

# ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2024. Т. 69, № 1

# ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2024. Т. 69, № 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

- А. В. Кильчевский** (*заместитель главного редактора*) – Президиум Национальной академии наук  
Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- М. Е. Никифоров** (*заместитель главного редактора*) – Научно-практический центр Национальной  
академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь
- В. Г. Колосовская** (*ведущий редактор журнала*)
- З. М. Алещенкова** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Рес-  
публика Беларусь
- И. Д. Вологовский** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Бе-  
ларуси, Минск, Республика Беларусь
- А. Е. Гончаров** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь

- В. В. Демидчик** – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь  
**Н. И. Дубовец** – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь  
**Л. Ф. Кабашникова** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь  
**Э. И. Коломиец** – Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Республика Беларусь  
**Н. А. Ламаи** – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь  
**В. Е. Падутов** – Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь  
**В. Н. Прохоров** – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, 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

#### Редакционный совет

- В. Ф. Багинский** – Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь  
**А. Баршевский** – Даугавпилский университет, Даугавпилс, Латвийская Республика  
**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. 2024. Т. 69, № 1.

*Выходит на русском, белорусском и английском языках*

---

Редактор *В. Г. Колосовская*

Компьютерная верстка *Н. И. Кащуба*

Подписано в печать 09.01.2024. Выход в свет 29.01.2024. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 70 экз. Заказ 7.

Цена номера: индивидуальная подписка – 13,34 руб., ведомственная подписка – 31,28 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, 2024

# PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

---

BIOLOGICAL SERIES. 2024, vol. 69, 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 Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus

## Editorial Board

**Alexander V. Kilchevsky** (*Associate Editor-in-Chief*) – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

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

**Valentina G. Kolosovskaya** (*Leading Editor*)

**Zinaida M. Aleshchenkova** – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**Vadim V. Demidchik** – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Dubovets Nadezhda I.** – Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**Andrei E. Hancharou** – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**Lyudmila F. Kabashnikova** – 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

**Emiliya I. Kolomiets** – State Research and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology, 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  
**Vladimir E. Padutov** – Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus  
**Valery N. Prokhorov** – Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus  
**Vladimir N. Reshetnikov** – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus  
**Vladimir V. Titok** – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus  
**Vladimir I. Torchyk** – 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  
**Yuri Yu. Dgebuadze** – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation  
**Vasiliy E. Gayduk** – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus  
**Nikolay A. Kolchanov** – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation  
**Vladimir V. Kuznetsov** – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation  
**Wanda Olech-Piasecka** – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Republic of Poland  
**Oleg N. Pugachev** – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation  
**Alexander I. Rapoport** – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvian Republic  
**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, 2024, vol. 69, no. 1.

*Printed in Russian, Belarusian and English languages*

---

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

Sent for press 09.01.2024. Output 29.01.2024. Format 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Offset paper.  
Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 70 copies. Order 7.  
Number price: individual subscription – 13.34 byn., departmental subscription – 31.28 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, 2024

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

### **ЗМЕСТ**

<b>Баранов О. Ю., Рассадина В. В., Анисова Ж. М.</b> Современные тренды и инновационные направления развития биологической науки в Беларуси (к 95-летию со дня основания Национальной академии наук Беларуси)....	7
<b>Байлюк Н. В., Ламан Н. А., Калацкая Ж. Н.</b> Физиолого-биохимические особенности реализации адаптивного потенциала клонально микроразмноженных растений картофеля при их обработке иммуностимуляторами.....	15
<b>Байчоров В. М., Мороз М. Д., Гигиняк Ю. Г., Гигиняк И. Ю., Куликова Е. А., Корзун Е. В.</b> Фауна водных беспозвоночных родниковых экосистем Минской области.....	25
<b>Кузмицкая П. В., Королева Е. С., Урбанович О. Ю.</b> Влияние дефицита влаги на экспрессию генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки яблони.....	36
<b>Корзун Е. В., Куликова Е. А.</b> Динамика численности личинок земноводных и определяющие ее факторы в условиях искусственного водоема в центральной части Беларуси.....	47
<b>Фомина Е. А., Заинчковская А. Н., Кузмицкая П. В., Урбанович О. Ю., Пашкевич П. А., Сидор Л. С., Анощенко Б. Ю., Гончарова Л. В.</b> Генетическое разнообразие деревьев яблони старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси.....	57
<b>Рубаник Л. В., Полещук Н. Н.</b> Анализ проблемы молекулярной идентификации дикого (wtCT), бесплазмидного (p-CT) и шведского (SE-nvCT) вариантов <i>Chlamydia trachomatis</i> в Беларуси.....	68
<b>Коваленко Н. А., Супиченко Г. Н., Ахрамович Т. И., Нечай Ю. А., Леонтьев В. Н.</b> Антимикробная активность эфирных масел и экстрактов <i>Thuja occidentalis</i> .....	79

