánek M. (ed.). *Encyclopedia of biological invasions*. Berkeley; Los Angeles; London, University of California Press, 2011. 765 p.
- Vilà M., Hulme Ph. (ed.). *Impact of biological invasions on ecosystem services*. Cham, Springer, 2017. 354 p.
- Haubrock Ph. J., Turbelin A. J., Cuthbert R. N., Novoa A., Taylor N. G., Angulo E. [et al.]. Economic costs of invasive alien species across Europe. *NeoBiota*, 2021, vol. 67, pp. 153–190. <https://doi.org/10.3897/neobiota.67.58196>
- Kirichenko N., Haubrock P. J., Cuthbert R. N., Akulov E., Karimova E., Shneyder Y., Liu C., Angulo E., Diagne C., Courchamp F. Economic costs of biological invasions in terrestrial ecosystems in Russia. *NeoBiota*, 2021, vol. 67, pp. 103–130. <https://doi.org/10.3897/neobiota.67.58529>
- Wittenberg R. (ed.). *An inventory of alien species and their threat to biodiversity and economy in Switzerland. CABI Bioscience Switzerland Centre report to the Swiss Agency for Environment, Forests and Landscape. The environment in practice no. 0629*. Bern, Federal Office for the Environment, 2005. 155 p.
- NEOBIOTA 2022: *Book of abstracts 12th International Conference on Biological Invasions Biological Invasions in a Changing World Tartu, Estonia 12–16 September 2022*. Tartu, Estonian Naturalists' Society, 2022. 156 p.
- World Flora Online*. Available at: <http://www.worldfloraonline.org> (accessed 15.10.2022).
- Morse L. E., Randall J. M., N. Benton N., Hiebert R., Lu S. An Invasive Species Assessment Protocol: Evaluating Non-Native Plants for Their Impact on Biodiversity. Version 1. *NatureServe*, Arlington, Virginia, 2004. 40 p.
- Randall J. M., Morse L. E., Benton N., Hiebert R., Lu S., Killeffer T. The Invasive Species Assessment Protocol: A Tool for Creating Regional and National Lists of Invasive Nonnative Plants That Negatively Impact Biodiversity. *Invasive Plant Science and Management*, 2008, vol. 1, no. 1, pp. 36–49. <https://doi.org/10.1614/IPSM-07-020.1>
- Kotenko O. V., Vinogradova Yu. K. Influence of socio-economic factors on the flora of the Amur section of the Trans-Siberian Railway. *Social'no-ekologicheskie tekhnologii* [Socio-environmental technologies], 2022, vol. 12, no. 3, pp. 16–21 (in Russian).
- Vinogradova Yu. K., Maiorov S. R., Yatsenko I. O. *The spontaneous flora of the territory of the Main Botanical Garden as a reflection of the dynamics of alien plants invasion into natural plant communities*. Moscow, KMK Publ., 2020, p. 385 (in Russian).
- Plants that run wild in the Central Library of the National Academy of Sciences of Belarus*. Available at: <http://hbc.bas-net.by/hbcinfo/wildingmi.php> (accessed 15.10.2022) (in Russian).
- Gvarishvili N., Lomtadze N. The botanical garden collection as a source of invasive species. *Rol' botanicheskikh sadov v sokhranenii bioraznobraziya rastenii : materialy yubileynoi Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 100-letiyu Batumskogo botanicheskogo sada (Batumi, 8–10 maya 2013). Chast' 1* [The role of botanical gardens in the conservation of plant biodiversity: materials of the anniversary international scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the Batumi Botanical Garden (Batumi, May 8–10, 2013). Pt. 1]. Batumi, 2013, pp. 69–71 (in Russian).

16. Lepeshkina L. A. *Spontaneous flora of the botanical garden of Voronezh State University*. Voronezh, Nauchnaya kniga Publ., 2017. 97 p. (in Russian).

17. Notov A. A., Notov V. A. Some results of the analysis of invasive activity of species in the botanical garden of Tver State University. *Problemy izucheniya adventivnoi i sinantropnoi flor Rossii i stran blizhnego zarubezh'ya: materialy IV Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (Izhevsk, 4–7 dekabrya 2012)* [Problems of studying the adventive and synanthropic floras of Russia and neighboring countries: materials of the IV International scientific conference (Izhevsk, December 4–7, 2012)]. Izhevsk, 2012, pp. 154–157 (in Russian).

18. Gubareva I. Yu., Gluhovskii E. A. Impact of plant introduction on the diversity of natural flora and vegetation of the Kaliningrad region. *Rol' botanicheskikh sadov v sokhranении bioraznoobraziya rastenii : materialy yubileynoi Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 100-letiyu Batumskogo botanicheskogo sada (Batumi, 8–10 maya 2013). Chast' I* [The role of botanical gardens in the conservation of plant biodiversity: materials of the anniversary international scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the Batumi Botanical Garden (Batumi, May 8–10, 2013). Pt. 1]. Batumi, 2013, pp. 66–69 (in Russian).

19. Sokolova V. V., Khomutovskii M. I., Vinogradova Yu. K. Invasive potential of plants of the Caucasian flora exposition in the N. V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii = Russian journal of biological invasions*, 2022, no. 4, pp. 20–28 (in Russian).

20. Vinogradova Yu. K., Maiorov S. R., Kostina M. V. *Ash maple (Acer negundo L.): morphology, biology and assessment of invasiveness*. Moscow, KMK Publ., 2022. 218 p. (in Russian).

21. Vinogradova Yu. K., Maiorov S. R., Kostina M. V. Theory and Practice of Natural Biodiversity Conservation. *Sistemicheskie i floristicheskie issledovaniya Severnoi Evrazii: materialy II Mezhdunarodnoi konferentsii (k 90-letiyu so dnya rozhdeniya professora A. G. Elenevskogo) (Moskva, 5–8 dekabrya 2018). Tom I* [Systematic and floristic studies of Northern Eurasia: materials of the II International conference (on the 90th anniversary of the birth of Professor A. G. Elenevski) (Moscow, December 5–8, 2018). Vol. 1]. Moscow, 2018, pp. 140–143 (in Russian).

Информация об авторах

Виноградова Юлия Константиновна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН (ул. Ботаническая, 4, 127276, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: gbsad@mail.ru

Спиродович Елена Владимировна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.spirydovich@gmail.com

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

Yulia K. Vinogradova – D. Sc. (Biol.), Chief Researcher. N. V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences (4, Botanicheskaya Str., 127276, Moscow, Russian Federation). E-mail: gbsad@mail.ru

Alena V. Spirydovich – 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: a.spirydovich@gmail.com

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). V.Reshetnikov@cbg.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

UDC 54.057:577.2

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-55-63>

Received 05.07.2022

Arshed Shihad, Aliaksei G. Sysa

*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus***ESTIMATION OF THE ACTIVITY OF MODIFIED PYRIMIDINE NUCLEOSIDE DERIVATIVES ON BACTERIA CELLS**

Abstract. The increase in prevalence of antimicrobial-resistant bacteria (ARB) is currently a serious threat, thus there is a need for new classes antimicrobial compounds to combat infections caused by these ARB. The growth inhibition ability of derivatives of the components of nucleic acids has been well-characterized but not for its antimicrobial characteristics. It was found that modified nucleosides arabinofuranosylcytosine (cytarabine, ara-C), [1-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)]uracil (TTU), and nucleotides cytarabine-5'-monophosphate (ara-CMP), and O²,2'-cyclocytidine-5'-monophosphate (cyclocytidine monophosphate, cyclo-CMP) were able to inhibit *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, and *Proteus mirabilis* strains in a time and dose dependent manner via killing kinetics assay. It was demonstrated that studied modified pyrimidine nucleosides derivatives enhanced the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) over time (validated via DCFA-DA probe assay). This study has revealed the mechanism of action of cytarabine, cyclocytidine monophosphate, and TTU as an antimicrobial agent for the first time, and has shown that these pyrimidine derivatives enhanced might be able to combat infections caused by *E. coli*, *S. lutea*, *B. cereus*, and *P. mirabilis* in the future.

Keywords: antibacterial activity, modified nucleosides, cytarabine, viability, oxidative stress, ROS

For citation: Shihad A., Sysa A. G. Estimation of the activity of modified pyrimidine nucleoside derivatives on bacteria cells. *Vesti Natsyynal'най akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 55–63. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-55-63>

А. Шихад, А. Г. Сыса

*Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь*

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ**

Аннотация. Широкое применение антибиотиков привело к возникновению и быстрому распространению резистентности у микроорганизмов, что обуславливает необходимость поиска новых классов антибактериальных препаратов. Хорошо известна способность производных компонентов нуклеиновых кислот ингибировать рост эукариотических клеток, однако их антимикробные свойства изучены недостаточно. Нами обнаружено, что модифицированные нуклеозиды арабинофуранозилцитозин (цитарабин, ara-C), [1-(2',3',5'-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-4-(1,2,4-триазол-1-ил)]урацил (ТТУ) и нуклеотиды цитарабин-5'-монофосфат (ара-СМР) и O²,2'-циклоцитидин-5'-монофосфат (циклоцитидинмонофосфат, цикло-СМР) способны ингибировать рост штаммов *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus* и *Proteus mirabilis*. Показано, что грамотрицательные бактериальные штаммы (*E. coli* и *P. mirabilis*) более чувствительны к воздействию ТТУ и цикло-СМР и менее чувствительны к воздействию ара-С и ара-СМР по сравнению с грамположительными. Наиболее эффективным ингибитором роста клеток грамположительных штаммов (*S. lutea*, *B. cereus*) оказался ара-СМР с ED₅₀ = 5,2–10⁻⁵ и ED₅₀ = 3,1·10⁻⁴ М соответственно. *S. lutea* оказалась наиболее чувствительным штаммом бактерий к воздействию всех изученных соединений. Установлено, что изученные модифицированные производные пириимидиновых нуклеозидов усиливают выработку внутриклеточных активных форм кислорода (АФК). Наибольшее повышение уровня АФК при культивировании клеток обнаружено в случае грамотрицательного штамма *E. coli* в присутствии ТТУ, а также цикло-СМР, что сильно коррелирует с эффектом ингибирования роста клеток. Обнаружена сильная корреляция между уровнем АФК и жизнеспособностью штамма *B. cereus* после культивирования с ара-СМР.

Ключевые слова: антибактериальная активность, модифицированные нуклеотиды, цитарабин, жизнеспособность, окислительный стресс, АФК

Для цитирования: Шихад, А. Оценка влияния модифицированных пириимидиновых производных нуклеиновых кислот на бактериальные клетки / А. Шихад, А. Г. Сыса // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 55–63 (на англ. яз.). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-55-63>

Introduction. The development of antibiotics into clinical practice heralded a new era in medicine. However, less than a century later, due to the rise in pathogenic microorganism resistance, the useful adequacy of anti-infection drugs is waning. Antibiotic resistance in microorganisms has emerged and spread quickly as a result of its widespread usage. These days, more and more well-known and novel bacterial strains are developing resistance to the medications being utilized. According to some, society is moving into a post-antibiotic period where even ordinary diseases or minor wounds might be fatal [1, 2]. According to the World Health Organization's 2020 report, there is a considerable increase in the prevalence of resistant microorganisms, which makes it much more difficult to treat diseases brought on not only by bacteria, but also by fungi, parasites and viruses [3]. Every year, about 700 thousand people die from infections caused by drug-resistant bacteria, and this number may rise to 10 million by 2050 [4].

A number of mechanisms can cause an microorganism to become resistant to an antibiotic, including changes in the receptor's structure, inactivation or degradation of the antibiotic by an enzyme (the oldest mechanism effective against β -lactams), inhibition of absorption, or active removal of the antibiotic from the cell. There might be more, different mechanisms [1]. The majority of resistance genes are plasmid-localized, which allows for their heredity and horizontal transmission to other bacteria. No of how an antibiotic works, there are currently cases of resistance for every class of antibiotics [5–7].

Before the 1970s of the previous century, the majority of the classes of antibiotics that are currently in use were discovered [8]. Due to the high time and financial requirements for bringing a medicine to market as well as the lack of effective methodologies for finding leading compounds, there has been a very low activity in the search for new antimicrobial compounds [9]. The vast majority of antibiotics now in use also have high cytotoxicity, which restricts the circumstances in which they can be used. It is clear that new classes of antibiotics must be quickly developed in order to tackle resistant strains of microbes and act on new targets.

Nucleic acid derivatives, such as nucleosides, nucleotides, and their analogs, are among the most promising groups of antibacterial substances. Numerous biological processes, such as the storage of genetic information, gene expression, energy consumption, and cell signaling, require these molecules. All living things, including bacteria, depend on these mechanisms to survive. One of the most significant types of medications used in clinics are nucleoside analogues. Antiviral and anticancer medications are the two most often used nucleoside analogues [10]. However, information about their efficiency against microbes has been accumulating recently. Currently, nucleosides isolated from natural sources and their synthesized equivalents have both shown inhibitory action [11–13]. Additionally, known nucleosides that have been or are now being utilized to treat various diseases have been revealed to possess antimicrobial characteristics [2, 14]. Clinical trials of nucleosides and/or nucleotides as antibacterial medicines are not well documented. Their discovery could be a crucial first step toward employing them as full-fledged antibiotics in this regard.

Materials and research methods. The used nucleosides and nucleotides were synthesized and characterized as described in our previous articles [15, 16].

Bacteria strains and culture. The bacterial strains used in the study were *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, and *Proteus mirabilis*. The bacterial colonies of different strains were transferred under aseptic conditions into a 10 mL Mueller-Hinton Broth (MHB) containing capped conical flask and incubated overnight at 37 °C. After 18–24 h of incubation, cells were centrifuged at 6000 rpm for 5 min, supernatant was discarded and cell pellet was resuspended in phosphate buffer solution (PBS) followed by centrifugation. This removed debris and a clean bacterial suspension was obtained followed by suspending cells in MHB. The absorbance of the bacterial suspension prepared was recorded by UV-Visible spectrophotometer at 600 nm (OD_{600}). The cells were adjusted in the range of 0.15 to 0.2 OD_{600} which was considered to have cells at a concentration of 10^8 cells/ml. This suspension was further diluted to obtain a concentration of 10^7 cells/ml for testing nucleosides/nucleotides activity.

Resazurin reduction assay. The resazurin metabolization experiments were performed in 96-well plates as described [17]. Briefly, a volume of 10 μ l of each suspension concentration was mixed with 200 μ l of resazurin at a concentration of 20 μ mol/l in phosphate buffered saline (PBS). The fluorescence (relative fluorescence units, RFU) of microbial-generated resorufin was recorded at $\lambda_{ex} = 520$ nm/ $\lambda_{em} = 590$ nm after in 60 min using a multi-detection microplate reader Synergy 4 (BioTek Instruments Inc.,

USA). Each concentration level was measured in hexaplicate and the mean \pm standard deviation was calculated. The percentage of survival was established for wells containing nucleosides/nucleotides relative to control wells containing no compounds.

Detection of reactive oxygen species (ROS). The production of ROS by bacterial strains after treatment with modified nucleosides/nucleotides was evaluated using indicator 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, UK), which can detect a broad range of ROS including nitric oxide and hydrogen peroxide. The adjusted bacterial culture (0.5 McFarland exponential phase bacteria culture) were treated with different concentrations of studied compounds in presence of DCFH-DA at a final concentration of 5 μ M in 0.85 % saline and incubated at 37 °C aerobically for 24 h. Untreated bacterial culture was served as a negative control. The fluorescence emission of DCFH-DA was measured at 525 nm using CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Germany) plate reader with an excitation wavelength of 485 nm. The background fluorescence of 0.85 % saline and auto fluorescence of the bacterial cells incubated without the probe was measured to calculate the net fluorescence emitted from the assay itself. Experiment was conducted in triplicate.

Statistical analysis. Bacterial survival data and associated nucleosides/nucleotides concentrations from resazurin and plating were then fit to a log-logistic model with four parameters (b, c, d, e) LL.4 using R (GraphPad Software, Inc.), affording the dose-response curves:

$$\varphi(x) = c + (d - c)/(1 + e^{b(\log x - \log e)}).$$

The estimated parameters of the models have a definite physical meaning. In particular, for the log-logistic model, the parameters c and d determine the lower and upper horizontal asymptotes of the sigmoid curve, e corresponds to the position of the inflection point, and $d - c$ – to the angle of inclination in the transition region. Fitting of model parameters to the analyzed empirical data was carried out using the generalized method of minimizing the sum of squares of deviations of model forecasts from the observed values, taking into account specially selected weight coefficients.

Statistical analysis of the estimated parameters was carried out using Student's t -test, which tested the hypothesis of the equality of each coefficient to zero and calculated p -values that determine the achieved level of significance. The statistical significance of the model as a whole was verified by comparing it with a simple regression with a zero slope coefficient (the horizontal regression line corresponds to the absence of dose-effect dependence) by ANOVA.

Research results. EC_{50} and killing kinetics studies of modified pyrimidine nucleosides/nucleotides. Killing kinetics was performed to evaluate the effect of different concentrations of modified nucleosides/nucleotides ara-C, ara-CMP, cyclo-CMP, and TTU on four bacterial strains for 24 h.

All studied modified pyrimidine nucleosides/nucleotides inhibit growth of exponential phase of all used bacterial strains in a dose and time dependent manner (Fig. 1–4).

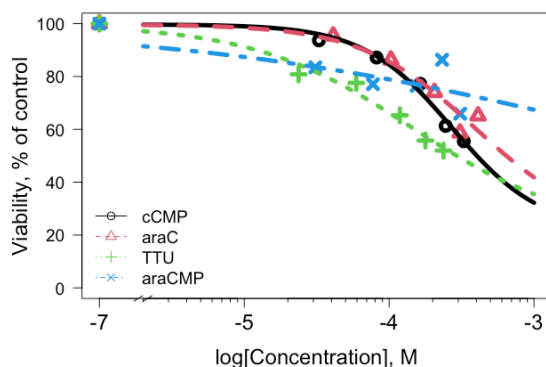


Fig. 1. Effect of different concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides against exponential phase *P. mirabilis* (incubated aerobically) at 37 °C for 24 h

P. mirabilis culture treated with $2.3 \cdot 10^{-4}$ M of TTU achieved 48 % reduction of bacteria cells growth after 24 h; while the other compounds treated with the same bacterial strain achieved : 45 % with $3.2 \cdot 10^{-4}$ M cCMP, 35 % of both $4.2 \cdot 10^{-4}$ M araC and $3.1 \cdot 10^{-4}$ M araCMP separately (Fig. 1). ED_{50} of the

compounds after cultivation with *P. mirabilis* consisted the minimal value of $1.4 \cdot 10^{-4}$ M for TTU, while the maximal ED_{50} value was calculated with $3.3 \cdot 10^{-4}$ M for araCMP. The effectiveness with respect to cCMP and araC were equal to $2.7 \cdot 10^{-4}$ M and $3.8 \cdot 10^{-4}$ M individually.

However, a different scenario was observed when *E. coli* was treated with the current compounds where the reduction achieved 80 % $3.2 \cdot 10^{-4}$ M cCMP, followed by 58 % reduction with $2.3 \cdot 10^{-4}$ M of TTU, then 75 % with $3.1 \cdot 10^{-4}$ M araCMP, and finally the reduction achieved 55 % with $4.2 \cdot 10^{-4}$ M araC (Fig. 2). So, ED_{50} value after *E. coli* cultivation was calculated as $1.6 \cdot 10^{-4}$ M cCMP, $1.5 \cdot 10^{-4}$ M TTU, and $2 \cdot 10^{-4}$ M for both araC and araCMP.

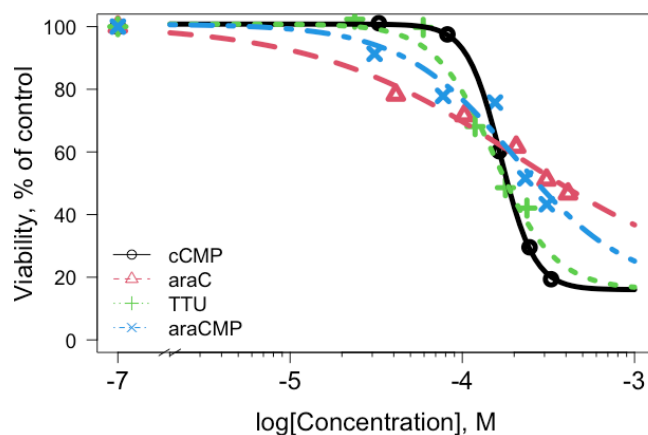


Fig. 2. Effect of different concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides against exponential phase *E. coli* (incubated aerobically) at 37 °C for 24 h

S. lutea culture treated with the compounds achieved the highest percent cultivation from others bacterial strains where *S. lutea* culture treated with $3.1 \cdot 10^{-4}$ M araCMP achieved 91 % reduction of bacteria cells growth after 24 h; while the other compounds treated with the same bacterial strain achieved: 90 % with $4.2 \cdot 10^{-4}$ M araC, 86 % of $2.3 \cdot 10^{-4}$ M of TTU, and 84 % of $3.2 \cdot 10^{-4}$ M cCMP separately (Fig. 3). ED_{50} of the compounds after cultivation with *S. lutea* consisted the minimal value of $5.6 \cdot 10^{-4}$ M for araCMP, while the maximal ED_{50} value was calculated with $1.6 \cdot 10^{-4}$ M for both araCMP and cCMP. The effectiveness with respect to TTU were equal to $1.1 \cdot 10^{-4}$ M.

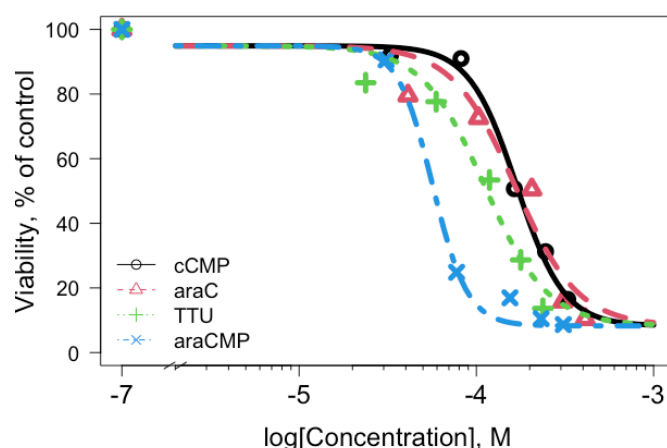


Fig. 3. Effect of different concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides against exponential phase *S. lutea* (incubated aerobically) at 37 °C for 24 h

B. cereus culture treated with the compounds achieved the lowest percent cultivation from others bacterial strains where *B. cereus* culture treated with $3.1 \cdot 10^{-4}$ M araCMP achieved 59 % reduction of bacteria cells growth after 24 h; while the other compounds treated with the same bacterial strain

achieved: 47 % with $4.2 \cdot 10^{-4}$ M araC, 35 % of $3.2 \cdot 10^{-4}$ M cCMP, and 25 % of $2.3 \cdot 10^{-4}$ M of TTU respectively (Fig. 4). ED₅₀ of the compounds after cultivation with *B. cereus* consisted the minimal value of $2.5 \cdot 10^{-4}$ M for araC, while the maximal ED₅₀ value was calculated with $8.1 \cdot 10^{-4}$ M for both araC. The effectiveness with respect to TTU and Ccmp were equal to $4.8 \cdot 10^{-4}$ M and $7.1 \cdot 10^{-4}$ M individually.

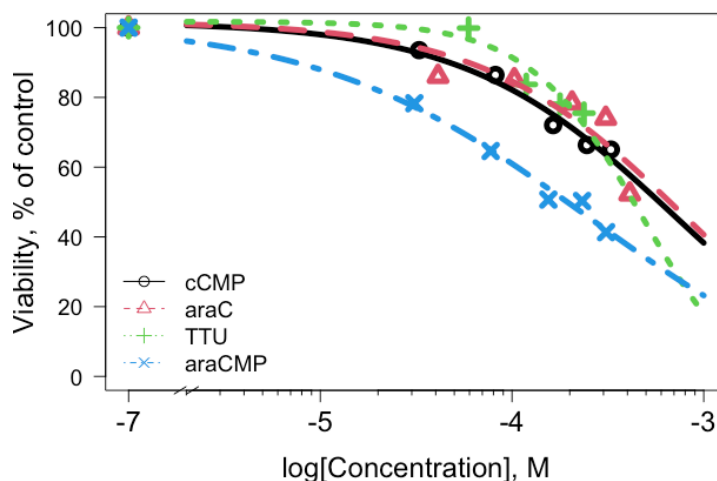


Fig. 4. Effect of different concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides against exponential phase *B. cereus* (incubated aerobically) at 37 °C for 24 h

Effect of modified pyrimidine nucleosides/nucleotides on the enhancement of ROS production.

It was hypothesized that in presence of modified pyrimidine nucleosides/nucleotides, the formation of ROS was enhanced in *E. coli*, *S. lutea*, *B. cereus*, and *P. mirabilis* which can damage the iron-sulphur clusters, thereby releasing ferrous ion. This iron can react with hydrogen peroxide in the Fenton reaction, causing a chain reaction, generating hydroxyl radicals which can directly damage intracellular DNA, lipids and proteins. Hence to validate the hypothesis, the intracellular ROS in all used bacteria strains was quantified prior and after modified pyrimidine nucleosides/nucleotides treatment in the subsequent experiments.

The production of ROS in healthy untreated bacterial cells is a natural side effect of aerobic respiration. These ROS can damage the RNA/DNA pool and also oxidizes lipid contents. Thus to protect themselves against the detrimental effect of ROS, bacteria are capable of producing enzymes (catalase and superoxide dismutase) to detoxify the ROS and having regulatory mechanisms (SoxRS, OxyRS and SOS regulons) to counteract the damage. To determine the effect of modified pyrimidine nucleosides/nucleotides on the enhancement of ROS production, *E. coli*, *S. lutea*, *B. cereus*, and *P. mirabilis* was treated with the same concentrations of studied compounds in presence of DCFH-DA, an unspecific probe for ROS. It was shown that the ROS production in bacteria strains was enhanced in a dose dependent manner when treated with all studied compounds.

The highest ROS level increase after cultivating with *P. mirabilis* was araC that is highly correlated with the growth inhibition effect (Fig. 5, a). There is a strong correspondence between ROS level and viability of *E. coli* after cultivation with cCMP. Indeed, the lowest rates of both the ROS level and the growth inhibition effect were detected in our experiments (Fig. 5, b). Cultivating of *S. lutea* with araC at the ED₅₀ concentration led to the ROS burst (13- and 10-fold, respectively), what again correlates with the cell growth inhibition capacity of cyclic modified nucleoside (Fig. 5, c), while *B. cereus* got the highest ROS level increase after cultivating with araCMP that is exceptionally corresponded with the development hindrance impact (Fig. 5, d).

This recommends that the upgraded creation of ROS by implication affects the development of bacteria strains.

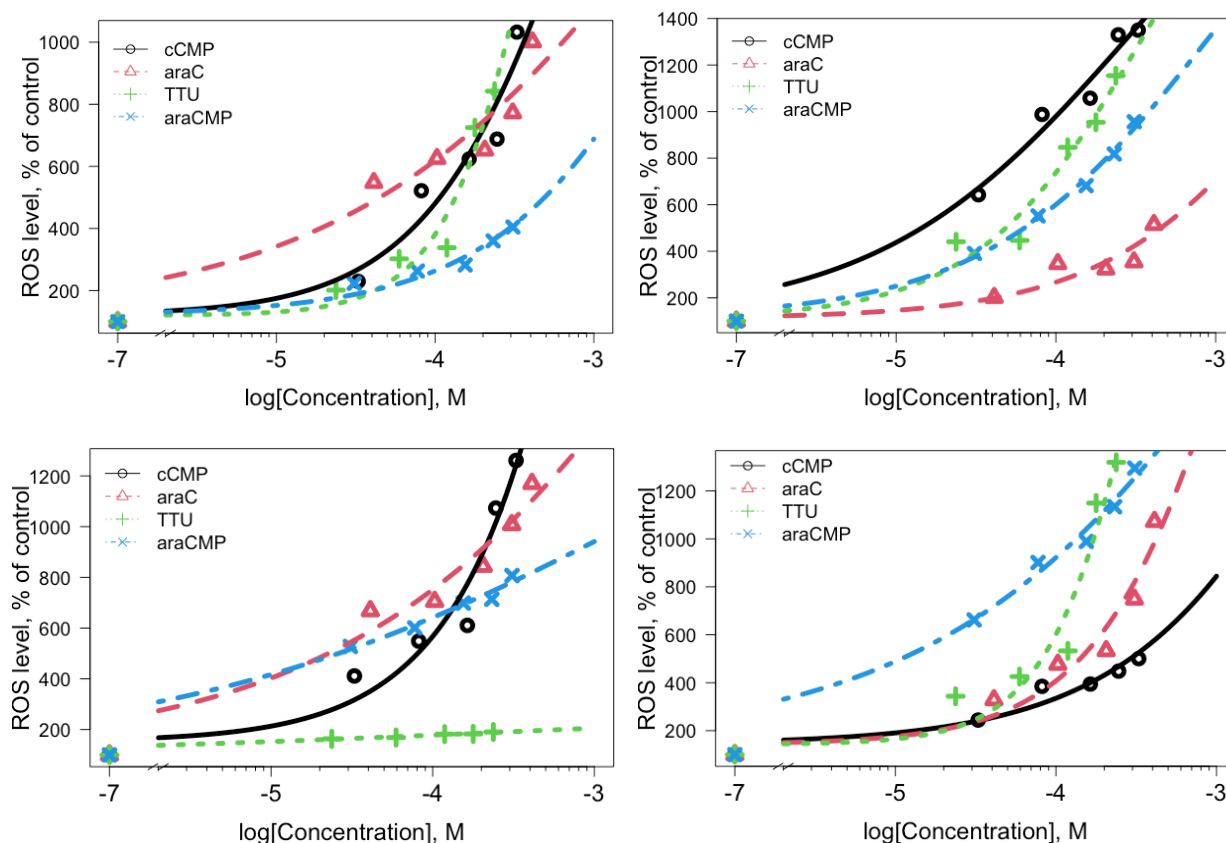


Fig. 5. Quantitation of intracellular ROS production by *P. mirabilis* (a), *E. coli* (b), *S. lutea* (c), and *B. cereus* (d) after 24 h treatment with different concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides using the DCFA-DA probe

Discussion. Due to persistent underinvestment in the development of anti-infective drugs, decreased uptake of vaccines, and the growing prevalence and severity of treatment resistance, infectious illnesses could be said to be making a comeback [18, 19]. The majority of antibacterial, antifungal, and antiparasitic medications have been on the market for many years, and the lack of new developments threatens the capacity to treat many infectious diseases. Even when new medicines are suggested, they are frequently created from antimicrobial compounds that are already on the market, such as new penicillins, tetracyclines, diamidines, minor groove binders, etc. [20, 21]. Although such tactics can (temporarily) get around resistance, it was a requirement of this strategy that resistance to the class of compound in the microbial populations targeted was already common.

Nucleoside analogues, a pharmacologically varied class of pharmaceuticals that originated from chemically modified natural ribose or 2'-deoxyribose nucleosides, are one drug class that is significant from a clinical standpoint [19]. In the clinical setting, nucleoside analogues are among the most significant medications and are frequently employed as antiviral and anticancer agents [20]. By taking advantage of cellular metabolism, nucleoside analogues resemble native nucleosides and are integrated into both DNA and RNA. Purine or pyrimidine nucleoside antibiotics have distinct biochemical properties and capabilities due to their structural similarity to nucleosides and nucleotides involved in primary metabolism; consequently, these natural products can frequently have a significant impact on the internal processes of living organisms. Unsurprisingly, a lot of work has gone into creating pyrimidine nucleoside natural compounds and derivatives that can be used as medications. In fact, a lot of these substances have been used in medicine for a long time. Abacavir, entecavir, and lobucavir, as well as the naturally occurring neplanocin and aristeromycin, are examples of carbocyclic nucleoside analogues, compounds in which a methylene group replaces the oxygen atom in the furanose sugar moiety, that have a distinguished history as anti-infectious agents [22–24].

A high-carbon sugar nucleoside that is putatively produced via C-5'-modification of the canonical nucleoside is present in a number of nucleoside antibiotics from different actinomycetes. The 5'-C-car-

bamoyluridine and 5'-C-glycyluridine-containing nucleoside families are two notable examples. These families were found during searches for inhibitors of the bacterial translocase I, which is essential in the construction of the bacterial peptidoglycan cell wall [25]. The lead compound of a new class of antibiotics that targets iron acquisition through inhibition of aryl acid adenylating enzymes (AAAEs) in several pathogenic bacteria and is particularly effective against *M. tuberculosis* is the nucleoside antibiotic 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl]adenosine (SAL-AMS) [26].

The overabundance of reactive oxygen species that results from the activation of microsomal oxidation is known to be the primary mechanism of the harmful action of antimetabolites on eukaryotic cells. Damage to the antioxidant defense system's functionality results as a result (including its enzymatic and non-enzymatic links). In this context, using modified pyrimidine nucleosides and nucleotides, we evaluated the level of reactive oxygen species produced in the bacterial cells during cultivation.

In this research, we assessed the efficacy of some modified pyrimidine nucleotides/nucleosides against various bacterial strains, e.g. *E. coli* (gram-negative, facultative anaerobe), *S. lutea* (gram-positive, obligate aerobe), *B. cereus* (gram-positive, facultatively anaerobe), and *P. mirabilis* (gram-negative, facultative anaerobe). The phase of exponential growth of bacterial culture was used in this work. Exponential phase culture consists of actively growing cells which consume readily available oxygen and nutrients for growth.

The lipopolysaccharide coat (LPS) on gram-negative bacteria's cell walls provides some defense against the toxicity of external substances [27]. These bacteria can thrive in places that would normally be regarded as unfriendly, such the intestines of mammals, thanks to their ability. It has been demonstrated in the past that the LPS acts as a physical or chemical barrier that prevents ROS produced outside of cells from interacting with important targets like membrane or cytoplasmic components [28]. As a result, certain strains that are unable to produce a significant amount of LPS have shown higher sensitivity to exogenous ROS than strains that are still able to do so. A protective structure like the gram-negative LPS and the outer membrane in which it is embedded does not exist in the majority of gram-positive bacteria. This outer membrane, which is made up of proteins and unsaturated fatty acids, which are substances known to chemically react with ROS, may operate as a structural barrier to penetration as well as a chemical trap for ROS [29]. However, since they can be eliminated without killing the cells, the outer membrane and LPS of gram-negative bacteria do not represent essential targets for the fatal impact of ROS (spheroplastformation). Once the barrier is crossed by ROS, the targets and mechanisms for cell killing for both gram-positive and gram-negative bacteria may be expected to be similar or identical because the cell wall structure of gram-positive and gram-negative bacteria represents the fundamental difference between these cells.

Whether caused by endogenous or exogenous photosensitizers, carotenoid pigments are known to physically quench ROS [30] and shield bacteria from the deadly effects of photosensitization. The protective effects of carotenoids against photosensitization and singlet oxygen mortality in bacteria have been linked, according to Mathews-Roth and colleagues [31]. Additionally, it has been discovered that carotenoids shield *S. lutea* from leukocyte-caused death, probably by quenching singlet oxygen. The carotenoid -carotene has also been reported to lessen the photosensitivity related to erythropoietic protoporphyria in humans and to protect mice from lethal exposure to hematoporphyrin derivative and light. In order to investigate any potential protective benefits that carotenoids might have against the death of these cells caused by exposure to pure exogenous ROS, we have included for investigation a bacteria strain that produces large levels of carotenoid pigments.

Our tests demonstrated that gram-positive (*S. lutea* and *B. cereus*) and gram-negative (*E. coli* and *P. mirabilis*) bacteria stains were both susceptible to the exposure of modified pyrimidine nucleosides and/or derivatives of nucleotides such as ara-C, TTU, ara-CMP, and cyclo-CMP. In addition, our findings suggest certain structure-function connections in the class of modified pyrimidine nucleosides and/or nucleotide derivatives caused by the inhibition of bacterial cell growth. In comparison to gram-positive bacteria, gram-negative ones (*E. coli* and *P. mirabilis*) were more sensitive to the exposure of TTU and cyclo-CMP and less sensitive to the exposure of ara-C and ara-CMP. The most effective cells growth inhibitor for gram-positive strains (*S. lutea*, *B. cereus*) was ara-CMP. *S. lutea* appeared to be the most sensitive bacteria strain to the exposure of all studied compounds.

Next, it was demonstrated that all of the tested chemicals increased the ROS production in bacteria strains in a dose-dependent way. The cultivation of the gram-negative strain of *E. coli* revealed the largest ROS level increase after TTU and after cyclo-CMP, which is strongly connected with the effect of cell growth inhibition. After cultivation with ara-CMP, there was a significant correlation between the ROS level and the viability of the *B. cereus* strain.

Conclusion. Modified pyrimidine nucleosides and/or nucleotides derivatives like ara-C, TTU, ara-CMP and cyclo-CMP were found to be effective in inhibiting the growth of gram-negative (*E. coli* and *P. mirabilis*) and gram-positive (*S. lutea* and *B. cereus*) bacteria stains. Ara-C, TTU, ara-CMP and cyclo-CMP are able to enhance the production of intracellular ROS, moreover the more effective a pyrimidine derivative in the growth inhibition the more ROS species were caused to burst. This study has provided an insight that modified nucleosides and/or nucleotides might potentially be useful in treating infections caused by ARB.

Acknowledgements. The authors would like to thank the Belarusian Republican Foundation for Fundamental research (grant No. M20MC-043) for partial funding this research.