## CONTENTS

<b>Baranov O. Yu., Rassadina V. V., Anisova Zh. M.</b> Modern trends and innovative development areas of biological science in Belarus (To the 95th anniversary of the foundation of the National Academy of Sciences of Belarus).....	7
<b>Baliuk N. V., Laman N. A., Kalatskaja J. N.</b> Physiological and biochemical features of implementation of the adaptive potential of clonally micropropagated potato plants using immunostimulants.....	15
<b>Baitchorov V. M., Moroz M. D., Hihiniak Yu. G., Giginyak I. Y., Kulikova A. A., Korzun Ja. V.</b> Fauna of aquatic invertebrates of the spring ecosystems in the Minsk region .....	25
<b>Kuzmitskaya P. V., Karaleva K. S., Urbanovich O. Yu.</b> Effect of moisture deficiency on the apple stress-associated protein expression level .....	36
<b>Korzun Ja. V., Kulikova A. A.</b> Dynamics of change in the number of amphibian larvae in pond conditions and factors determining it in the central part of Belarus.....	47
<b>Famina A. A., Zainchkovskaya A. N., Kuzmitskaya P. V., Urbanovich O. Yu., Pashkevich P. A., Sidor L. S., Anoshenko B. Yu., Goncharova L. V.</b> Genetic diversity of apple trees in the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus .....	57
<b>Rubanik L. V., Poleshchuk N. N.</b> Analysis of the problem of molecular identification of wild (wtCT), plasmidless (p-CT) and Swedish (SE-nvCT) variants of <i>Chlamydia trachomatis</i> in Belarus.....	68
<b>Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Ahramovich T. I., Niachai Yu. A., Leontiev V. N.</b> Antimicrobial activity of <i>Thuja occidentalis</i> essential oils and extracts .....	79

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 574:577  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-7-14>

Поступила в редакцию 14.11.2023  
Received 14.11.2023

**О. Ю. Баранов, В. В. Рассадина, Ж. М. Анисова**

*Отделение биологических наук НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

**СОВРЕМЕННЫЕ ТRENДЫ И ИННОВАЦИОННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ  
РАЗВИТИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НАУКИ В БЕЛАРУСИ  
(К 95-ЛЕТИЮ СО ДНЯ ОСНОВАНИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ)**

**Аннотация.** Проведен анализ научных публикаций и информационных материалов основных направлений деятельности научных школ Отделения биологических наук НАН Беларуси. Показаны принципы, структура и система проектирования фундаментальных и прикладных исследований в области биологии. Обсуждаются полученные результаты, их внедрение и значение для различных отраслей экономики. Определены перспективные направления инновационного развития биологической науки на основе междисциплинарного взаимодействия.

**Ключевые слова:** биологическая наука, результаты исследования, достижения, перспективы

**Для цитирования:** Баранов, О. Ю. Современные тренды и инновационные направления развития биологической науки в Беларуси (к 95-летию со дня основания Национальной академии наук Беларуси) / О. Ю. Баранов, В. В. Рассадина, Ж. М. Анисова // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 7–14. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-7-14>

**Oleg Yu. Baranov, Valentina V. Rassadina, Zhanna M. Anisova**

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

**MODERN TRENDS AND INNOVATIVE DEVELOPMENT AREAS OF BIOLOGICAL SCIENCE IN BELARUS  
(TO THE 95TH ANNIVERSARY OF THE FOUNDATION  
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS)**

**Abstract.** An analysis of scientific publications and information materials on the main areas of academic biological scientific school activity is presented (for the National Academy of Sciences of Belarus). The principles, structure and system of fundamental and applied research design in the field of biology is shown. The obtained results, their implementation and significance for various economy sectors are discussed. Promising areas for innovative development of biological science based on interdisciplinary interaction have been identified.

**Keywords:** biological science, research results, achievements, prospects

**For citation:** Baranov O. Yu., Rassadina V. V., Anisova Zh. M. Modern trends and innovative development areas of biological science in Belarus (To the 95th anniversary of the foundation of the National Academy of Sciences of Belarus). *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 7–14 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-7-14>

Современное состояние биологической науки в Республике Беларусь характеризуется объединением усилий представителей различных направлений – от классического естествознания и общей биологии до компьютерных технологий и инженерной науки, а также активным использованием в исследовательском процессе передовых подходов молекулярной биологии, генетики, биофизики, биоинформатики и компьютерного дизайна. К настоящему времени получены важные фундаментальные результаты в области биохимии, биофизики, генетики и цитологии, физиологии и экологии растений и животных, которые вносят существенный вклад в понимание механизмов функционирования биологических систем животного, растительного и микробного происхождения на молекулярном, клеточном, организменном и экосистемном уровнях.

Биологические системы представляют собой совокупность функционально связанных элементов живой материи, объединенных в единую структурную целостность для реализации определяющих ее свойств и процессов. К биологическим системам относятся сложные струк-

турные объекты разного уровня организации живой материи: биологические макромолекулы, субклеточные органеллы, клетки, органы, организмы, популяции, что, с одной стороны, обуславливает специфичность их свойств и функций, а с другой – определяет необходимость выбора оптимальных принципов и подходов к их изучению и управлению. Стратегия комплексной оценки живых систем является основой для формирования актуальных трендов деятельности отечественных научных школ и определяет дальнейшие перспективы развития биологической науки в Беларуси.

Среди биоорганических макромолекул, рассматриваемых в качестве основы функционирования различных типов биологических систем, особая роль отводится нуклеиновым кислотам как базовому компоненту хранения наследственной информации живых организмов. Изучению структурно-функциональной организации наследственного аппарата различных живых организмов посвящены исследования специалистов отечественных научных школ, возглавляемых в настоящее время академиками Л. В. Хотылевой, А. В. Кильчевским, В. Н. Решетниковым, Э. И. Коломиец, членом-корреспондентом В. Е. Падутовым, а также отдельных коллективов ученых. За последнее время расшифровано значительное количество геномов различных штаммов патогенных и сапрофитных бактерий [1–3], вирусов [4, 5], хлоропластов растений [6, 7], митохондрий грибов [8], растений [9] и животных [10]. На основании полученных данных не только определен полный состав ряда структурных и регуляторных генов, но и разработаны наборы ДНК-маркеров с целью диагностики, решения вопросов систематики и таксономии, селекции, геногеографии, сохранения генетических ресурсов. Для выяснения генетических аспектов организации биологических систем на более высоком уровне выполнен анализ структуры и динамики транскриптома [11], протеома [12], метаболома [13] и фенома [14] ряда живых объектов.

Функциональный подход к анализу геномных данных реализуется путем использования экзомных технологий, что находит практическое применение при диагностике наследственных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных [15, 16].

К актуальным методам изучения нуклеиновых макромолекул следует отнести методы отбора на молекулярном [17], хромосомном [18], клеточном [19], организменном [20], популяционном и видовом уровнях [21], методы направленного мутагенеза (включая генетическое редактирование) [22] и генетической трансформации [23]. Отдельным направлением целевого моделирования субклеточных (надмолекулярных) структур являются работы научных школ под руководством академика А. Г. Лобанка и доктора наук В. Г. Вересова в области энзимологии и молекулярного докинга по созданию молекулярно-диагностических, биотехнологических и лечебных препаратов нового поколения [24]. Важными направлениями исследований являются моделирование и синтез искусственных структур наноразмерного уровня, используемых для катализа и регуляции ряда метаболических процессов [25], а также в качестве носителей различных биологически активных агентов и соединений [26].

В настоящее время в Отделении биологических наук изучение надмолекулярных биологических структур связано главным образом с исследованием физиологических процессов, протекающих в мембранных комплексах, хлоропластах и митохондриях клеток. Научными коллективами под руководством членов-корреспондентов Е. И. Слобожаниной и Л. Ф. Кабашниковой проведена оценка состояния и выявлены особенности строения и функционирования клеточных органелл растительного и животного происхождения в условиях стресса и при различных типах патологий [27, 28].