References

1. Nathan C., Cars O. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. *New England Journal of Medicine*, 2014, vol. 371, no. 19, pp. 1761–1763. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1408040>
2. Nathan C. Antibiotics at the crossroads. *Nature*, 2004, vol. 431, no. 7011, pp. 899–902. <https://doi.org/10.1038/431899a>
3. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, vol. 74, no. 3, pp. 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
4. van Boeckel T. P., Brower Ch., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., Robinson T. P., Teillant A., Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, vol. 112, no. 18, pp. 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
5. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., Coenen S. [et al]. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New Infections*, 2015, vol. 6, pp. 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>
6. Rossolini G. M., Arena F., Pecile P., Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, vol. 18, pp. 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006>
7. Michael C. A., Dominey-Howes D., Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers Public Health*, 2014, vol. 2, art. 145. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>
8. Spellberg B., Srinivasan A., Chambers H. F. New societal approaches to empowering antibiotic stewardship. *JAMA*, 2016, vol. 315, no. 12, pp. 1229–1230. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.1346>
9. Hoffman S. J., Caleo G. M., Daulaire N., Elbe S., Matsoso P., Mossialos E., Rizvi Z., Rottingen J.-A. Strategies for achieving global collective action on antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, 2015, vol. 93, no. 12, pp. 867–876. <https://doi.org/10.2471/blt.15.153171>
10. Payne D. J., Miller L. F., Findlay D., Anderson J., Marks L. Time for a change: addressing R&D and commercialization challenges for antibacterials. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, vol. 370, no. 1670, pp. 20–86. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0086>
11. Luepke K. H., Mohr J. F. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2017, vol. 15, no. 5, pp. 425–433. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1308251>
12. Landers T., Kavanagh K. T. Is the Presidential Advisory Council on Combating Antibiotic Resistance missing opportunities. *American Journal of Infection Control*, 2016, vol. 44, no. 11, pp. 1356–1359. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.07.008>
13. Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutic*, 2015, vol. 40, no. 4, pp. 277–283.
14. Koszytkowska-Stawińska M., Buchowicz W. Multicomponent reactions in nucleoside chemistry. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2014, vol. 10, pp. 1706–1732. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.179>
15. Nizhegorodova D. B., Zafranskaya M. M., Kvasyuk E. I., Sysa A. G. Effect of emoxipine on cytotoxicity of peripheral blood mononucleurs under cultivation with cytarabine and cyclocytidine. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo univertsiteta. Biologiya* [Journal of the Belarusian State University. Biology], 2021, no. 2, pp. 3–10 (in Russian).
16. Akhrem A. A., Kalinichenko E. N., Kvasyuk E. I., Mikhailopulo I. A. Synthesis of O₂, 2'-cyclociditin and its 5'-nophosphate. *Bioorganicheskaya khimiya* [Bioorganic chemistry], 1977, vol. 3, no. 6, pp. 845–847 (in Russian).
17. Travnickova E., Mikula P., Oprsal J., Bohacova M., Kubac L., Kimmer D., Soukupova J., Bittner M. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. *AMB Express*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 183. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0909-z>
18. Jordheim, L. P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet Ch. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
19. Seley-Radtke K. L., Yates M. K. The evolution of nucleoside analogue antivirals: a review for chemists and non-chemists. Part 1: early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Research*, 2018, vol. 154, pp. 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.004>

20. Khandazhinskaya A. L., Matyugina E., Solyev P., Wilkinson M., Buckheit K., Buckheit R. [et al]. Investigation of 5'-norcarbocyclic nucleoside analogues as antiprotozoal and antibacterial agents. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 19, pp. 34–43. <https://doi.org/10.3390/molecules24193433>
21. Yates M. K., Seley-Radtke K. L. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Research*, 2019, vol. 162, pp. 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.11.016>
22. Yang Z., Unrine J., Nonaka K., van Lanen S. G. Fe(II)-dependent, uridine-50 – monophosphate a-ketoglutarate dioxygenases in the synthesis of 50-modified nucleosides. *Methods in Enzymology*, 2012, vol. 516, pp. 153–168. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394291-3.00031-9>
23. Xing L., Honda T., Fitz L., Ojima I. Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals. *4-Case studies of fluorine in drug discovery*. Cambridge, 2019, pp. 181–211.
24. Sanderson K. E., MacAlister T., Costerton J. W., Cheng K.-J. Permeability of lipopolysaccharide-deficient (rough) mutants of *Salmonella typhimurium* to antibiotics, lysozyme, and other agents. *Canadian Journal of Microbiology*, 1974, vol. 20, no. 8, pp. 1135–1145.
25. Dahl T. A., Midden W. R., Hartman P. E. Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 1987, vol. 46, no. 3, pp. 345–352. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb04779.x>
26. Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 6, p. 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
27. Foote C. S., Denny R. W. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by P-carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 1968, vol. 90, no. 22, pp. 6233–6235. <https://doi.org/10.1021/ja01024a061>
28. Mathews M. M., Siström W. R. The function of carotenoid pigments of *Sarcina lutea*. *Archiv für Mikrobiologie*, 1960, vol. 35, no. 2, pp. 139–146. <https://doi.org/10.1007/bf00425002>
29. Mathew-Roth M. M., Wilson T., Fujimori E., Krinsky N. I. Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization. *Photochemistry and Photobiology*, 1974, vol. 19, no. 3, pp. 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1974.tb06501.x>
30. Krinsky N. I. Singlet excited oxygen as a mediator of the antibacterial action of leukocytes. *Science*, 1974, vol. 186, no. 4161, pp. 363–365. <https://doi.org/10.1126/science.186.4161.363>
31. Mathews-Roth M. M. Photoprotection by carotenoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 1988, vol. 22, no. 3, p. 315. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90245-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90245-0)

Information about the authors

Arshed Shihad – Postgraduate student. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: almansoriarshed@gmail.com

Aliaksei G. Sysa – Ph. D. (Chem.), Associate Professor. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aliaksei.sysa@iseu.by

Информация об авторах

Аршед Шихад – аспирант. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: almansoriarshed@gmail.com

Алексей Григорьевич Сыса – канд. хим. наук, доцент. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aliaksei.sysa@iseu.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 599.323.4:574.4 (476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-64-74>

Поступила в редакцию 08.08.2022

Received 08.08.2022

Е. И. Машков¹, Е. С. Гайдученко¹, Ю. М. Борисов²¹Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь²Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва, Российская ФедерацияГАПЛОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *mtCYTB* ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ
(*MICROTUS ARVALIS SENSU LATO*) В БЕЛАРУСИ

Аннотация. В настоящем исследовании представлены оригинальные данные о генетической вариативности гена *mtCytb* обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) из 18 локалитетов, исследованных на территории Беларуси. Проведен анализ последних филогеографических данных для установления послеледниковой истории колонизации обыкновенной полевки в Центральном регионе Европы. Всего в ходе исследования изучены генетические характеристики 53 особей изучаемого вида, относящихся к одной из шести существующих мтДНК линий. Показано, что популяция вида в Беларуси характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия, сравнимым с таковым у других гаплогрупп восточной мтДНК линии. Большое число выявленных гаплотипов мтДНК ($n = 41$) говорит о высоком уровне полиморфизма фрагментов гена *mtCytb* *Microtus arvalis* Беларуси. Анализ распределения указанных гаплотипов обыкновенной полевки по территории Беларуси показал отсутствие связи с флористической специфичностью территорий. Однако распределение по различным ландшафтно-географическим районам, напротив, хорошо соотносится с расположением наиболее удаленных гаплотипов на медианной сети. Предполагается, что около 9000 тыс. лет назад имело место повторное заселение и дальнейшее расселение обыкновенной полевки на современной территории Беларуси в двух направлениях: с юго-востока на запад и северо-запад, а также с севера на юго-восток.

Ключевые слова: *Microtus arvalis*, биотоп, ПЦР-типирование, Беларусь, гаплотип, *mtCytb*, гаплогруппа, рефугиум, генетическое разнообразие, митохондриальная ДНК

Для цитирования: Машков, Е. И. Гаплотипическое разнообразие *mtCytb* обыкновенной полевки (*Microtus arvalis sensu lato*) в Беларуси / Е. И. Машков, Е. С. Гайдученко, Ю. М. Борисов // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 64–74. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-64-74>

Evgeniy I. Mashkov¹, Helen S. Gajduchenko¹, Yuri M. Borisov²¹Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian FederationHAPLOTYPIC DIVERSITY OF THE *MTCYTB* GENE OF THE COMMON VOLE
(*MICROTUS ARVALIS SENSU LATO*) IN BELARUS

Abstract. The analysis of the recent phylogeographic studies of *Microtus arvalis* is carried out to establish the post-glacial history of colonization of the common vole in the Central region of Europe. The authors have presented the original data on the genetic variability of the *mtCytb* gene of the common vole (*Microtus arvalis s. l.*) from 18 localities studied on the territory of Belarus. The genetic characteristics of 53 individuals of the common vole belonging to one eastern line of mitochondrial DNA were studied. It is shown that the population of the species in Belarus is characterized by a high level of genetic diversity comparable to that of other haplogroups of the eastern mtDNA line. The level of variability of mitochondrial fragments of the *mtCytb* gene of the common vole (*Microtus arvalis*) from Belarus turned out to be quite high ($Hd \pm SD_{Hd} = 0.97 \pm 0.02$), which is manifested in a large number of the identified mtDNA haplotypes ($n = 41$). The distribution of the identified haplotypes of *Microtus arvalis* across various landscape-geographical areas correlates well with the location of the most remote haplotypes on the parsimony network. The assumption is given about the re-settlement (about 9000 thousand years ago) and further settlement of *Microtus arvalis* on the modern territory of Belarus in two directions: from southeast to west and to northwest, as well as from north to southeast.

Keywords: *Microtus arvalis*, biotope, PCR typing, Belarus, haplotype, *mtCytb*, haplogroup, refugium, genetic diversity, mitochondrial DNA

For citation: Mashkov E. I., Gajduchenko H. S., Borisov Yu. M. Haplotype diversity of the *mtCytb* gene of the common vole (*Microtus arvalis sensu lato*) in Belarus. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 64–74 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-64-74>

Введение. В период максимума последнего оледенения [1], происходившего 26,5–19 тыс. лет назад, на нынешней территории Беларуси наибольшей протяженности достигло Вейкселевское оледенение (Вейкселевские ледяные щиты) [2]. В результате из-за суровых климатических условий многие виды растений и животных переживали неблагоприятные условия в так называемых рефугиумах [3, 4]. Одним из таких мест в центральной части Европы можно назвать Карпатский рефугиум [5, 6]. В расположенном к югу от Польши Карпатском бассейне были обнаружены ископаемые останки некоторых млекопитающих, что указывает на то, что он стал убежищем для некоторых видов умеренного климата [7, 8]. Среди обнаруженных видов следует отметить бурого медведя (*Ursus arctos*), благородного оленя (*Cervus elaphus*), косулю (*Capreolus capreolus*), лисицу (*Vulpes vulpes*), ласку (*Mustela nivalis*), лесную куницу (*Martes martes*) и обыкновенную полевку (*Microtus arvalis*).

Недавние филогеографические исследования обыкновенной полевки в Центральной части Европы позволили идентифицировать множественные линии митохондриальной ДНК (мтДНК) [9–11]. Всего авторами [12–14] было выявлено шесть линий мтДНК обыкновенной полевки. Северо-западная линия представлена особями из Франции, Бельгии и Оркнейского архипелага (Британские острова). На Британские острова обыкновенная полевка была завезена вместе с землей в период неолита [14]. Юго-западная линия включала особей из Испании и западной Франции [12, 14], центральная линия – полевок из Швейцарии, Франции, Нидерландов, Дании и Германии. Особи обыкновенной полевки из итальянской линии встречались в южной части Швейцарии и северной части Италии [15]. Благодаря исследованиям, проводимым на территории Польши [11, 16], удалось расширить представление о распространении восточной линии. Расселение обыкновенной полевки из Карпатского рефугиума (около 9000 тыс. лет назад) дало начало восточной линии, которая сейчас занимает центральную и восточную части Северной Европы (в настоящее время отсутствуют какие-либо свидетельства о наличии в этом регионе позднеледниковых окаменелостей из других мест).

На сегодняшний день исследовано не так много образцов из Восточной Европы [11]. Восточная линия происхождения из этого региона была представлена несколькими особями из Финляндии, России, Украины, Польши, Словакии и Венгрии [13]. Авторами [15, 17] было выдвинуто предположение о балканской линии происхождения вида. Однако в настоящее время известно, что географический диапазон балканской линии ограничен Западными Балканами [11], а происхождение исследуемых особей из стран восточной Европы идет от восточной линии, берущей свое начало еще со времен Карпатского рефугиума [18].

Ввиду малого объема исследованных проб из восточной части Европы, а также в связи с полным отсутствием образцов обыкновенной полевки из Беларуси целью настоящего исследования было описание послеледниковой истории колонизации обыкновенной полевки в центральном регионе Европы. Для этого нами были получены последовательности *mtCytb* из различных локалитетов Беларуси для определения генетического статуса данного вида.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили данные, собранные на протяжении 2018–2021 гг. с помощью живоловушек коридорного типа. Выборка обыкновенных полевок представлена 53 экземплярами из 18 локалитетов исследования (рис. 1). Для учета использовали стандартную методику [19].

Отлов зверьков проводился на пойменных и внепойменных суходольных и низинных лугах, а также на мелиоративных участках.

Последовательности нуклеотидов амплифицированных фрагментов ДНК для гена *mtCytb* определяли с помощью праймеров cbMA 842F [20] на автоматическом анализаторе Applied Biosystems 3500 с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США). Проведено секвенирование фрагмента гена *mtCytb* размером 830 н. о. Для сравнения использованы нуклеотидные последовательности из базы GenBank (NCBI).

Для выравнивания и анализа полученных последовательностей применен пакет программ и MEGA10, для филогенетического анализа – пакет филогенетических программ MEGA10 [21]. Конечное выравнивание составило 686 н. о. для *M. arvalis*.



Рис. 1. Распределение образцов *M. arvalis*, секвенированных для данного исследования (74–78 – окр. г. Браслав, Браславский район; 56–58 – окр. г. Верхнедвинск, Верхнедвинский район; 52–55 – окр. г. Шумилино, Шумилинский район, Витебская область; 47 – окр. а. г. Мядель, Мядельский район; 44–45 – окр. вдхр. Вилейское, Вилейский район; 46 – окр. д. Шипки, Вилейский район; 86–89 – окр. д. Колодница, Крупский район; 83–85 – окр. д. Белокорец, Воложинский район; 48 – окр. д. Дубровка, Минский район; 59–61 – окр. г. Старые Дороги, Стародорожский район, Минская область; 90–92 – окр. д. Воронино, Быховский район, Могилевская область; 71–72 – окр. д. Якимова Слобода, Светлогорский район; 40–43 – окр. д. Бабчин, Хойникский район; 49 – окр. д. Лубня, Мозырский район; 67–71 – окр. д. Борки, Житковичский район, Гомельская область; 62–66 – окр. д. Лядец, Столинский район; 50–51 – окр. д. Верхолесье, Кобринский район; 79–82 – окр. д. Щорсы, Кореличский район, Гродненская область), и депозитов из GenBank (NCBI) (1–39, 93–138) [11–15]. Желтым цветом обозначен ареал вида в Евразии, сплошной линией – гибридная зона между западной (*arvalis*) и восточной (*obscurus*) формами обыкновенной полевки. Места отбора проб окрашены в соответствии с выявленной гаплогруппой (рис. 2, 3). Места, пронумерованные на карте, перечислены в табл. 1

Fig. 1. Distribution of *M. arvalis* samples sequenced for this study (74–78 – near the Braslav city, Braslav district; 56–58 – near the Verkhnedvinsk city, Verkhnedvinski district; 52–55 – near the Shumilino city, Shumilinski district, Vitebsk region; 47 – vicinity of the agrarian city of Myadel, Myadel district; 44–45 – vicinity of the Vileika reservoir, Vileiski district; 46 – near the Shipki village, Vileika district; 86–89 – near the Kolodnitsa village, Krupski district; 83–85 – near the Belokorets village, Volozhinski district; 48 – near the Dubrovka village, Minsk district; 59–61 – near the city of Staryye Dorogi, Starodorozhski district, Minsk region; 90–92 – near the Voronino village, Bykhovski district, Mogilev region; 71–72 – near the Yakimova Sloboda village, Svetlogorsk district; 40–43 – near the Babchin village, Khoiniksi district; 49 – near the Lubnya village, Mozyr district; 67–71 – near the Borki village, Zhitkovichi district, Gomel region; 62–66 – near the Lyadets village, Stolinski district; 50–51 – near the Verkholes'e village, Kobrin district; 79–82 – near the Shchorsy village, Korelichski district, Grodno region) and deposits from GenBank (NCBI) (1–39, 93–138) [11–15]. The range of the species in Eurasia is yellow-colored, the solid line indicates a hybrid zone between the western (*arvalis*) and eastern (*obscurus*) forms of the common vole. The sampling sites are colored according to the identified haplogroup (Fig. 2, 3). The places numbered on the map are listed in Tab. 1

Филогенетические деревья, учитывающие характер гаплотипической изменчивости по фрагменту гена *mtCytb*, построены в NETWORK, версия 10.0.5, с использованием медианного соединения (MJ) алгоритма, основанного на максимальной экономии [22].

Помимо полученных последовательностей нами выбраны доступные (идентифицированные ранее) последовательности из других исследований [9, 11, 15], представляющие восточную линию обыкновенной полевки (см. рис. 1, табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Последовательности образцов *mtCytb M. arvalis* из NCBI GenBank

T a b l e 1. Sequences of *mtCytb M. arvalis* samples from NCBI GenBank

Присвоенный номер NCBI GenBank	№ п/п (рис. 1)	Номер гаплотипа (рис. 2, 3)	Использованная литература
AY220767.1, AY220768.1, AY220770.1, AY220774.1	13, 39, 20, 38	H1, J1, I5, E2	Haynes с соавт. (2003) [15]
GU187380.1	134	O6	Bužan с соавт. (2010) [13]
KP255486.1, KP255495.1, KP255497.1, KP255500.1, KP255501.1, KP255508.1, KP255509.1, KP255510.1, KP255511.1, KP255515.1, KP255518.1, KP255521.1, KP255525.1, KP255526.1, KP255532.1, KP255535.1, KP255537.1, KP255544.1, KP255550.1, KP255552.1, KP255558.1, KP255560.1, KP255561.1, KP255575.1, KP255578.1, KP255584.1, KP255585.1, KP255590.1, KP255593.1, KP255596.1, KP255597.1, KP255598.1, KP255605.1, KP255607.1, KP255608.1, KP255610.1, KP255611.1, KP255612.1, KP255614.1, KP255617.1, KP255618.1, KP255619.1, KP255620.1	128, 95, 94, 35, 110, 111, 113, 114, 112, 115, 116, 117, 93, 118, 119, 109, 120, 121, 123, 122, 34, 125, 124, 126, 127, 96, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 6, 5, 14, 33, 15	F3, O7, J1, E1, E1, G2, G5, G6, E1, C6, L6, E1, J8, J8, C6, J10, C5, L3, J1, L3, J7, L4, J1, F2, F2, F1, E1, G4, G4, G4, G4, G4, C4, E1, J9, C5, E1, G3, O8, I1, I4, O5, O2	Stojak с соавт. (2015) [11]
KX380003.1, KX380004.1, KX380005.1, KX380011.1, KX380014.1, KX380016.1, KX380058.1, KX380069.1, KX380072.1, KX380074.1, KX380077.1, KX380091.1, KX380093.1, KX380094.1, KX380096.1, KX380104.1, KX380152.1, KX380153.1, KX380154.1, KX380155.1, KX380159.1, KX380167.1, KX380170.1, KX380171.1, KX380173.1, KX380176.1	16, 32, 4, 3, 1, 7, 8, 17, 31, 18, 19, 136, 137, 9, 10, 135, 30, 29, 28, 133, 11, 12, 129, 27, 132, 26	J1, J1, O1, J2, J1, J3, J4, J1, L6, J1, O3, J11, J3, J5, J6, J11, D2, D5, L6, I10, I2, I3, F4, D4, I10, D1	Haynes с соавт. (2003) [15], Bužan с соавт. (2010) [13], Tougard с соавт. (2008) [12], Stojak с соавт. (2015) [11], Stojak с соавт. (2016) [16]
MK748362.1, MK748433.1, MK910735.1	138, 2, 25	I11, L6, O9	Vaca с соавт. (2020) [23]
MZ438664.1, MZ438665.1, MZ438666.1, MZ438668.1	24, 23, 22, 21	L2, L1, L5, O4	Vaca с соавт. (2021) [24]
U54484.1, U54491.1	130, 131	A7, I9	Barker с соавт. (1996) [25]

Для выявления нуклеотидного и гаплотипического разнообразия исследуемых образцов, а также для определения среднего числа нуклеотидных различий (*k*), сайтов и положения стоп-кодонов использовали программу DNASP, версия 5.1 [26].