Созданию основ клеточных технологий посвящены работы научных школ, возглавляемых академиками И. Д. Волотовским (человек, животные, растения), Э. И. Коломиец (бактерии и грибы), В. Н. Решетниковым (растения). Это позволило не только разработать концепции организации и функционирования клеточных систем разного типа, но и заложить основы новых направлений в отечественной биотехнологии. Созданы обширные коллекции и банки культур клеток различных биологических объектов, которые являются исходной базой для реализации селекционных и биотехнологических мероприятий, направленных на получение цитологических систем и биопродуктов с заданными свойствами. Области внедрения клеточных технологий – различные отрасли медицины [29], сельского хозяйства [30] и пищевой промышленности [31], декора-

тивное садоводство [32], обеспечение биологической безопасности и охрана окружающей среды [33]. Особую значимость приобретают работы, связанные с использованием *in vitro* культур тканей растений для массового производства клонированного посадочного материала различных видов сельскохозяйственных, декоративных и лесных культур [34].

Особенность организменного уровня – появление способности биологических систем к автономному существованию и самовоспроизводству. У многоклеточных организмов анализ биологических систем данного уровня ассоциирован с изучением индивидуальной изменчивости и ее фенотипического проявления. При этом важным вопросом является как оценка тех или иных признаков и свойств у индивида, так и норма его реакции. Индивидуальная изменчивость живых организмов является одним из базисных элементов селекции и служит основным источником получения хозяйственно ценных признаков. На основе индивидуального отбора белорусскими селекционерами создано большое количество отечественных сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов [35–37]. Ключевая роль в их создании принадлежит белорусской школе генетиков, осуществлявших научное сопровождение селекционного процесса.

Исследование особенностей нормы реакции живых организмов позволило установить механизмы адаптации биологических систем к условиям окружающей среды, а также выявить функциональные нарушения при различных типах абиотического и биотического стресса [38, 39]. Работы в данной области проведены научными коллективами, возглавляемыми академиками Л. В. Хотылевой, А. В. Кильчевским, В. Н. Решетниковым, Н. А. Ламаном, М. Е. Никифоровым, В. В. Усней, членами-корреспондентами В. В. Демидчиком, В. Е. Падутовым, Ж. А. Рупасовой, В. В. Титком, В. И. Торчиком, докторами наук З. М. Алещенковой, А. П. Ермишиным.

Популяционные исследования различных видов живых организмов представлены в научных работах отечественных школ ученых (зоологической, ботанической, генетической и лесоводственной) под руководством академиков А. В. Кильчевского, Л. В. Хотылевой, М. Е. Никифорова, Н. А. Ламана, В. Н. Решетникова, В. И. Парфенова, В. В. Усени, членов-корреспондентов Н. И. Дубовец, В. Е. Падутова, В. Н. Прохорова, В. П. Семенченко, докторов наук И. Б. Моссэ, Е. И. Бычковой, В. М. Байчорова. Полученные результаты позволили не только охарактеризовать пространственную структуру популяций, динамику численности, определить направленность протекающих внутривидовых процессов, но и разработать методологические подходы к управлению их биологическими ресурсами. Особую значимость популяционные исследования приобрели в последнее время для оценки состояния и охраны генофондов редких и исчезающих видов флоры и фауны [40], мониторинга чужеродных инвазивных организмов [41, 42], очагов вредителей и болезней [43], рационального использования и улучшения наследственного потенциала сортов растений и пород животных [44–46], совершенствования селекционно-семеноводческой базы лесообразующих видов [47].

Изучение биоценозов как одних из наивысших уровней организации биологических систем имеет ключевое значение для сохранения природы и поддержания экологического равновесия. Понимание взаимосвязей и зависимостей между организмами позволяет разрабатывать эффективные стратегии по охране и управлению экосистемами. Исследования в области экологии живых организмов – одно из классических направлений отечественной биологической школы. В последнее время при изучении экологических систем активно применяются методологические подходы других научных дисциплин. Так, например, использование методов метагеномного анализа позволяет одновременно анализировать всю совокупность генетического материала в различных объектах окружающей среды [48]. Дополнение данных методов транскриптомными, протеомными и метаболомными технологиями дает возможность оценивать функциональность изучаемых биологических систем. Применение на практике экосистемных подходов позволяет решать вопросы, связанные с повышением биологической продуктивности и устойчивости агро- и лесных ценозов, посредством разработки биопрепаратов нового поколения для защиты от вредных организмов, использования экологоориентированных методов регуляции их численности, повышения качества среды обитания и др.