Результаты и их обсуждение. Из исследуемой выборки особей *M. arvalis* (*n* = 53), отловленных на территории Беларуси, выявлен 41 гаплотип (Нар) (рис. 1–3). Новые последовательности содержали 46 полиморфных сайтов, 23 из которых были филогенетически информативными. Помимо собственных данных, полученных нами, в анализ были включены нуклеотидные последовательности из GenBank (NCBI) (*n* = 85). Номера доступа GenBank приведены в табл. 1. Все отобранные для анализа образцы относятся к восточной линии. Примечательно, что 39 гаплотипов (A1–A8, B1–B3, C1–C3, C7–C10, D3, E3–F7, G1, I6–I8, I12–I14 и H2–H9) обнаружены только у полевок, собранных в Беларуси.

Проведенный ML-анализ нуклеотидных последовательностей обыкновенной полевки позволил построить дендрограмму и объединить последовательности в группы, характеризующие близкие гаплотипы обыкновенной полевки в Беларуси, а также в Центральной и Западной Европе (рис. 2).

Анализ распределения выделенных гаплотипов по группам популяций позволил выявить некоторые закономерности. Установлено, что только в одном локалитете исследования в выборках присутствуют уникальные гаплотипы, но встречаются также гаплотипы (Нар 29,45), широко распространенные на территории Беларуси (максимальное удаление более 250 км).

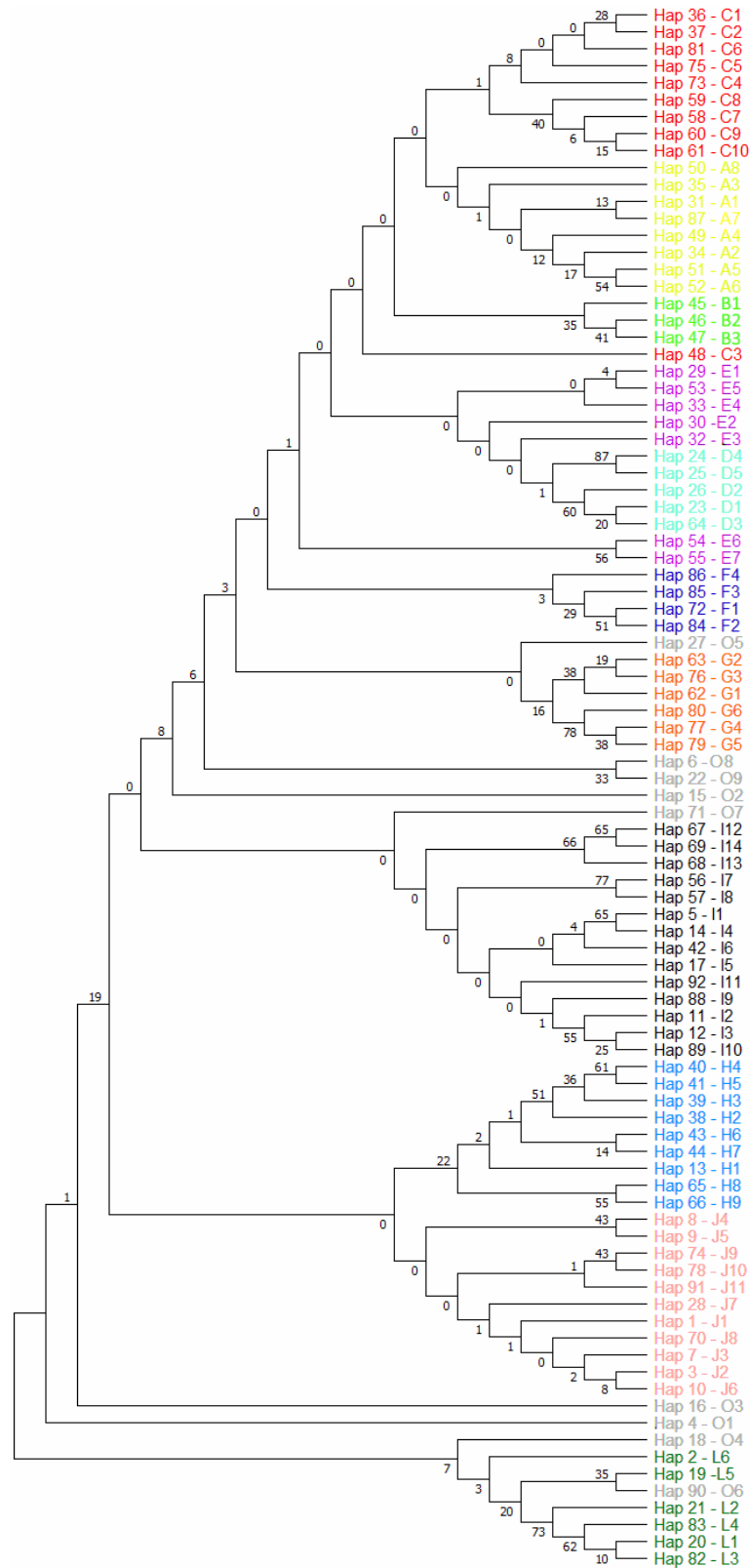


Рис. 2. Результаты генетического ML-анализа гаплотипов ($n = 92$) участка *mtCytb* (686 н. о.), показывающие филогенетические отношения между гаплотипами. В узлах – результаты будстреп-анализа (1000 реплик). Цветом указана принадлежность гаплотипов к той или иной гаплогруппе (см. рис. 1, 3)

Fig. 2. Results of the genetic ML analysis of haplotypes ($n = 92$) of the *mtCytb* site (686 nb), showing phylogenetic relationships between haplotypes. The nodes show the results of the budstrep analysis (1000 replicas). The color indicates the belonging of haplotypes to a particular haplogroup (see Fig. 1, 3)

С целью проведения более точной кластеризации гаплотипов обыкновенной полевки построена медианная сеть по алгоритму Median Joining network (объединение средних) (рис. 3). Вследствие довольно широкой изменчивости гаплотипов полученная сеть сильно разветвлена и имеет два четко выраженных кластера.

Преобладающими гаплогруппами обыкновенной полевки в Беларуси являются А, Е, I и H (см. рис. 1, 3). Данные гаплогруппы представлены 7 (17,1 %), 6 (14,6 %), 6 (14,6 %) и 8 (19,5 %) участками *mtCytb* соответственно (см. рис. 1).

Наиболее неоднородными оказались выборки обыкновенной полевки из Беларуси, Украины и Польши. В данных географических районах с разной частотой обнаруживались представители 8, 5 и 7 гаплогрупп соответственно. Тенденции распределения гаплогрупп в Беларуси и на прилегающих территориях были разными: представители гаплогрупп F, J, L были распространены в Польше, Украине и Венгрии, но отсутствовали в Беларуси (рис. 3).

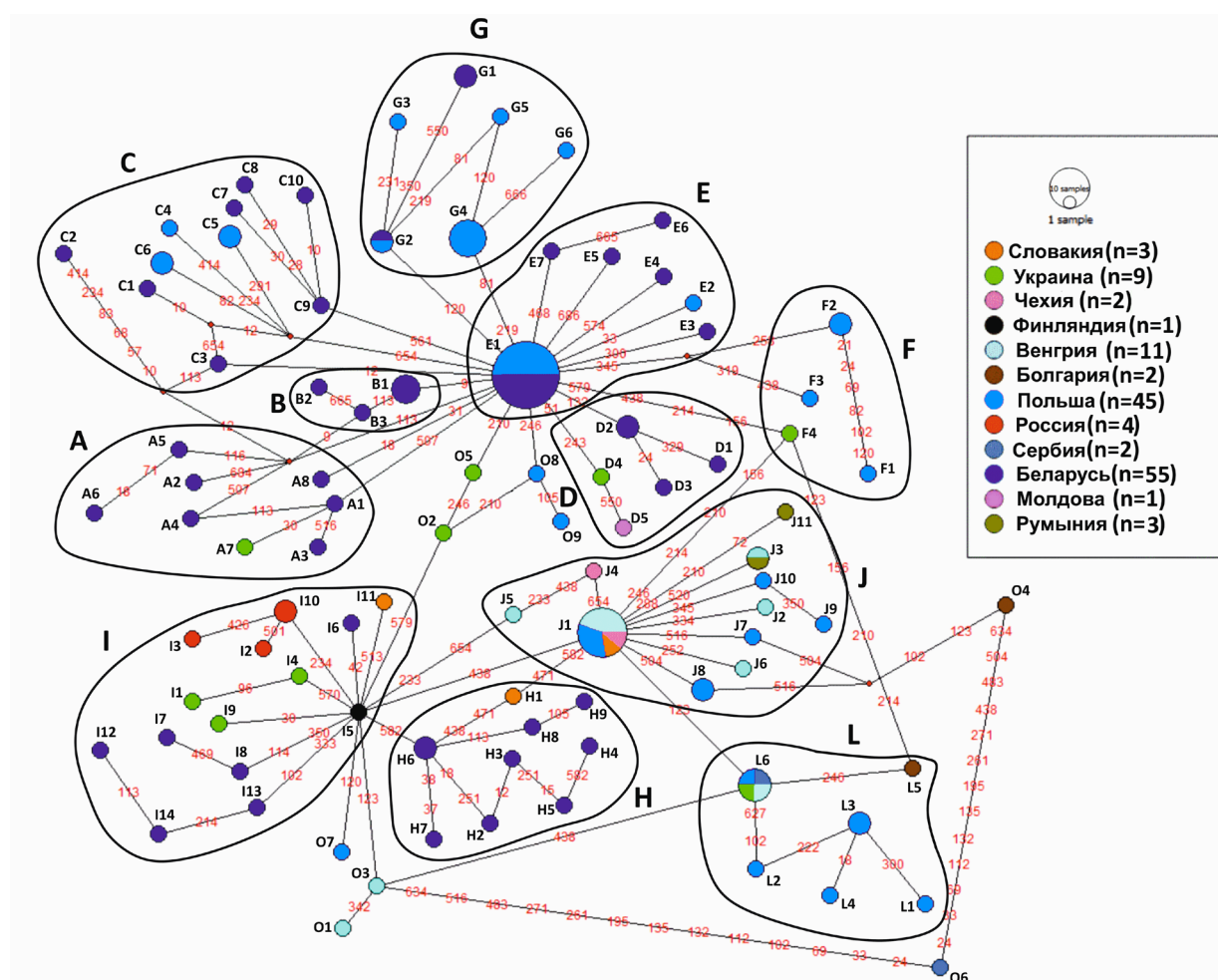


Рис. 3. Медианная сеть из 138 последовательностей гена *mtCytb* (686 н. о.) *M. arvalis*. Цветные кружки обозначают гаплотипы, обнаруженные в образцах обыкновенной полевки, собранных в Беларуси и других странах Европы (частоты этих гаплотипов не представлены). Цифры между узлами указывают на конкретные сайты мутаций. Радиус кругов пропорционален частоте гаплотипов. Определенные формы представляют разные гаплогруппы (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L) области гена *mtCytb*

Fig. 3. Median network of 138 sequences of the *mtCytb* gene (686 nb) *M. arvalis*. Colored circles indicate haplotypes found in the common vole samples collected in Belarus and other European countries (the frequencies of these haplotypes are not presented). The numbers between the nodes indicate specific mutation sites. The radius of the circles is proportional to the frequency of haplotypes. Certain forms represent different haplogroups (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L) of the *mtCytb* gene region

Анализ образцов обыкновенной полевки из Беларуси позволил выделить на медианной сети точку разделения двух отдельных линий, отходящих от более древних гаплотипов (O2, O5, Украина). Данное предположение подтверждается результатами ранее проведенных исследований [11, 13] о расселении восточной линии обыкновенной полевки из Карпатского рефугиума, расширение которой началось 8900 лет назад (95 %-ный доверительный интервал – от 22 300 до 3900 лет до н. э.).

В связи с заменой в одной нуклеотидной позиции от гаплотипа O5 образовался широко распространенный гаплотип E1, включающий особей из Хойникского, Вилейского, Житковичского, Браславского, Воложинского и Мядельского районов. Данные особи далее распространились по центрально-западной части Беларуси (Нар D2, G1, B1) и по всему Белорусскому Полесью (Нар A1, E5, A8, C1, A3).

Так, к наиболее распространенным гаплотипам по гену *mtCytb* в центральной, западной и южной частях Беларуси можно отнести Нар E1 и Нар B1. Наиболее удаленные гаплотипы встречались, соответственно, в дальних районах Белорусского Полесья.

На основании анализа распространения обыкновенной полевки на современной южной территории Беларуси, сделано предположение, что заселение данного вида происходило с юго-востока.

Другая линия, берущая свое начало также от предковых форм из Польши [11], распространялась по территории Беларуси с севера (Нар I5) и далее по восточной ее части. Учитывая, что в центральной и южной частях Беларуси расселены особи *M. arvalis* другой предковой линии, можно допустить, что эта часть страны (восточная) заселялась со стороны России, однако происхождение из рефугиума на Кавказе или даже восточнее на Урале невозможно, так как эти районы в настоящее время населены обыкновенной полевкой формы *obscurus* [27]. Единое происхождение восточной линии мтДНК из рефугиума и отсутствие каких-либо свидетельств о наличии позднеледниковых окаменелостей из других мест в этом регионе указывает на то, что скорее всего распространение *M. arvalis* в западной части России происходило со стороны современной Могилевской и Витебской областей Беларуси.

Все северо-восточные образцы представлены двумя гаплогруппами (I и H) (см. рис. 1, 3).

Для анализа показателей генетического разнообразия нами были выбраны два географически обособленных кластера. В первый кластер вошли гаплогруппы A, B, C, D, E, F и G, во второй – I, J, H и L (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Данные генетического разнообразия *M. arvalis* по гену *mtCytb*

Table 2. *M. arvalis* genetic diversity data on the *mtCytb* gene

<i>M. arvalis</i>	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	$Hd \pm SD_{Hd}$	$\pi \pm SD_{\pi}$	<i>k</i>	<i>p</i>	T's D
A, B, C, D, E, F и G	82	63	53	0,948 ± 0,019	0,00557 ± 0,00068	3,82	0,007	-2,35
I, J, H и L	64	55	47	0,976 ± 0,011	0,00601 ± 0,00065	4,12	0,007	-2,19

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 3: *n* – число последовательностей; *S* – число переменных сайтов; *H* – число гаплотипов; *Hd* – гаплотипическое разнообразие; π – нуклеотидное разнообразие; *k* – среднее число нуклеотидных различий; *p* – общая генетическая дистанция; SD – стандартное отклонение, T's D – тест Таджimy.

Значения гаплотипического разнообразия в двух исследуемых группах обыкновенной полевки весьма высоки, однако показатели их нуклеотидного разнообразия более низкие (табл. 2). Широко распространенные гаплотипы (E1 и J1) содержат эффективное число основателей, благодаря чему сохраняют генетическую целостность популяций.

Как в популяции восточной линии, так и у других линий мтДНК обыкновенной полевки наблюдается высокий уровень гаплотипического разнообразия [28].

Полиморфизм (среднее число нуклеотидных различий) *mtCytb* *M. arvalis* в гаплогруппах I, J, H и L составил 4,12. При этом средняя генетическая дистанция была такой же, как у первого кластера, – 0,007 (табл. 2).

Особенности популяционной структуры области распространения обыкновенной полевки в Беларуси позволили выявить проведенный тест Таджими (T's D). Отрицательный показатель T's D (-2,35) (статистическая значимость подтверждена на уровне $p < 0,05$) у первого кластера (см. табл. 1) говорит об отсутствии редких гаплотипов и указывает на возможный всплеск численности и рост популяции после прохождения состояния «бутылочного горлышка» в период депрессии численности.

Для анализа показателей генетического разнообразия нами были выбраны, согласно разделению исследуемых особей на два генетически обособленных кластера, две группы обыкновенной полевки, обитающей на территории Беларуси (табл. 3). Первая группа представлена особями из гаплогрупп А, В, С, D, Е и G, распространенных в центральной, западной и южной частях Беларуси. Во вторую группу вошли особи гаплогрупп I и H, распространенные на территории северной и восточной частей Беларуси.

Таблица 3. Данные генетического разнообразия *M. arvalis* по гену *mtCytb* в Беларуси

Table 3. *M. arvalis* genetic diversity data on the *mtCytb* gene in Belarus

<i>M. arvalis</i>	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	$Hd \pm SD_{Hd}$	$\pi \pm SD_{\pi}$	<i>k</i>	<i>p</i>	T's D
Западная и южная линии	38	31	27	0,943 ± 0,030	0,0043 ± 0,0006	2,94	0,0058	-2,09
Северная и восточная линии	15	16	14	0,990 ± 0,028	0,0061 ± 0,0006	4,23	0,0065	-0,56

В белорусской популяции максимальный полиморфизм (среднее число нуклеотидных различий) можно отметить в северной и восточной линиях ($k = 4,23$). Для данной географически обособленной группы определены также максимальные дистанции – 0,0065. Для западной и южной линий отмеченные нами полиморфизм и показатель общей генетической дистанции были несколько ниже – 2,94 и 0,0058 соответственно.

Тест Таджими (T's D) позволил выявить особенности популяционной структуры области распространения обыкновенной полевки в Беларуси. Отрицательный показатель T's D (-2,09) (статистическая значимость подтверждена на уровне $p \leq 0,05$) у первой линии (см. табл. 2) указывает на отсутствие редких гаплотипов и на возможный всплеск численности популяции. Такие же показатели можно отметить в целом для восточной линии мтДНК. Отрицательный показатель T's D у второй линии (-0,56) говорит о низком числе выявленных гаплотипов по сравнению с числом вариабельных сайтов (избыток редких аллелей).

Анализ генетических показателей обыкновенной полевки в Беларуси позволил предположить, что повторное заселение данным видом современной территории Беларуси происходило с юго-востока на запад и на северо-запад, а также с севера на юго-восток. Число выявленных гаплотипов соответствует таковому в рефугиумах.

Медианная сеть гаплотипов обыкновенной полевки свидетельствует об определенной выраженной дифференциации. Исследуемые нами гаплотипы объединены в гаплогруппы, но часть из них весьма обособлены. Выявленные два кластера распределены по разным ландшафтно-географическим районам и не пересекаются. На медианной сети можно выделить три доминирующих гаплотипа – E1, J1, L6.

Заключение. В результате изучения генетической структуры популяции *M. arvalis* по *mtCytb* установлены пути заселения обыкновенной полевкой современной территории Беларуси.