Таким образом, анализ текущих направлений деятельности в области биологии показывает, что они охватывают широкий круг актуальных задач по комплексной оценке структуры и функ-

ционирования различных типов биологических систем. В настоящее время развитие методологии биологической науки направлено на дальнейшее увеличение роли междисциплинарного взаимодействия, обеспечивающего более высокий уровень интеграции фундаментальных знаний и новаций, совершенствование системного подхода к анализу объектов живой природы. Даже несмотря на значительный прогресс, достигнутый в таких областях, как молекулярная биология, геномика, биоинформатика, аддитивные клеточные и нанотехнологии, эффективность их реализации и дальнейшего развития может быть достигнута только путем полной интеграции в общебиологическую систему науки.

### Список использованных источников

1. Шмыга, Е. Ю. Физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий – основы препарата микробного «Биопродуктин» / Е. Ю. Шмыга, А. А. Муратова, Э. И. Коломиец // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 213–223.
2. Muratova, A. A. Genome analysis of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 – an antagonist of crop pathogens / A. A. Muratova, A. E. Akhremchuk, L. N. Valentovich // *Biotechnologia Acta*. – 2021. – Vol. 14, N 2. – P. 47–58. <https://doi.org/10.15407/biotech14.02.047>
3. Молекулярно-генетический и функциональный анализ генома бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-439Д / А. В. Бережная [и др.] // Приклад. биохим. и микробиол. – 2019. – Т. 55, № 4. – С. 366–377.
4. The bacteriophage Pf-10 – A component of the biopesticide “Multiphage” used to control agricultural crop diseases caused by *Pseudomonas syringae* / О. А. Kazantseva [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, N 1. – Art. 42. <https://doi.org/10.3390/v14010042>
5. Генетическое разнообразие вируса SARS-CoV-2, циркулирующего на территории Республики Беларусь / Е. Л. Гасич [и др.] // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2021. COVID-19: эпидемиология, диагностика, профилактика: сб. тез. онлайн-конгресса с междунар. участием, Москва, 28–29 апр. 2021 г. / ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; под ред. академика РАН В. Г. Акимкина. – М., 2021. – С. 71–72.
6. Экспрессия хлоропластного генома: современные представления и экспериментальные пути изучения / М. Г. Синявская [и др.] // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 5. – С. 511–528.
7. Structure and phylogeny of the curly birch chloroplast genome / К. А. Shestibratov [et al.] // *Front. Genet.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 625764. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.625764>
8. Структурно-функциональная организация митохондриального генома фитопатогенного гриба *Phoma* sp.1 / С. В. Пантелеев [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 4. – С. 359–373.
9. Высокопроизводительное секвенирование цитоплазматических геномов граба обыкновенного *Carpinus betulus* L. (Betulaceae) / Д. И. Каган [и др.] // Клеточная биология и биотехнология растений: II междунар. науч.-практ. конф., Минск, 28–31 мая 2018 г.: тез. докл. / Белорус. гос. ун-т, Ин-т леса НАН Беларуси; редкол.: И. И. Смолич (отв. ред.), В. В. Демидчик, В. Е. Падутов. – Минск, 2018. – С. 24–25.
10. Пантелеев, С. В. Изучение структурных особенностей COI-гаплотипов вершинного короода (*Ips acuminatus* Gyll.) на юге Беларуси / С. В. Пантелеев, Л. В. Можаровская, О. Ю. Баранов // Лесное хозяйство: материалы докл. 84-й науч.-техн. конф., посвящ. 90-летию юбилею БГТУ и Дню белорусской науки (с междунар. участием), Минск, 3–14 февраля 2020 г. / Белорус. гос. технолог. ун-т; отв. за вып. И. В. Войтов. – Минск, 2020. – С. 75–78.
11. Можаровская, Л. В. Сравнительный анализ экспрессионной активности генов проростков сосны обыкновенной в условиях холодового стресса / Л. В. Можаровская // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2021. – Т. 30. – С. 95–104.
12. Скрининг ферментативной активности микромицетов Восточной Антарктиды / Е. Д. Василевская [и др.] // Современные проблемы экспериментальной ботаники: сб. материалов III междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск–Нарочь, 25–29 сентября 2023 г. / Ин-т эксперим. ботаники [и др.]. – Минск, 2023. – С. 156–158.
13. Чижик, О. В. Биологически активные соединения плодов и листьев *Vaccinium corymbosum* L. / О. В. Чижик, А. М. Деева, В. Н. Решетников // Бюл. Глав. бот. сада. – 2020. – № 4. – С. 45–51.
14. Ковалевич, А. И. Программно-технологический комплекс компьютерной биометрии семенного и посадочного материала лесных древесных видов / А. И. Ковалевич, А. П. Кончиц, А. И. Сидор // Тр. БГТУ. № 1. Лес. хоз-во. – 2013. – № 1. – С. 23–25.
15. Генетические факторы риска развития метаболического синдрома / М. Д. Амелянович [и др.] // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2013. – Т. 16. – С. 24–31.
16. Альфа-маннозидоз – генетический дефект в белорусской популяции абердин-ангусского крупного рогатого скота / Е. Л. Романишко [и др.] // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2023. – Т. 34. – С. 41–48.
17. Zinchenko, A. I. Construction of plasmid enriched with immunostimulatory CpG motifs / A. I. Zinchenko, S. V. Kvach, A. S. Shchokolova // *East. Eur. Sci. J.* – 2014. – N 3. – P. 10–13.
18. Создание и характеристика линии мягкой пшеницы с центрической транслокацией T2DL.2RL / Ю. Н. Иванова [и др.] // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2019. – Т. 23, № 7. – С. 846–855.
19. Новые биомедицинские клеточные продукты для иммунотерапии заболеваний человека / Н. Г. Антонец [и др.] // Наука и инновации. – 2022. – № 2 (228). – С. 15–23.