Исследуемые особи из Беларуси принадлежат к восточной линии, которая широко распространена на восток, юг, встречается в западной части России, в Финляндии, Украине, Чехии, Словакии, Венгрии, Словении и Сербии [11].

При рассмотрении генетического разнообразия особей из Беларуси нами было выделено два кластера. К первой группе были отнесены особи, распространенные в центральной, южной и западной частях Беларуси, а вторую группу представляли особи из северной и восточной частей Беларуси (см. рис. 3, табл. 3).

Уровень полиморфизма *mtCytb* *M. arvalis* из Беларуси оказался достаточно высоким ($Hd \pm SD_{Hd} = 0,97 \pm 0,02$), о чем свидетельствовало большое число выявленных гаплотипов ($n = 41$) из 53 нуклеотидных последовательностей.

Отрицательный показатель $T's D$ ($-1,440$) (статистическая значимость подтверждена на уровне $p \leq 0,05$) в первой группе (табл. 3) говорит об отсутствии редких гаплотипов и указывает на возможный всплеск численности и рост популяции после прохождения состояния «бутылочного горлышка» в период депрессии численности.

При рассмотрении генетических показателей в целом для восточной линии (см. рис. 1) можно наблюдать высокий уровень гаплотипического разнообразия ($Hd = 0,977$) при сравнении с другими пятью линиями мтДНК [28].

Изучение распределения по территории Беларуси выявленных гаплотипов обыкновенной полевки не выявило какой-либо связи с флористической специфичностью территорий. Однако распределение этих гаплотипов по различным ландшафтно-географическим районам, напротив, хорошо соотносится с расположением наиболее удаленных гаплотипов на медианной сети.

Выявленное генетическое разнообразие, а также группируемость обыкновенной полевки в изучаемом макрогеографическом районе служит основой для экстраполяции данных при изучении генетических особенностей других представителей криптической группы.

Благодарности. Авторы выражают признательность П. А. Пакулю за предоставление образцов тканей обыкновенной полевки и И. А. Кришук за помощь в сборе полевого материала.

Работа поддержана БРФФИ на 2020–2022 гг. (проект B20M-062 «Пространственно-биотопическая структура криптических видов обыкновенной полевки (*Microtus arvalis s. l.*) в центральной и западной Беларуси»).

Acknowledgements. The authors express their gratitude to P. A. Pakul for providing tissue samples of the common vole. I. A. Kryschuk in helping with the collection of field material.

The work was supported by the BRFFI for 2020–2022 (project B20M-062 “Spatial and biotopic structure of cryptic species of common vole (*Microtus arvalis s. l.*) in central and western Belarus”).

Список использованных источников

1. The last glacial maximum / P. U. Clark [et al.] // Science. – 2009. – Vol. 325, N 5941. – P. 710–714. <https://doi.org/doi/10.1126/science.1172873>
2. Causes of time-transgressive glacial maxima positions of the last Scandinavian Ice Sheet / E. Larsen [et al.] // Norw. J. Geol. – 2016. – Vol. 96, N 2. – P. 159–170. <https://doi.org/10.17850/njg96-2-06>
3. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe / P. Taberlet [et al.] // Mol. Ecol. – 1998. – Vol. 7, N 4. – P. 453–464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x>
4. Hewitt, G. M. Post-glacial re-colonization of European biota / G. M. Hewitt // Biol. J. Lin. Soc. – 1999. – Vol. 68, N 1–2. – P. 87–112. <https://doi.org/10.1006/bj1.1999.0332>
5. Chronology of the Vistulian (Weichselian) glacial events in the lower Vistula region, middle-north Poland / W. Wysota [et al.] // Geochronometria. – 2002. – Vol. 21. – P. 137–141.
6. Wysota, W. Record of the Vistula ice lobe advances in the Late Weichselian glacial sequence in north-central Poland / W. Wysota, P. Molewski, R. J. Sokołowski // Quat. Int. – 2009. – Vol. 207, N 1–2. – P. 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2008.12.015>
7. Pazonyi, P. Mammalian ecosystem dynamics in the Carpathian Basin during the last 27000 years / P. Pazonyi // Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. – 2004. – Vol. 212, N 3–4. – P. 295–314. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.06.008>
8. Sommer, R. S. Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records / R. S. Sommer, A. Nadachowski // Mammal Rev. – 2006. – Vol. 36, N 4. – P. 251–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2006.00093.x>
9. Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens / J. M. Wójcik [et al.] // J. Zool. – 2010. – Vol. 281, N 4. – P. 249–262. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00699.x>
10. Land-bridge calibration of molecular clocks and the post-glacial colonization of Scandinavia by the Eurasian field vole *Microtus agrestis* / J. S. Herman [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 8. – P. e103949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103949>
11. Post-glacial colonization of eastern Europe from the Carpathian refugium: evidence from mitochondrial DNA of the common vole *Microtus arvalis* / J. Stojak [et al.] // Biol. J. Linnean Soc. – 2015. – Vol. 115, N 4. – P. 927–939. <https://doi.org/10.1111/bj.12535>
12. New insight into the colonization processes of common voles: inferences from molecular and fossil evidence / C. Tougaard [et al.] // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, N 10. – P. e3532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003532>
13. A new cytochrome b phylogroup of the common vole *Microtus arvalis* endemic to the Balkans and its implications for the evolutionary history of the species / E. V. Bužan [et al.] // Biol. J. Linnean Soc. – 2010. – Vol. 100, N 4. – P. 788–796. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01451.x>
14. Divergent evolutionary processes associated with colonization of offshore islands / N. Martínková [et al.] // Mol. Ecol. – 2013. – Vol. 22, N 20. – P. 5205–5220. <https://doi.org/10.1111/mec.12462>
15. Haynes, S. Phylogeography of the common vole *Microtus arvalis* with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago / S. Haynes, M. Jaarola, J. B. Searle // Mol. Ecol. – 2003. – Vol. 12, N 4. – P. 951–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01795.x>

16. Contrasting and congruent patterns of genetic structuring in two *Microtus vole* species using museum specimens / J. Stojak [et al.] // *Mamm. Res.* – 2016. – Vol. 61. – P. 141–152. <https://doi.org/10.1007/s13364-015-0260-y>
17. Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole *Microtus arvalis* / G. Heckel [et al.] // *Evolution.* – 2005. – Vol. 59, N 10. – P. 2231–2242. <https://doi.org/10.1554/05-255.1>
18. Climate and refugial origin influence the mitochondrial lineage distribution of weasels *Mustela nivalis* in a phylogeographic suture zone / A. D. McDevitt [et al.] // *Biol. J. Linnean Soc.* – 2012. – Vol. 106, N 1. – P. 57–69. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01840.x>
19. Шефтель, Б. И. Методы учета численности мелких млекопитающих / Б. И. Шефтель // *Rus. J. Ecosyst. Ecol.* – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 1–21.
20. К распространению изменчивости видов-двойников *Microtus arvalis s.l.* (Rodentia, Arvicolinae) в Центральном Черноземье по хромосомным и молекулярно-генетическим данным / М. И. Баскевич [и др.] // *Зоол. журн.* – 2009. – Т. 88, № 4. – С. 473–487.
21. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28, N 10. – P. 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
22. Bandelt, H. J. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies / H. J. Bandelt, P. Forster, A. Rohlf // *Mol. Biol. Evol.* – 1999. – Vol. 16, N 1. – P. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
23. Diverse responses of common vole (*Microtus arvalis*) populations to Late Glacial and Early Holocene climate changes – Evidence from ancient DNA / M. Baca [et al.] // *Quaternary Sci. Rev.* – 2020. – Vol. 233. – Art. 106239. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2020.106239>
24. The Tien Shan vole (*Microtus ilaeus*; Rodentia: Cricetidae) as a new species in the Late Pleistocene of Europe / M. Baca [et al.] // *Ecol. Evol.* – 2021. – Vol. 11, N 22. – P. 16113–16125. <https://doi.org/10.1002/ece3.8289>
25. High levels of genetic change in rodents of Chernobyl / R. J. Barker [et al.] // *Nature.* – 1996. – Vol. 380. – P. 707–708. <https://doi.org/10.1038/380707a0>
26. Librado, P. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // *Bioinformatics.* – 2009. – Vol. 25, N 11. – P. 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
27. Markova, A. K. The Mikulino (= Eemian) mammal faunas of the Russian Plain and Crimea / A. K. Markova // *Net. J. Geosci.* – 2000. – Vol. 79, N 2–3. – P. 293–301. <https://doi.org/10.1017/S0016774600021776>
28. Leigh, J. W. POPART: full-feature software for haplotype network construction / J. W. Leigh, D. Bryant // *Methods Ecol. Evol.* – 2015. – Vol. 6, N 9. – P. 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

References

1. Clark P. U., Dyke A. S., Shakun J. D., Carlson A. E., Clark J., Wohlfarth B., Mitrovica J. X., Hostetler S. W., McCabe A. M. The last glacial maximum. *Science*, 2009, no. 5941, pp. 710–714. <https://doi.org/10.1126/science.1172873>
2. Larsen E., Fredin O., Liså A., Amantov A., Fjeldskaar V., Ottesen D. Causes of time-transgressive glacial maxima positions of the last Scandinavian Ice Sheet. *Norwegian Journal of Geology*, 2016, vol. 96, no. 2, pp. 159–170. <https://doi.org/10.17850/njg96-2-06>
3. Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G., Cosson J. F. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 1998, vol. 7, no. 4, pp. 453–464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x>
4. Hewitt, G. M. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1999, vol. 68, no. 1–2, pp. 87–112. <https://doi.org/10.1006/bjil.1999.0332>
5. Wysota W., Lankauf K. R., Szman'da J., Chrus'cin'ska A., Oczkowski H. L., Przegietka K. R. Chronology of the Vistulian (Weichselian) glacial events in the lower Vistula region, middle-north Poland. *Geochronometria*, 2002, vol. 21, pp. 137–141.
6. Wysota W., Molewski P., Sokołowski R. J. Record of the Vistula ice lobe advances in the Late Weichselian glacial sequence in north-central Poland. *Quaternary International*, 2009, vol. 207, no. 1–2, pp. 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2008.12.015>
7. Pazonyi, P. Mammalian ecosystem dynamics in the Carpathian Basin during the last 27000 years. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 2004, vol. 212, no. 3–4, pp. 295–314. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.06.008>
8. Sommer R. S., Nadachowski A. Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review*, 2006, vol. 36, no. 4, pp. 251–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2006.00093.x>
9. Wójcik J. M., Kawałko A., Marková S., Searle J. B., Kotlík P. Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens. *Journal of Zoology*, 2010, vol. 281, no. 4, pp. 249–262. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00699.x>
10. Herman J. S., McDevitt A. D., Kawałko A., Jaarola M., Wójcik J. M., Searle J. B. Land-bridge calibration of molecular clocks and the post-glacial colonization of Scandinavia by the Eurasian field vole *Microtus agrestis*. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 8, p. e103949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103949>
11. Stojak J., McDevitt A. D., Herman J. S., Searle J. B., Wójcik J. M. Post-glacial colonization of eastern Europe from the Carpathian refugium: evidence from mitochondrial DNA of the common vole *Microtus arvalis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2015, vol. 115, no. 4, pp. 927–939. <https://doi.org/10.1111/bij.12535>
12. Tougaard C., Renvoisé E., Petitjean A., Quéré J. P. New insight into the colonization processes of common voles: inferences from molecular and fossil evidence. *PLoS ONE*, 2008, vol. 3, no. 10, p. e3532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003532>

13. Bužan E. V., Förster D. W., Searle J. B., Kryštufek B. A new cytochrome b phylogroup of the common vole *Microtus arvalis* endemic to the Balkans and its implications for the evolutionary history of the species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2010, vol. 100, no. 4, pp. 788–796. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01451.x>
14. Martínková N., Barnett R., Cucchi T., Struchen R., Pascal M., Pascal M. [et al.]. Divergent evolutionary processes associated with colonization of offshore islands. *Molecular Ecology*, 2013, vol. 22, no. 20, pp. 5205–5220. <https://doi.org/10.1111/mec.12462>
15. Haynes S., Jaarola M., Searle J.B. Phylogeography of the common vole *Microtus arvalis* with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. *Molecular Ecology*, 2003, vol. 12, no. 4, pp. 951–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01795.x>
16. Stojak J., Wójcik J. M., Ruczyńska I., Searle J. B., McDevitt A. D. Contrasting and congruent patterns of genetic structuring in two *Microtus vole* species using museum specimens. *Mammal Research*, 2016, no. 61, pp. 141–152. <https://doi.org/10.1007/s13364-015-0260-y>
17. Heckel G., Burri R., Fink S., Desmet J.-F., Excoffier L. Genetic structure and colonization processes in European populations of the common vole *Microtus arvalis*. *Evolution*, 2005, vol. 59, no. 10, pp. 2231–2242. <https://doi.org/10.1554/05-255.1>
18. McDevitt A. D., Zub K., Kawałko A., Oliver M. K., Herman J. S., Wójcik J. M. Climate and refugial origin influence the mitochondrial lineage distribution of weasels *Mustela nivalis* in a phylogeographic suture zone. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2012, vol. 106, no. 1, pp. 57–69. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01840.x>
19. Sheftel' B. I. Methods for estimating the abundance of small mammals. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 1–21 (in Russian).
20. Baskevich M. I., Potapov S. G., Okulova N. M., Capel'nikov S. F., Vlasov A. A., Oparin M. L., Mironova T. A., Avilova E. A. To the distribution of variability of species-twins of *Microtus arvalis* s.l. (Rodentia, Arvicolinae) in the Central Chernozem region according to chromosomal and molecular genetic data. *Zoologicheskii zhurnal* [Zoological journal], 2009, vol. 88, no. 4, pp. 473–487 (in Russian).
21. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
22. Bandelt H. J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, vol. 16, no. 1, pp. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
23. Baca M., Popović D., Baca K., Lemanik A., Doan K., Horáček I. [et al.]. Diverse responses of common vole (*Microtus arvalis*) populations to Late Glacial and Early Holocene climate changes – Evidence from ancient DNA. *Quaternary Science Reviews*, 2020, vol. 233, art. 106239. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2020.106239>
24. Baca M., Popović D., Lemanik A., Fewlass H., Talamo S., Zima J., Ridush B., Popov V., Nadachowski A. The Tien Shan vole (*Microtus ilaeus*; Rodentia: Cricetidae) as a new species in the Late Pleistocene of Europe. *Ecology and Evolution*, 2021, vol. 11, no. 22, pp. 16113–16125. <https://doi.org/10.1002/ece3.8289>
25. Barker R. J., Van Den Bussche R. A., Wright A. J., Wiggins L. E., Hamilton M. J., Reat E. P., Smith M. H., Lomakin M. D., Chesser R. K. High levels of genetic change in rodents of Chernobyl. *Nature*, 1996, vol. 380, pp. 707–708. <https://doi.org/10.1038/380707a0>
26. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 11, pp. 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
27. Markova A. K. The Mikulino (= Eemian) mammal faunas of the Russian Plain and Crimea. *Netherlands Journal of Geosciences*, 2000, vol. 79, no. 2–3, pp. 293–301. <https://doi.org/10.1017/S0016774600021776>
28. Leigh J. W., Bryant D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 2015, vol. 6, no. 9, pp. 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

Информация об авторах

Машков Евгений Игоревич – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mashkov.evgenii25@gmail.com

Гайдученко Елена Сергеевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gajduchenko@tut.by

Борисов Юрий Михайлович – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (Ленинский проспект, 27, 119071, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: borisov2693@gmail.com

Information about the authors

Evgeniy I. Mashkov – 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: mashkov.evgenii25@gmail.com

Helen S. Gajduchenko – 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: gajduchenko@tut.by

Yury M. Borisov – D. Sc. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Ecology and Evolution Problems. A. N. Severtsov Russian Academy of Sciences (27, Leninski Ave., 119071, Moscow, Russian Federation). E-mail: borisov2693@gmail.com

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

АГЛЯДЫ REVIEWS

УДК 581.1
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-75-88>

Поступила в редакцию 24.08.2022
Received 24.08.2022

И. Д. Волотовский, С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская

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

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ (ТРАНСДУКЦИИ) В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

Аннотация. В данном обзоре рассматриваются три фундаментальных процесса, протекающих в растительных организмах под влиянием факторов внешней среды (свет и сила тяжести) и имеющих ключевое значение для функционирования растений. В случае света это фитохромная регуляция и фототропизмы, третий рассматриваемый процесс – гравитропизм. Фитохром – фоторегуляторная реакция, при подавлении которой растение не может нормально развиваться. Фототропизмы и гравитропизм растениям крайне нужны, и они выработаны в ходе эволюции. Указанные процессы реализуются по одной и той же логической схеме: рецепция стимула – сигнальные процессы в клетке (трансдукция) – собственно биологический эффект. В соответствии с этой схемой осуществлялось и рассмотрение указанных процессов. В результате приведены данные о том, что рецепторные стадии реакций принципиально различаются из-за природы рецепторов. Сигнальные процессы протекают с участием большого числа низко- и высокомолекулярных медиаторов биофизических, биохимических и генетических реакций. Обращается внимание на то, что одни те же медиаторы представлены в сигнализации, а также в принципиально различающихся по конечному эффекту процессах, что, как предполагается, свидетельствует о наличии в клетке не отдельных для каждого стимула сигнальных цепочек, а регуляторной сети, сформированной на базе вертикальных и горизонтальных цепей трансдукции.

Ключевые слова: фитохромная регуляция, фототропизмы, гравитропизм, высшие растения, сигнальные процессы, трансдукция

Для цитирования: Волотовский, И. Д. Биофизические механизмы внутриклеточной сигнализации (трансдукции) в высших растениях / И. Д. Волотовский, С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 1. – С. 75–88. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-75-88>

Igor D. Volotovskii, Sviatlana V. Sukhaveyeva, Elena M. Kabachevskaya

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

BIOPHYSICAL MECHANISMS OF INTRACELLULAR SIGNALING (TRANSDUCTION) IN HIGHER PLANTS

Abstract. Three fundamental processes running in plant organisms under influence of environment (light, gravity) and key importance were considered. In the light case these are phytochrome regulation and phototropism considering process is gravitropism. Phytochrome is responsible for regulatory reaction at the inhibition of which the plants cannot be normally developed. The plants do not need phototropism and gravitropism. They were elaborated by evolution as protective reactions to optimize the plant vitality. All these processes are realized according to one and the same logical scheme: stimulus reception, signaling processes in plant cell (transduction) and proper biological effect. According to this scheme the three reactions were considered. As the result the data about the reception stages are principally different because receptor nature. Signaling processes proceed with participation of many low molecular and high molecular mediators to participate and biophysical, biochemical and genetic reactions. One fact attracts attention that the same mediators are involved to signaling ending by principally different final biological effect. This allows to suggest the existence in plant cell no separate chains for each stimulus but regulatory network formed by lateral and horizontal transduction chains.

Keywords: phytochrome regulation, phototropism, gravitropism, higher plants, signaling processes, transduction

For citation: Volotovskii I. D., Sukhaveyeva S. V., Kabachevskaya E. M. Biophysical mechanisms of intracellular signaling (transduction) in higher plants. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 75–88 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-1-75-88>

Введение. Под внутриклеточной сигнализацией понимают комплекс процессов, которые протекают в клетке в период между первичным действием внешнего фактора на клетку и конечным собственно биологическим эффектом. В процессе развития растений они находятся под постоянным воздействием биологически значимых экстремальных абиотических факторов внешней среды, которые, как правило, оказывают существенное влияние на внутриклеточные процессы, которые лежат в основе их жизнедеятельности. Действие факторов внешней среды может носить как позитивный, так и негативный характер. В первую очередь это касается влияния света, прямо не связанного с фотосинтезом. В этом случае речь идет о многообразном регуляторном воздействии света, реализуемом в растении с помощью специализированных фоторецепторных белков фитохрома и криптохрома, оптимизирующих практически все внутриклеточные морфогенетические процессы, чего не наблюдается при скотоморфогенезе у растений, находящихся в темноте. Во втором случае функционирование клетки никак не связано с действием света, и растение может легко обходиться без него. Высшие растения, к сожалению, фиксированы в пространстве и не могут менять свою локализацию, чтобы «избежать беды». Тем не менее природа предусмотрела механизмы, благодаря которым растениям удастся ослабить вредное внешнее влияние и тем или иным способом оптимизировать свое существование. Реакция растений на действие этих факторов получила название «биофизический тропизм». По сути дела, тропизмы – это ростовые движения органов растений (стебля, корня, листьев), их ориентация в пространстве, обусловленные направленным действием какого-либо фактора. В зависимости от его природы различают фото-, механо-, хемо-, грави-, термо-, тигмо- и электротропизмы и др. В случае тропизмов это или неравномерный рост его органов в сторону действующего фактора (положительный тропизм) или от него (отрицательный тропизм).

Наряду с тропизмами еще один вид движения представляют настии. Настии – это движения органов растения, вызываемые внешним фактором, не имеющим строгой направленности и действующим равномерно на все растение. Факторами, вызывающими настические движения, являются изменения температуры, освещенности, влажности воздуха в течение суток. Различают термо-, фото-, хемо-, гидро-, тигмо-, сейсмо-, электро- и травмонастии. К настическим движениям способны лишь двусторонне-симметричные органы (листья, лепестки).

В перечень факторов, оказывающих негативное влияние, кроме света входят и другие типы внешних абиотических воздействий. Реакция растения на них, как уже упоминалось, получила название тропизм. В упрощенном варианте и регуляторные фитохромные реакции, и тропизмы включают в себя рецепцию растительной клеткой действующего фактора, первичную реакцию на уровне рецептора, внутриклеточную сигнализацию (или трансдукцию) с помощью различных внутриклеточных медиаторов, активацию биофизических, биохимических и генетических систем клетки и собственно биологический эффект – модификацию процессов жизнедеятельности. Рецепторы растений, улавливающие внешние сигналы, отличаются не только по количеству, но и по своей природе и локализации. Как правило, они находятся внутри растительной клетки в свободном или в связанном с внутриклеточными мембранами состоянии. Учитывая наличие большого массива данных по этой проблеме, которые вряд ли можно обобщить в отдельной статье, рассмотрим три наиболее важных процесса, вызываемых действием внешних факторов: фитохромную регуляцию, фототропизмы и гравитропизм.

Фитохромная регуляция. Фитохромы – это светосенсорные внутриклеточные хромопротеиды, с помощью которых в высших растениях осуществляются такие важные процессы, как прорастание семян, фотоморфогенез проростков растений, эффект избегания тени, состояние покоя, циркадные ритмы, зацветание и старение (рис. 1) [1]. В состав канонической макромолекулы фитохрома входят N-терминальный фотосенсорный и C-терминальный регуляторный модули (участки). Фотосенсорный модуль включает в себя три консервативных регуляторных домена: аминокислотное чередование Per/Arnt/Sim, цГМФ фосфодиэстеразу и собственно простетическую группу фитохрома (РНУ) – разомкнутый билитриеновый тетрапиррол.

Данные структуры играют существенную роль в улавливании квантов света и претерпевают инверсию между двумя фотообратимыми конформационными состояниями с характерными максимумами поглощения света 650–670 нм и дальнекрасной формой 705–740 нм, обозначаемыми

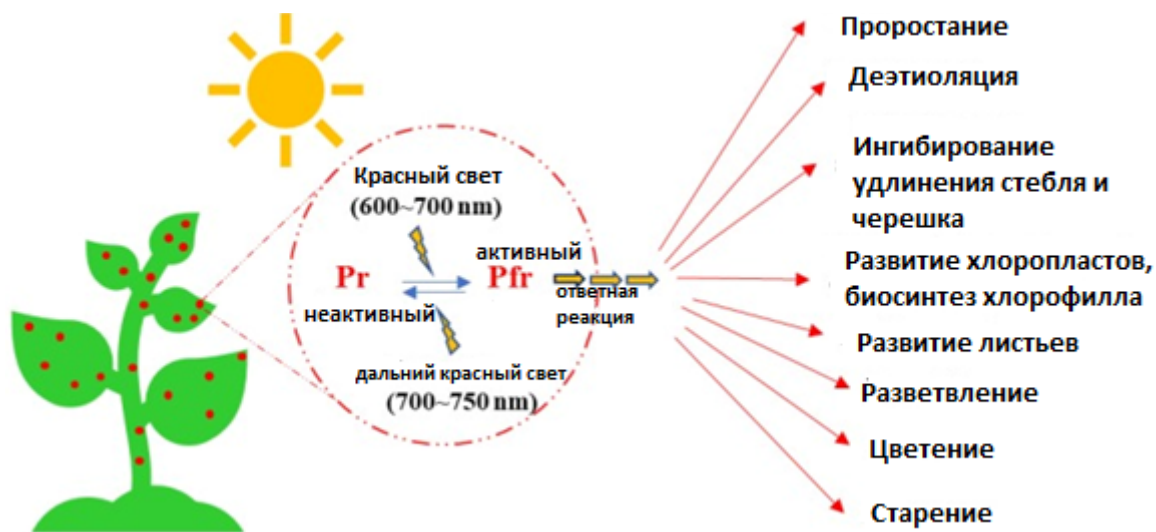


Рис. 1. Типы фитохром-зависимых эффектов в высших растениях [1]

Fig. 1. Types of phytochrome dependent effects in higher plants [1]

символами Pr и Pfr. Каждая форма представляет собой димер с молекулярной массой порядка 240 кДа, фоточувствительность обеспечивается разомкнутым тетрапиррольным хромофором, ковалентно связанным с N-терминальным модулем каждого мономера. С-терминальный модуль содержит PAS–PAS повтор, который следует за гистидинкиназным доменом. Семейство растительных фитохромов кодируется в ядре и представлено в высших растениях шестью фоторецепторными макромолекулами – *PHYA*, *PHYB/C*, *D*, *E* и *PHYE*. Фитохромы синтезируются в неактивном Pr-состоянии. Pfr-форма инактивируется при облучении дальнекрасным светом и в ходе темновой термальной релаксации. Фитохромы в клетке находятся в состоянии димеризации и существуют в виде трех структурных форм: Pr–Pr, Pfr–Pr и Pfr–Pfr (рис. 2, а). Благодаря фотоконверсии и термальной релаксации различают светочувствительный (*PhyA*) и светостабильный (*PhyB*, *PhyE*) фитохромы, среди которых *phyA* ответствен за биологическую активность. В темноте фитохромом находится в Pr-форме. При этом время темновых условий должно быть длительным (рис. 2, б). Учитывая, что фитохромный ответ растения зависит от пропорции Pfr-конформера в фитохромном фонде, процесс сигнализации зависит от интенсивности света, его длины волны и температуры. В основе превращения Pr в Pfr лежит фотохимическая реакция фотоизомеризации билитриенового хромофора, которая проходит через ряд промежуточных стадий и завершается конформационным переходом белкового носителя и изменением спектральных и функциональных параметров фоторецепторного белка. Pfr является стартовым событием сигнальной трансдукции, в конечном счете приводящей к биологическому эффекту. Прежде чем перейти к рассмо-

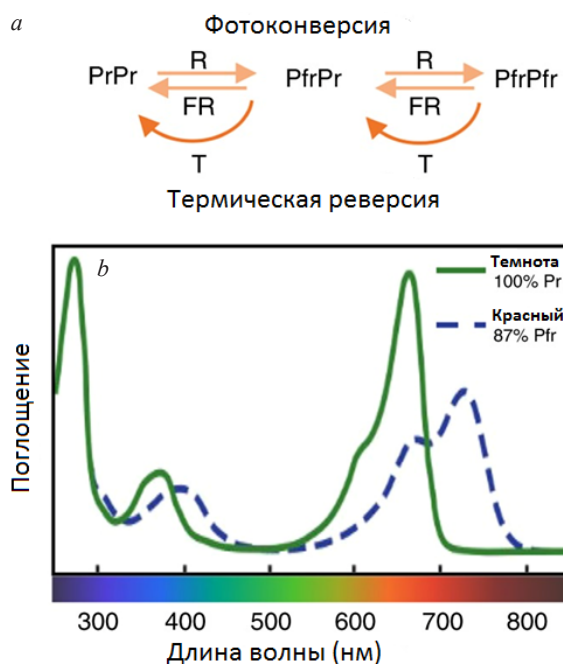


Рис. 2. Схемы, иллюстрирующие состояние фитохрома в клетке: а – переходы между димерными состояниями фитохрома, б – спектры поглощения красной и дальнекрасной форм фитохрома А [2]

Fig. 2. Schemes illustrating the state of phytochrome in the cell: а – the transitions between dimeric states of phytochrome, б – absorption spectra of red and far-red of phytochrome forms [2]

трению процессов сигнализации, следует привести перечень реакций, которые фитохром-зависимы от интенсивности красного света. Различают три группы реакций: VLFR-реакции очень низкой интенсивности, LFR-реакции низкой интенсивности и HIR – высокоэнергетические реакции. Описаны также два типа HIR, обозначенные как R-HIR и FR-HIR. На рис. 3 приведена информация об этих реакциях.

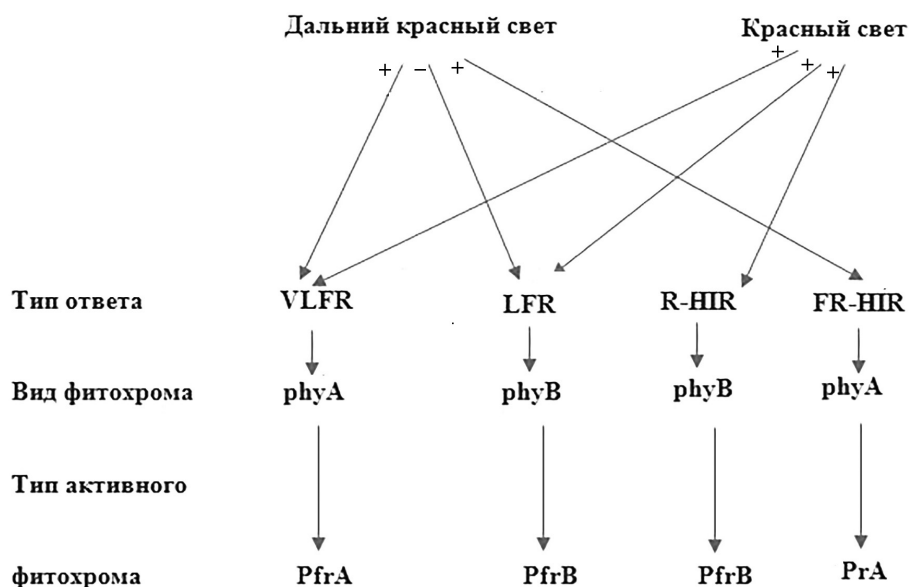


Рис. 3. Схема перехода одной формы фитохрома в другую под влиянием света [1]

Fig. 3. Scheme of the transition of one form of phytochrome to another under the action of light [1]

Схема на рис. 3 свидетельствует о сложном характере ответов и, следовательно, о наличии разнообразных путей сигнализации, специфически организованных с точки зрения природы и числа формирующих их компонентов. Для понимания особенностей строения сигнальных цепочек имеют значение события в цитоплазме клетки, где фитохромы синтезируются и в темноте представлены красной формой, и в ядре, так как красный свет включает экспрессию большого числа так называемых светоиндуцибельных генов. Кроме того, на процессы сигнализации оказывают влияние самые разные низкомолекулярные регуляторные молекулы и биохимические реакции, являющиеся результатом образования биологически активного фитохрома. Еще в 1990-е годы считалось, что сигнализация – это набор пространственно изолированных линейных цепей. Однако в последние годы общепринятым стало понимание того, что сигнализация представляет собой высокоупорядоченную многомерную цепь событий, объединенных в единую сеть. При этом события имеют место и в цитоплазме, и в ядре клетки, и даже в хлоропластах. Важную роль при этом играют протеосомы, с помощью которых осуществляется деградация хромопротеида и интермедиатов его превращений. Двумя узловыми моментами сигнальной трансдукции фитохрома являются транспорт фитохрома после его фототрансформации из цитоплазмы в ядро и его действие на уровне генома клетки, которые меняют палитру экспрессии многих генов, связанных с фенотипическими проявлениями после превращения красной формы хемопротеина в дальнюю красную.

В растениях, находящихся в темноте, все пять форм фитохрома локализованы в цитоплазме клетки. Однако после освещения растений красным светом через несколько минут они все оказываются в ядре, где формируются в белковый комплекс – фототело. Размеры этого комплекса и распределение в ядре контролируются интенсивностью света облучения и его продолжительностью. Не вдаваясь в механизм транслокации макромолекул фитохрома из цитоплазмы в ядро, который, к сожалению, еще не до конца изучен, следует отметить, что для транспорта критическое значение имеет ряд сложноорганизованных белковых факторов. Это комплекс COP1/SPA1

(constitutively 1 (COP1)/suppressor of PHYA), который инактивирует несколько специализированных факторов PISs (phytochrome interacting factors) и выступает как негативный регулятор сигнализации. В темноте COP1 находится в ядре, но после фототрансформации фитохром выходит в цитоплазму, где и реализует свое биологическое действие. Позитивными регуляторами являются два специфических белка – FHY1 (far-red elongation 1) и FHL (FHY1-like). Каждый из них включает две функциональные группы – NLS (nuclear localization signal) и NES (nuclear export signal). Все взаимодействия между факторами происходят на уровне N-терминального домена макромолекулы фитохрома. Предполагается [3], что транспорт фитохрома в системе цитоплазма–ядро происходит согласно схеме, приведенной на рис. 4.

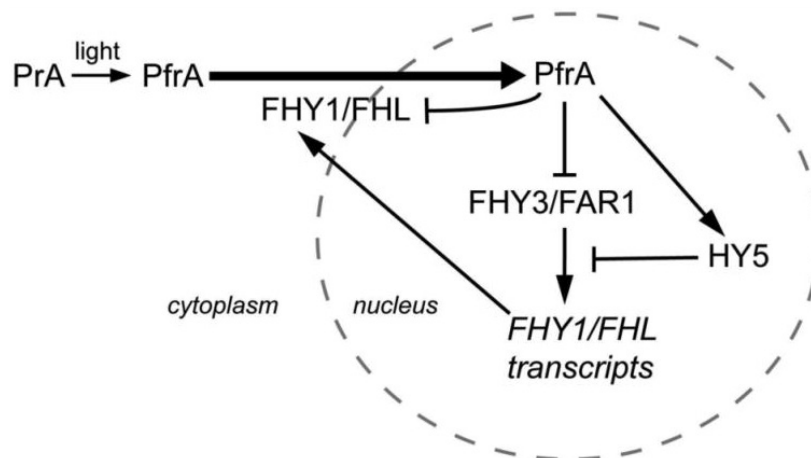


Рис. 4. Упрощенная схема, описывающая транспорт фитохрома из цитоплазмы в ядро и из ядра в цитоплазму [3]

Fig. 4. Simplified scheme describing the phytochrome transport from cytoplasm to nucleus and from nucleus to cytoplasm [3]

В реальности FHY1/FHL выполняют роль челночных белков. Вместе с Pfr они проникают в ядро и после его разрушения возвращаются в цитоплазму. Все эти механизмы были установлены с помощью многих мутантов, дефицитных по регуляторным белкам. Согласно данной модели, содержание челночного комплекса FHY1/FHL имеет ключевое значение для реализации фитохромной сигнализации. В свою очередь экспрессия FHY1/FHL контролируется двумя регуляторными белками – FHY3 (far-red elongated hypocotyl 3) и FAR1 (far-red impaired response 1), которые связываются с промоторными участками генов-мишеней и подавляют их экспрессию. Еще одним регуляторным механизмом при высоких концентрациях Pfr является фосфорилирование FHY1. Примечательно, что протеосомы ингибируют преимущественно фосфорилированные белки.

После доставки в ядро и формирования прототела молекула Pfr принимает участие в регуляции экспрессии фотоиндуцибельных генов с помощью набора транскрипционных факторов. Главные из них следующие: LAF1 (long after far-red light 1), HFR1 (long hypocotyl in far-red 1), HY5 (elongated hypocotyl 5) и PIF3 (phytochrome interacting factor 3). В цепи сигнализации данные факторы локализованы после фитохрома. Установлено, что факторы могут вступать в комплекс с FHY1 и/или FHL и что PhyA может взаимодействовать с промоторными участками генов. В то же время существует и другая точка зрения [3]. У мутантов арабидопсиса, дефицитных по FHY1 FHL, хорошо воспроизводится эффект активации светоиндуцибельных генов. Это свидетельствует о том, что в клетке, как уже упоминалось выше, работают не отдельные прямые цепочки трансдукции, а существует регуляторная сеть сигнальной трансдукции, в которой ряд вертикальных и горизонтальных цепочек взаимодействует друг с другом. Однако, несмотря на пертурбации в клетке, сигнал от фоторецептора должен достичь своей финальной мишени, так как это чрезвычайно важно для вегетации, роста и других этапов жизнедеятельности растения. Следует отметить также, что транспорт фитохрома из цитоплазмы в ядро был сначала зарегистрирован у PhyB, но более детально это явление было изучено у PhyA. Кроме длительных по

времени фотоиндуцибельных ответов с лаг-фазой, которые реализуются на уровне генома, описаны и быстрые ответы, наблюдаемые через несколько минут после К-облучения. Это свидетельствует о том, что в основе этих ответов лежат сигнальные процессы в цитоплазме клетки. Существенное влияние на процесс транспорта оказывают ионы Ca^{2+} и мононуклеотид цГМФ [4–6]. Именно Ca^{2+} и цГМФ наряду с регуляцией транспорта фитохрома в ядро принимают участие в реализации быстрых фитохромных ответов. Что касается процессов в ядре, то Ca^{2+} и цГМФ контролируют по крайней мере синтез антоцианов и развитие хлоропластов [7].

Фототропизмы. Как упоминалось выше, свет – один из самых эффективных факторов внешней среды, которые контролируют рост и развитие растения через специализированные фоторецепторы, улавливающие биологически активный свет и обеспечивающие индукцию, модуляцию и реализацию фототропного ответа высшего растения [8]. За последние несколько десятилетий фототропизмы у высших растений хорошо изучены. Оказалось, что в основе эффекта реориентации роста органов растения (положительный фототропизм в направлении источника света или отрицательный в направлении от источника света) лежит латеральное перемещение гормона роста ауксина, которое в зависимости от знака фототропизма приводит к образованию на противоположной или освещенной стороне стебля области клеточной элонгации [9]. Рецепторы, поглощающие биологически активный свет, получили название рецепторов голубого света (ГС). Идентифицировано два рецептора – PHOT1 и PHOT2 [10]. На рис. 5 приведено описание этого процесса в высшем растении, индуцированного голубым светом фототропизма.