20. Изучение полиморфизма генов R2R3 Мув транскрипционных факторов культур семейства *Solanaceae* и гена Mub114 рода *Brassica* в связи с регуляцией биосинтеза антоцианов / О. Г. Бабак [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 4. – С. 414–424.
21. Лесообразующие виды / А. И. Ковалевич [и др.] // Генетические основы селекции растений: в 4 т. / НАН Беларуси, Ин-т генетики и цитологии; науч. ред.: А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – 2-е изд., испр., перераб. и доп. – Минск, 2020. – Т. 2: Частная генетика растений / Н. А. Картель [и др.]. – Гл. 11. – С. 602–605.
22. Шишлова-Соколовская, А. М. Разработка CRISPR/Cas9 системы для геномного редактирования гена *NtPDS* табака (*Nicotiana tabacum*) / А. М. Шишлова-Соколовская, Е. П. Хмилевская, О. Ю. Урбанович // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2022. – Т. 33. – С. 47–57.
23. Agrobacterium-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases / E. A. Popowich [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2007. – Vol. 90, N 3. – P. 237–244. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9254-z>
24. Using PD-L1 full-length structure, enhanced induced fit docking and molecular dynamics simulations for structural insights into inhibition of PD-1/PD-L1 interaction by small-molecule ligands / V. A. Urban [et al.] // Mol. Simulation. – 2022. – Vol. 48, N 14. – P. 1269–1283. <https://doi.org/10.1080/08927022.2022.2080824>
25. Ultrasonic Formation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> reduced graphene oxide–salicylic acid nanoparticles with switchable antioxidant function / L. Mikhnavets [et al.] // ACS Biomater. Sci. Eng. – 2022. – Vol. 8, N 3. – P. 1181–1192. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c01603>
26. Prospects of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles as non-viral vectors for delivery of anticancer siRNAs siBCL-xL and siMCL-1 / V. Abashkin [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13, N 10. – Art. 1549. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101549>
27. Структурно-функциональное состояние хлоропластов в связи с формированием иммунного ответа при инфицировании проростков ярового ячменя грибным патогеном *Bipolaris sorokiniana* / Л. Ф. Кабашникова [и др.] // Ботаника. Исследования. – 2020. – № 49. – С. 275–290.
28. Морфологические основы патологии / Н. К. Ахматова [и др.]; под ред. В. П. Волкова. – Новосибирск: СибАК, 2015. – 176 с.
29. Вологовский, И. Стволовые клетки: перспективы развития клеточных технологий / И. Вологовский, Е. Лобанок, Е. Лойко // Наука и инновации. – 2011. – № 1 (95). – С. 17.
30. Коломиец, Э. И. Год науки в Республике Беларусь: достижения и перспективы развития отечественной микробиологии / Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси; под ред. Э. И. Коломиец, А. Г. Лобанка. – Минск, 2017. – Т. 9. – С. 3–8.
31. Шуляк, Т. Л. Создание низколактозных ферментированных молочных продуктов / Т. Л. Шуляк, О. И. Скокова, Н. А. Головнева // Переработка молока. – 2017. – № 10 (216). – С. 42–46.