PHOT1 контролирует реакции, запускаемые низкоинтенсивным ГС. Именно он ответственен за фототропизм, в то время как при умеренных интенсивностях ГС оба фоторецептора работают на полную мощность. Кроме фототропизма оба фоторецептора вовлечены в процессы, связанные с повышением эффективности фотосинтеза. Так, например, они контролируют открывание устьиц, экспансию стебля и листьев и их подвижность, чтобы создать более благоприятные условия для поглощения фотосинтетически активного света. При низких интенсивностях света оба фототропина стимулируют ориентацию хлоропластов перпендикулярно к падающему свету, а при высоких интенсивностях благодаря phot2 хлоропласты передвигаются к краю листа, чтобы уклониться от падающего на растение света. У обоих фототропинов сходны строение полипептидной цепи и организация доменов. N-терминальная половина макромолекулы содержит фотосенсорную область, а C-терминальная – домен протеинкиназы D. Фотосенсорная порция фототропинов содержит два повторяющихся домена, содержащих по ~110 аминокислотных остатков, получивших название LOV1 (light, oxygen and voltage) и LOV2, с которыми соединены по одной молекуле FMN (flavin mononucleotide) как поглощающей свет простетической группе. В темноте FMN нековалентно ассоциирован с LOV-доменом, но под влиянием ГС FMN образует с ним обратимый аддукт, вступая в реакцию с расположенным рядом Cys-остатком. Хотя фотоциклы фототропинов сходны, однако LOV1, по-видимому, регулирует димеризацию рецепторных молекул, а LOV2 – активность C-терминальной протеинкиназы D. В отсутствие света LOV2 принимает свернутую конформацию и стерически ингибирует PKD. После облучения аддукт разрушается и PKD вновь становится активной, в результате чего происходит множественное автофосфорилирование сериновых остатков в макромолекуле фоторецептора. Считается, что фосфорилированные фототропины являются их активированной версией. Протеинкиназа D состоит из нескольких белковых семейств. Как и в случае с фитохромом, к изучению механизмов действия фототропинов были привлечены разнообразные мутанты, с помощью которых были получены доказательства, что в фототропной сигнализации существенное значение имеет автофосфорилирование PHOT1. Хотя в темноте оба фототропина тесно связаны с плазматической мембраной, после обесцвечивания ГС они выходят в цитоплазму, где взаимодействуют с клатрином (активатором эндоцитоза). Интернализация макромолекул фототропинов происходит после их автофосфорилирования. Определено, что фосфорилируется Сер-851. Как и в случае с животными клетками, когда связывание лиганда вызывает моно/мультиубиквитинизацию плазматической мембраны со взаимодействующим с ней рецептором и последующим эндоцитозом комплекса, есть все больше оснований полагать, что сходная картина наблюдается и с фототропинами.

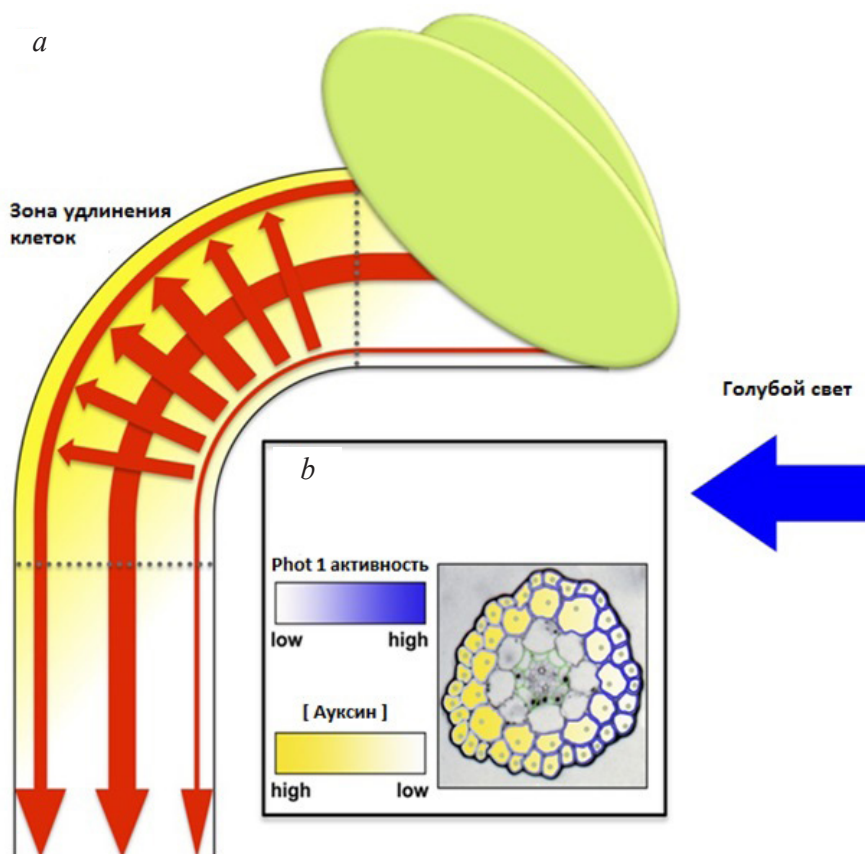


Рис. 5. Индуцированный голубым светом фототропизм в высшем растении, в основе которого лежит установление дифференциального градиента ауксина [10]: *a* – схема, объясняющая фототропный изгиб hypocotyl. Ауксин синтезируется в апикальной части стебля и транспортируется в корни по сосудам стебля и в клеточные эпидермальные и суэпидермальные слои (красные стрелки, направленные вниз). В проростках растений, растущих в темноте, количество транспортируемого ауксина не отличается от его количества на всех участках hypocotyl проростков. В проростках, облученных направленным голубым светом, возникает дифференцирование потока ауксина вниз. Голубой свет также вызывает латеральное перераспределение фитогормона с освещенной в затемненную часть hypocotyl. Благодаря этим эффектам наблюдается различное накопление фитогормона в зоне элонгации затемненной части по сравнению с освещенным участком; *b* – схема среза через зону элонгации в hypocotyle проростков *Arabidopsis*, иллюстрирующая образование градиента активности phot1 и накопление ауксина. Точками показаны ядра клеток двух клеточных слоев. Зеленым цветом помечены эндодермальные клетки и латеральное перемещение гормона роста ауксина, которое приводит к образованию (в зависимости от знака фототропизма) на противоположной или освещенной стороне стебля области клеточной элонгации

Fig. 5. Blue light-induced phototropism in a higher plant, which is based on the establishment of a differential auxin gradient [10]: *a* – scheme explaining the phototropic bending of the hypocotyl. Auxin is synthesized in the apical part of the stem and transported to the roots through stem vessels and to the cellular epidermal and suerepidermal layers (red arrows pointing down). In seedlings of plants growing in the dark, the amount of transported auxin does not differ from its amount in all areas of the seedling hypocotyl. In seedlings irradiated with directional blue light, a downward differentiation of the auxin flow occurs. Blue light also causes lateral redistribution of the phytohormone from the illuminated to the dark part of the hypocotyl. Due to these effects, there is a different accumulation of the phytohormone in the elongation zone of the darkened part compared to the illuminated area; *b* – scheme of a section through the elongation zone in the hypocotyl of *Arabidopsis* seedlings, illustrating the formation of a phot1 activity gradient and the accumulation of auxin. The dots show the cell nuclei of two cell layers. Endodermal cells and lateral movement of the growth hormone auxin are marked in green, which leads to the formation (depending on the sign of phototropism) of the area of cell elongation on the opposite or illuminated side of the stem

Обнаружено, что изменение содержания цитозольного Ca обусловлено фототропизмом, индуцированным голубым светом [12].

Позднее было обнаружено, что PHOT1 взаимодействует с особым белком – ABCB19 (ATP-binding cassette B), относящимся к семейству трансмембранных транспортеров [13], который, как полагают, является переносчиком, ответственным за выбор ауксина. Оказалось также, что ABCB19

может ингибироваться PNOT1-зависимым фосфорилированием, при этом активируется фототропный изгиб. Центральное место в реализации биологического эффекта фототропина занимает фитогормон ауксин, градиент которого устанавливается под влиянием ГС и, как следствие, в результате модификации транспорта фитогормона. Как известно, ГС вызывает асимметричное клеточное распределение ауксина, что связано с особенностями транспорта фитогормона. Обнаружено 8 PIN-белков. Пять из них представляют собой полноразмерные канонические транспортные белки и облегчают выброс ауксина через плазматическую мембрану, в состав которой они входят. Три остальных частично модифицированы по длине аминокислотной цепочки и контролируют внутриклеточную подвижность. PIN1 и PIN2 являются основными переносчиками ауксина в стебле и корнях в течение всех стадий развития растения. PIN3, PIN4 и PIN7 экспрессируются слабо, и их локализация (аполярная и полярная) особенно чувствительна к внутренним и внешним сигналам. Так, в темноте PIN3 локализована полярно в гипокотиле и корнях, в то время как после фототропной стимуляции он занимает полярную позицию. От темноты или освещенности зависит его экспрессия и локализация относительно эндодермальных клеток. Считается, что PIN3-фактор связан с асимметричным распределением фототропина как внутри отдельных эндодермальных клеток, так и между освещенной и затемненной частями проростков. Характерно, что у мутанта, дефицитного по PNOT1, этот эффект отсутствует, а у нольмутанта PIN3 практически отсутствуют эффекты, индуцированные фототропином, как в гипокотиле, так и в корнях. Изучение мутантов PIN-белков позволило заключить, что все эти белки в той или иной степени вносят свой вклад в фототропный ответ растения. Что касается ABCB-белков, то их участие в фототропизме является вопросом дискуссии. Принято считать, что ауксин вызывает быстрые изменения на уровне транскрипции генов. В последние годы была разработана молекулярная модель этих событий, которая включает: 1) ДНК-нуклеотидную последовательность (мишень) в ДНК AuxREs (auxin response elements); 2) регуляторы транскрипционного связывания ДНК (ARF); 3) ARF-связывающие репрессорные белки (AUX/IAA); 4) корепрессорный белок TRL (Topless); 5) E3 убиквитин-лигазный комплекс; 6) ауксин [14]. Модель представляет собой описание простого выключателя транскрипции, чувствительного к локальной концентрации ауксина. Модель описывает события на уровне клетки при его низкой и высокой концентрациях. Такие мишенные гены кодируют белки, которые вовлечены в ауксин-зависимую клеточную элонгацию. В работе Эсмона с сотр. [15] идентифицировано 8 генов, которые ответственны за увеличение накопления мРНК в тех участках гипокотилия, где уровень ауксина растет параллельно амплитуде изгиба, не проявляется у мутантов, чья функция соответствует амплитуде ауксин-регулируемого роста. Результаты изучения фототропной сигнализации в растениях показали, что главным ее регулятором является фитогормон ауксин. Несмотря на простоту и конкретность физиологического ответа, поражает необычайная сложность механизма его реализации. Процесс превращения световых сигналов в адаптивные фототропные ответы включает 6 фоторецепторов (phot1, phot2, phyA, phyB, cry1, cry2); сложноорганизованный рецепторный комплекс ГС; по крайней мере 9 ауксиновых транспортеров, каждый из которых имеет собственную систему регуляции активности и внутриклеточную локализацию; 7 экстра- и интрацеллюлярных ауксиновых рецепторов; системы экспрессии генов с множественными регуляторами транскрипции; кооперативные связи с системами сигнализации действия других фитогормонов этилена, brassinosterоидов, гибберрелиновой кислоты и фитохрома. Все это свидетельствует не только о сложности сигнализации фоторопинов, но и о далеко не полном ее изучении.

Гравитропизм. Обычно корни растений растут в почве вертикально вниз, где они закоривают растение, которое получает из почвы воду и питательные вещества, необходимые для его роста и развития. Вертикально растет и центральный стебель растения. Как упоминалось ранее, растения необратимо связаны с местом своего роста, но постоянно реагируют на направленные сигналы из внешней среды, которые они используют для оптимизации жизнедеятельности – своего основного предназначения. К ним относятся газовый обмен, фотосинтез (стебли и листья) и потребление воды и питательных веществ (корни). Наряду с рассмотренными выше сигналами большое значение имеет сила земного притяжения, представляющая собой направленный сигнал Земли, благодаря которому растения реализуют механизм направленного роста, необхо-

димого для формирования экосистем [16]. Большинство органов растения реагируют на этот сигнал. Так, стебли растут вертикально вверх (негативный ортогравитропизм), а корни вертикально вниз (позитивный ортогравитропизм). Боковые органы не подчиняются этому воздействию и растут под определенным углом к стеблю. Этот угол получил название GSA (gravity set point angle). Параметры GSA заложены в геноме растения, но GSA может меняться под влиянием влаги в почве (корни растут вглубь), избытка удобрения (например, фосфора), что вызывает рост боковых корней, позволяя лучше использовать поверхностные слои почвы. Это означает, что корни хорошо адаптируются к условиям окружающей среды, что имеет большое значение для земледелия. В ходе роста растение использует комбинацию клеточного деления в апикальной меристеме и удлинение клеток в EZ (elongation zone). После реориентации под влиянием силы тяжести органы возвращаются к параметрам GSA. В основе этого эффекта лежат рецепция сигнала, сигнальные процессы (трансдукция), приводящие к биохимическим изменениям в системе и в конечном счете к изгибу стебля или корня. Следует отметить, что природа сигнальных процессов, индуцированных силой земного притяжения, в стеблях и корнях практически одинакова, поэтому остановимся на информации, касающейся прежде всего корней и в меньшей степени стеблей.

В корнях рецепция сил земного притяжения осуществляется в корневом чехлике, покрывающем область его апикальной меристемы. Разрушение чехлика разными способами приводит к исчезновению способности растения к гравитропизму корней. Клетки зоны деления чехлика обладают уникальным строением. Во-первых, они характеризуются большими размерами, во-вторых, в их цитоплазме практически нет никаких органелл и элементов цитоскелета, и, в-третьих, в них содержится большое число наполненных крахмалом амилопластов-пластид, получивших название статолитов (рис. 6). Именно им отводится главная сенсорная роль. В случае пространственной перориентации растения амиопласты группируются в нижней части клетки, запуская процесс трансдукции. Этот момент характерен также для мутантов, дефицитных по синтезу крахмала [17].

Предложены модели трансдукции гравитропического сигнала [18–21], включая модели статолитного давления, Ca^{2+} -механочувствительных каналов, фосфоинозитидную модель. По мере их появления они были подвергнуты детальной проверке, в первую очередь с использованием прямых измерений содержания Ca^{2+} , специфических ингибиторов и мутантов растений, дефицитных по предполагаемым соединениям. Модели не получили подтверждения. Правда, оказалось, что и Ca^{2+} , и инозитол-3-фосфат модулируют сигнализацию гравитропизма.

Хотя рассмотрение возможных механизмов сигнальной трансдукции гравитропизма не дало положительных ответов, один непреложный факт остался очевидным. Речь идет об асимметричном распределении ауксина в апикальном чехлике подвергнутого стимулу растения и о накоплении гормона в нижней части корней. В результате боковой градиент гормона возникает и в EZ-клетках и, как следствие, формируется кривизна корня. Известно, что ауксин синтезируется в ткани молодых побегов. Затем по сосудистой сети он транспортируется в чехольчик, где накапливается в неподвижных центральных клетках. После этого ауксин перераспределяется в латеральном направлении к периферическим тканям чехольчика, а затем к EZ-клеткам, где он подавляет элонгацию. В ходе транспорта ауксин проникает из апопласта во все клетки. При этом как слабая кислота (IAA) он не может пассивно проникать в клетки через плазматические мембраны, для этого имеются специальные транспортеры [22]. По своей природе транспортеры относятся к белкам семейства PIN (PIN1, PIN3, PIN4 и PIN7) и Р-гликопротеинам. В мембранах PIN-белки расположены таким образом, что обеспечивают направление потока ауксина к кончику корня.

В вертикальных корнях белки PIN3 и PIN7 равномерно распределены в клетках по отношению к плазматической мембране. Равномерно распределен в клетках чехольчика и ауксин. Однако после гравитропного стимула белки быстро меняют свою локализацию, собираясь в нижней части статолитов, куда транспортируется и ауксин. Установлено, что реориентация фитогормона контролируется малыми GTF-азами, связанными с факторами GDP/GTP-обмена. Эти данные были получены с помощью мутантов. Генетические подходы позволили однозначно идентифицировать

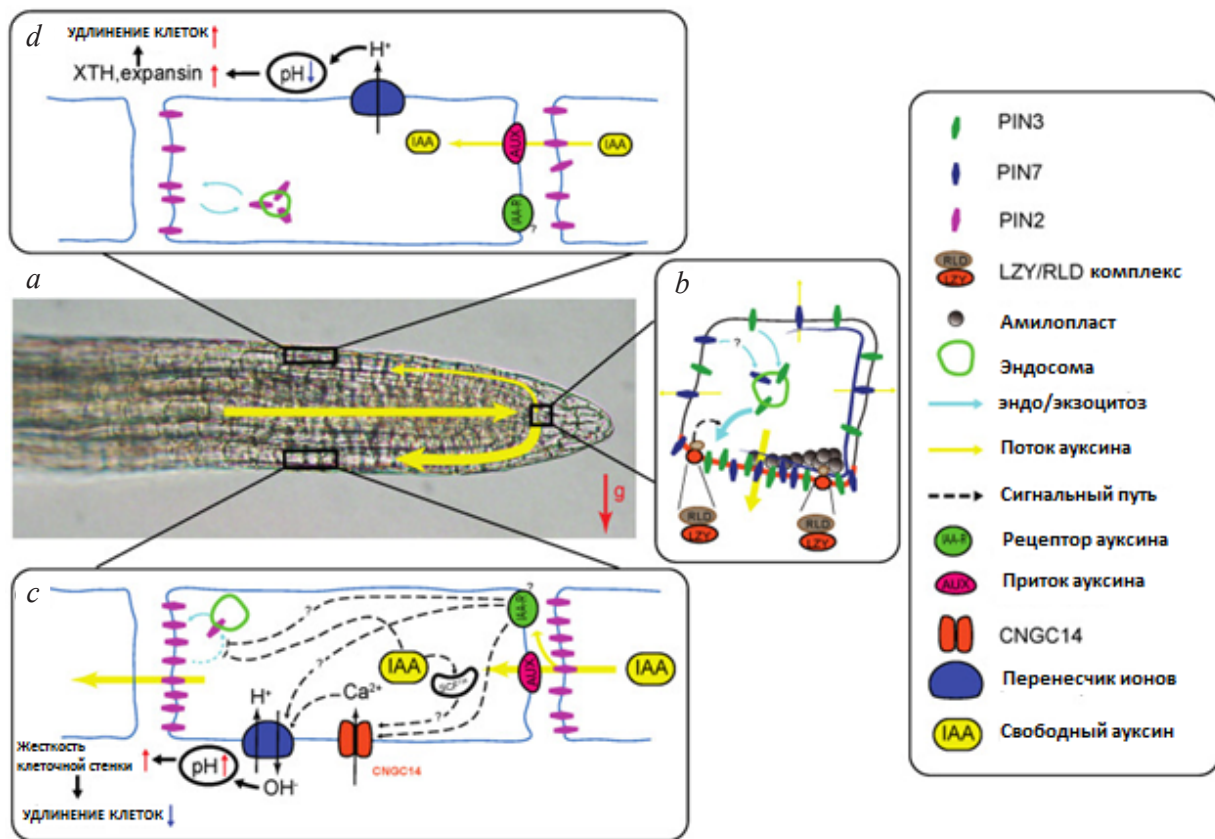


Рис. 6. Строение корневого чехлика: *a* – схема строения (желтыми стрелками показаны потоки ауксина, красной – направление гравитимула); *b* – при гравитимуляции амилопласты осаждаются в клетках корневого чехлика и запускают процесс трансдукции с участием различных белков и плазматической мембраны; *c* – ауксин взаимодействует с эпидермальными клетками EZ корневого чехлика и запускает трансдукцию в последовательности событий: LZ-белки – плазматическая мембрана – RLD-регуляторы – PIN3-белки – транспорт ауксина вниз – боковой градиент ауксина в клетках корневого чехлика; *d* – в верхней части корня при низкой концентрации ауксина активируется H-насос, апопласт подкисляется, активируются ферменты, ответственные за элонгацию – удлинение клеток [23]

Fig. 6. Cap structure: *a* – the scheme of cap (yellow arrows show the auxin flows and red one shows direction of gravistimulus); *b* – under gravistimulation amyloplasts are settled in cap cells. The transduction process is run; *c* – auxin interacts with endodermal cells of cap. Transduction is going in sequence LZ-proteins – plasma membrane – RLD regulators – PIN 3 proteins – transport of auxin downward – side auxin gradient in cap cells; *d* – in upper part of root H-pump is activated, apoplast is acidified, the enzymes responsible for cell elongation are activated, the cells are elongated [23]

молекулярные механизмы гравитропной чувствительности и начальной фазы трансдукции в статолитах корней. Стратегия генетических подходов включала в себя получение не только мутантов, дефицитных по синтезу рассматриваемых участников сигнальной трансдукции в статолитах, но и мутантов, характеризующихся сверхэкспрессией факторов [24, 25]. В последнее время внимание ученых привлекла модель гравитропизма, в основе которой лежит взаимодействие амилопластов с лигандами. Последние, как предполагается, комплексируют со статолитами и запускают трансдукцию. Однако данная модель не получила доказательств [25]. А вот другие факторы, такие как аденозинкиназа 1 и белки семейства LYZ, оказались активными модуляторами. Вначале была установлена ранее неизвестная функция LYZ-белков. Они относятся к регуляторам конденсации хромосом в клетке [26]. LYZ-белки в ответ на гравитимул ассоциируются с плазматической мембраной, а затем группируются в нижней части корневого чехлика и обеспечивают полярный транспорт ауксина с помощью RLD-регуляторов. LD-белки содержат домены из 300–500 аминокислотных остатков (RLD domain), они катализируют обмен гуаниновых нуклеотидов на белке Rab8a, который контролирует взаимодействие аппарата Гольджи с плазматической мембраной [27]. Любопытно, что у мутантов LYZ сохраняется фототропизм, так как

белки PIN являются в обоих случаях критическими факторами. Другим интересным наблюдением является зависимость процесса от фитохрома, если гравитропизм происходит на свету.

Заключение. Описанные выше механизмы объясняют формирование бокового градиента ауксина в корневом чехлике. Однако важным представляется дифференциальное удлинение клеток на верхней и нижней сторонах дистальной части зоны элонгации.

Транспорт ауксина в периферических тканях корневого чехлика, эпидермиса и коры имеет место или за счет диффузии, или с помощью транспортера AUX1/LAX I и PIN2 под контролем фосфорилирования и дефосфорилирования. Как и все PIN-белки, PIN2 постоянно циркулирует между плазматической мембраной и эндосомом. Находясь в мембране, PIN2 увеличивает доступность ауксина. Благодаря этому ауксин накапливается в нижней части кончика корня, формируется его градиент и активируется продукция малых сигнальных пептидов GOLVEN на нижней части чехольчика. Другие фитогормоны, брассиностероиды и гиббереллиновая кислота выступают антагонистами эндоцитоза PIN, т. е. в растении имеет место кросс-ток между активными факторами, причастными к гравитропизму [28].

Какие же события происходят дальше? Очень быстро, примерно через 19–15 мин после стимула, отмечается изгиб корня. Увеличение содержания ауксина на нижнем уровне чехольчика активирует CNGC14 (cyclic nucleotide-gated C14) каналы, через которые ион входит в цитоплазму и активирует H⁺/OH⁻ обменник. В результате апопласт защелачивается, клеточная стенка становится более ригидной и элонгация замедляется. Другой модулятор, окись азота, накапливается в нижней части корневого чехлика и подавляет транспорт ауксина, а активные формы кислорода, наоборот, его активируют. В верхней части корневого чехлика на фоне низкой концентрации ауксина при стимуляции клеточная стенка подкисляется, состав ее компонентов меняется, межмолекулярные связи между полимерами в стенке с помощью ферментов рвутся, что благоприятствует элонгации. Следует при этом отметить, что после гравистимулирования содержание лигнина и полисахаридных полимеров в клеточной стенке меняется. Однако эти изменения обратимы, состав полимеров в клеточной стенке после появления изгиба возвращается к исходному значению [29]. Как только орган растения возвращается в вертикальное положение, процесс завершается, сместившиеся в клетке при гравистимуляции статолиты [30] восстанавливают свою прежнюю локализацию, исчезает и полярность PIN3 и PIN7 белков. Конечной точкой процесса является не исчезновение градиента ауксина, а вертикальное положение кончика.

В заключение следует еще раз перечислить перечень событий – от первичного стимула до появления изгиба корня растения. Генетические исследования гравитропизма корней идентифицировали ряд локусов в геноме растения, которые вносят свой вклад в реализацию эффекта, обеспечивая тем самым оседание амиопластов и связывание PIN-белков в нижней части статолитов. Связанные с мембранами LYZ-белки подключают к трансдукции RLD-регуляторы, которые облегчают PIN3-зависимый выброс ауксина из клеток. В результате в корневом чехлике возникает градиент ауксина и отмечается образование изгиба за счет удлинения клеток в LZ-зоне. Подводя итог рассмотрению трех разных по смысловой нагрузке ответных реакций высших растений – фитохромной регуляции, фототропизмов и гравитропизма, – следует обратить внимание на следующее обстоятельство. В сигнальной трансдукции трех разных процессов на ее промежуточных стадиях регуляторную роль выполняют одни и те же медиаторы. Все это позволяет предполагать существование в растительной клетке не отдельных магистральных цепочек для каждого стимула, а регуляторной сети на основе вертикальных и горизонтальных цепей. На ее базе, видимо, и осуществляется тонкая регуляция сигнальных процессов в растительной клетке.

Список использованных источников

1. Rockwell, N. C. Phytochrome structure and signaling mechanisms / N. C. Rockwell, Y.-S. Su, J. C. Lagarias // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 837–858. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208>
2. Legris, M. Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants / M. Legris, Y. Ç. Ince, C. Fankhauser // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 5219. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13045-0>
3. Molecular mechanisms for mediating light-dependent nucleo/cytoplasmic partitioning of phytochrome photoreceptors / C. Klose [et al.] // *New Phytologist.* – 2015. – Vol. 206, N 3. – P. 965–971. <https://doi.org/10.1111/nph.13207>

4. The role of Ca²⁺ in phytochrome-controlling swelling of etiolated wheat protoplasts / M. E. Bossen [et al.] // *Planta*. – 1988. – Vol. 174, N 1. – P. 94–100. <https://doi.org/10.1007/BF00394879>
5. Соколовский, С. Г. Об участии универсальных мессенджеров в регуляции фитохромной регуляции накопления Ca²⁺ протопластами / С. Г. Соколовский, О. В. Яцевич, И. Д. Волотовский // *Физиология растений*. – 1996. – Т. 43, № 6. – С. 883–886.
6. Second messenger mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts / I. D. Volotovskii [et al.] // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 117, N 3. – P. 1023–1030. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.1023>
7. Schäfer, E. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants / E. Schäfer, C. Bowler // *EMBO Rep.* – 2002. – Vol. 3, N 11. – P. 1042–1048. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf222>
8. Chen, M. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development / M. Chen, J. Chory // *Trends Cell Biol.* – 2007. – Vol. 21, N 11. – P. 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.002>
9. Phototropism: Growing towards an understanding of plant movement / E. Liscum [et al.] // *Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26, N 1. – P. 38–55. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119727>
10. Suetsugu, N. Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome / N. Suetsugu, M. Wada // *Plant Cell Physiol.* – 2013. – Vol. 54, N 1. – P. 8–23. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs165>
11. Holland, J. J. Understanding phototropism: from Darwin to today / J. J. Holland, D. Roberts, E. Liscum // *J. Exp. Bot.* – 2009. – Vol. 60, N 7. – P. 1969–1978. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp113>
12. Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium / X. Zhao [et al.] // *Plant Physiol.* – 2013. – Vol. 162, N 3. – P. 1539–1551. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216556>
13. Christie, J. M. Shoot phototropism in higher plants: New light through old concepts / J. M. Christie, A. S. Murphy // *Am. J. Bot.* – 2013. – Vol. 100, N 1. – P. 35–46. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200340>
14. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin / L. I. Calderón-Villalobos [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 477–485 <https://doi.org/10.1038/nchembio.926>
15. A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses / C. A. Esmon [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103, N 1. – P. 236–241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507127103>
16. Su, S.-H. Gravity Signaling in Flowering Plant Roots / S.-H. Su, M. A. Keith, P. H. Masson // *Plants (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, N 10. – Art. 1290 <https://doi.org/10.3390/plants9101290>
17. Baldwin, K. L. Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots / K. L. Baldwin, A. K. Strohm, P. H. Masson // *Am. J. Bot.* – 2013. – Vol. 100, N 1. – P. 126–142. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200318>
18. New insights into root gravitropic signaling / E. M. Sato [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2015. – Vol. 66, N 8. – P. 2155–2165. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru515>
19. Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth / D. Lopez [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 610. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00610>
20. Critical consideration on the relationship between auxin transport and calcium transients in gravity perception of *Arabidopsis* seedlings / M. Toyota [et al.] // *Plant Signal Behav.* – 2008. – Vol. 3, N 8. – P. 521–524. <https://doi.org/10.4161/psb.3.8.6339>
21. Molecular mechanisms of gravity perception and signal transduction in plants / Y. S. Kolesnikov [et al.] // *Protoplasma*. – 2016. – Vol. 253, N 4. – P. 987–1004. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0859-5>
22. *Arabidopsis AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism / M. J. Bennett [et al.] // *Science*. – 1996. – Vol. 273, N 5277. – P. 948–950. <https://doi.org/10.1126/science.273.5277.948>
23. Molecular mechanisms of root gravitropism / S.-H. Su [et al.] // *Curr. Biol.* – 2017. – Vol. 27, N 17. – P. R964–R972. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.015>
24. The *ARG1-LIKE2 (ARL2)* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the *PGM* path-way / C. Guan [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 133, N 1. – P. 100–112. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023358>
25. A role for the TOC complex in *Arabidopsis* root gravitropism / J. P. Stanga [et al.] // *Plant Physiol.* – 2009. – Vol. 149, N 4. – P. 1896–1905. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135301>
26. Strohm, A. K. A functional TOC complex contributes to gravity signal transduction in *Arabidopsis* / A. K. Strohm, G. A. Barrett-Wilt, P. H. Masson // *Front. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5 – Art. 148. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00148>
27. Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control / M. Furutani [et al.] // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – Art. 76. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13729-7>
28. Brassinosteroid signaling delimits root gravitropism via sorting of the *Arabidopsis* PIN2 auxin transporter / K. Retzer [et al.] // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10. – Art. 5516. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13543-1>
29. Суховеева, С. В. Гравиметрический анализ полисахаридного состава стебля томата на фоне действия гравитационного и фитогормонального сигналов / С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, И. Д. Волотовский // *Докл. НАН Беларуси*. – 2022. – Т. 66, № 3. – С. 310–320.
30. Сравнительный анализ структурно-функциональных изменений эндодермальных клеток черешков листьев томата после гравистимуляции и действия фитогормонов / С. В. Суховеева [и др.] // *Докл. НАН Беларуси*. – 2022. – Т. 66, N 4. – С. 425–432.

References

1. Rockwell N. C., Su Y.-S., Lagarias J. C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, vol. 57, pp. 837–858. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208>
2. Legris M., Ince Y. Ç., Fankhauser C. Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nature Communications*, 2019, vol. 10, no. 1, p. 5219. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13045-0>
3. Klose C., Viczián S., Kircher E., Schäfer F., Nagy F. *Molecular mechanisms for mediating light-dependent nucleo/cytoplasmic partitioning of phytochrome photoreceptors*. *New Phytologist*, 2015, vol. 206, no. 3, pp. 965–971. <https://doi.org/10.1111/nph.13207>
4. Bossen M. E., Dassen H. H., Kendrick R. E., Vredenberg W. J. The role of Ca²⁺ in phytochrome-controlling swelling of etiolated wheat protoplasts. *Planta*, 1988, vol. 74, no. 1, pp. 94–100. <https://doi.org/10.1007/BF00394879>
5. Sokolovskii S. G., Yatsевич O. V., Volotovskii I. D. Participation of universal messengers in the regulation of phytochrome regulation of Ca²⁺ accumulation by protoplasts. *Fiziologiya rastenii = Russian Journal of Plant Physiology*, 1996, vol. 43, no. 6, pp. 883–886 (in Russian).
6. Volotovskii I. D., Sokolovsky S. G., Molchan O. V., Knight M. R. Second messenger mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiology*, 1998, vol. 117, no. 3, pp. 1023–1030. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.1023>
7. Schäfer E., Bowler C. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Reports*, 2002, vol. 3, no. 11, pp. 1042–1048. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf222>
8. Chen M., Chory J. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology*, 2007, vol. 21, no. 11, pp. 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.002>
9. Liscum E., Askinosie S. K., Leuchtman D. L., Morrow J., Willenburg K. T., Coats D. R. Phototropism: Growing towards an understanding of plant movement. *Plant Cell*, 2014, vol. 26, no. 1, pp. 38–55. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119727>
10. Suetsugu N., Wada M. Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant and Cell Physiology*, 2013, vol. 54, no. 1, pp. 8–23. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs165>
11. Holland J. J., Roberts D., Liscum E. Understanding phototropism: From Darwin to today. *Journal of Experimental Botany*, 2009, vol. 60, no. 7, pp. 1969–1978. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp113>
12. Zhao X., Wang Y.-L., Qiao X.-R., Wang J., Wang L.-D., Xu C.-S., Zhang X. Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium. *Plant Physiology*, 2013, vol. 162, no. 3, pp. 1539–1551. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216556>
13. Christie J. M., Murphy A. S. Shoot phototropism in higher plants: New light through old concepts. *American Journal of Botany*, 2013, vol. 100, no. 1, pp. 35–46. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200340>
14. Calderón-Villalobos L. I., Lee S., De Oliveira C., Ivetaç A., Brandt W., Armitage L. [et al.]. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology*, 2012, vol. 8, no. 5, pp. 477–485. <https://doi.org/10.1038/nchembio.926>
15. Esmon C. A., Tinsley A. G., Ljung K., Sandberg G., Hearne L. B., Liscum E. A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, vol. 103, no. 1, pp. 236–241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507127103>
16. Su S.-H., Keith M. A., Masson P. H. Gravity signaling in flowering plant roots. *Plants (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 10, art. 1290. <https://doi.org/10.3390/plants9101290>
17. Baldwin K. L., Strohm A. K., Masson P. H. Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *American Journal of Botany*, 2013, vol. 100, no. 1, pp. 126–142. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200318>
18. Sato E. M., Hijazi H., Bennett M. J., Vissenberg K., Swarup R. New insights into root gravitropic signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2015, vol. 66, no. 8, pp. 2155–2165. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru515>
19. Lopez D., Tocquard K., Venisse J.-S., Legué V., Roedel-Drevet P. Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth. *Frontiers in Plant Science*, 2014, vol. 5, art. 610. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00610>
20. Toyota M., Furuichi T., Tatsumi H., Sokabe M. Critical consideration on the relationship between auxin transport and calcium transients in gravity perception of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signaling and Behavior*, vol. 3, no. 8, pp. 521–524. <https://doi.org/10.4161/psb.3.8.6339>
21. Kolesnikov Y. S., Kretynin S. V., Volotovskii I. D., Kordyum E. L., Ruelland E., Kravets V. S. Molecular mechanisms of gravity perception and signal transduction in plants. *Protoplasma*, 2016, vol. 253, no. 4, pp. 987–1004. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0859-5>
22. Bennett M. J., Marchant A., Green H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P. A., Walker A. R., Schulz B., Feldmann K. A. *Arabidopsis AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 1996, vol. 273, no. 5277, pp. 948–950. <https://doi.org/10.1126/science.273.5277.948>
23. Su S.-H., Gibbs N. M., Jancewicz A. L., Masson P. H. Molecular mechanisms of root gravitropism. *Current Biology*, 2017, vol. 27, no. 17, pp. R964–R972. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.015>
24. Guan C., Rosen E. S., Boonsirichai K., Poff K. L., Masson P. H. The *ARG1-LIKE2 (ARL2)* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the *PGM* path-way. *Plant Physiology*, 2003, vol. 133, no. 1, pp. 100–112. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023358>
25. Stanga J. P., Boonsirichai K., Sedbrook J. C., Otegui M. S., Masson P. H. A role for the TOC complex in *Arabidopsis* root gravitropism. *Plant Physiology*, 2009, vol. 149, no. 4, pp. 1896–1905. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135301>
26. Strohm A. K., Barrett-Wilt G. A., Masson P. H. A functional TOC complex contributes to gravity signal transduction in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2014, vol. 5, art. 148. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00148>

27. Furutani M., Hirano Y., Nishimura T., Nakamura M., Taniguchi M., Suzuki K. [et al.]. Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control. *Nature Communications*, 2020, vol. 11, art. 76. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13729-7>

28. Retzer K., Akhmanova M., Konstantinova N., Malínská K., Leitner J., Petrášek J., Luschnig C. Brassinosteroid signaling delimits root gravitropism via sorting of the *Arabidopsis* PIN2 auxin transporter. *Nature Communications*, 2019, vol. 10, art. 5516. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13543-1>

29. Sukhoveeva S. V., Kabachevskaya E. M., Volotovskii I. D. Gravimetric analysis of tomato stems in the perception of a gravitational signals. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 3, pp. 310–320 (in Russian).

30. Sukhoveeva S. V., Kabachevskaya E. M., Kuznetsova T. E., Volotovskii I. D. Comparative analysis of the structure-function changes in the endodermal cells of tomato leaf petioles after gravity stimulation and phytohormone action. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 4, pp. 425–432 (in Russian).

Информация об авторах

Игорь Дмитриевич Волотовский – 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

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

Елена Михайловна Кабачевская – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lbmc@ibp.ogr.by

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

Sviatlana V. Sukhoveeva – 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: suhoveevalmbc@mail.ru

Elena M. Kabachevskaya – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lbmc@ibp.ogr.by