32. Титок, В. Биотехнологический комплекс для ускоренного разведения ценных видов растений / В. Титок, В. Решетников, А. Веевник // Наука и инновации. – 2019. – № 6 (196). – С. 29–31.
33. Биологический способ очистки загрязненных вод, отводимых с рыбоводных хозяйств в водные объекты / В. Ю. Агеев [и др.] // Вопр. рыб. хоз-ва Беларуси. – 2017. – № 33. – С. 98–104.
34. Генетические основы селекции растений: в 4 т. / А. В. Кильчевский [и др.]; науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии. – Минск: Беларус. навука, 2012. – Т. 3: Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. – 489 с.
35. Банк генетических ресурсов растений / Ф. Привалов [и др.] // Наука и инновации. – 2016. – № 10 (164). – С. 24–27.
36. Шейко, И. П. Модели развития белорусского животноводства / И. П. Шейко, Р. И. Шейко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 4. – С. 504–512.
37. Коломиец, Э. И. Коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси / Э. И. Коломиец // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 48–52.
38. Smolikova, G. N. Role of chlorophylls and carotenoids in seed tolerance to abiotic stressors / G. N. Smolikova, N. A. Laman, O. V. Boriskevich // Rus. J. Plant Physiol. – 2011. – Vol. 58, N 6. – P. 965–973. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060161>
39. Кильчевский, А. В. Эколого-генетические аспекты селекции растений / А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2009. – Т. 9. – С. 14–18.
40. ДНК-штрихкодирование как инструмент экологического мониторинга и оценки видовой разнообразия редких видов растений / Н. В. Савина [и др.] // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2020. – Т. 29. – С. 25–36.
41. Семенченко, В. Чужеродные виды животных в естественных экосистемах Беларуси / В. Семенченко // Наука и инновации. – 2018. – № 7 (185). – С. 20–25.
42. Оценка распространения некоторых инвазивных видов растений на территории г. Минска / Л. С. Чумаков [и др.] // Экол. вестн. – 2014. – № 1 (27). – С. 104–112.
43. Усень, В. В. Оценка численности вершинного (*Ips acuminatus* Gyll.) и шестизубчатого (*Ips sexdentatus* Voern.) короedов в сосновых насаждениях с применением феромонных препаратов / В. В. Усень, Н. С. Блинова // Тр. БГТУ. Сер. 1, Лесное хозяйство, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов. – 2019. – № 1 (216). – С. 84–88.
44. Урбанович, О. Ю. Идентификация и генетическое разнообразие сортов сливовидных культур Беларуси / О. Ю. Урбанович, П. В. Кузмицкая, А. В. Кильчевский // Генетика. – 2017. – Т. 53, № 7. – С. 805–815.

45. Молекулярные маркеры в изучении хозяйственно-ценных признаков сельскохозяйственных культур / Н. А. Картель [и др.] // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2009. – Т. 9. – С. 19–27.
46. ДНК-скрининг рецессивных мутаций, обуславливающих развитие наследственных дефектов (BLAD-и SVM-синдромов) в популяции КРС в Беларуси / М. Е. Михайлова [и др.] // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2019. – Т. 27. – С. 90–96.
47. Сохранение и рациональное использование лесов на селекционно-генетической основе / А. Ковалевич [и др.] // Наука и инновации. – 2022. – № 4. – С. 12–17.
48. Михаленко, Е. Центр изучения микробиома: фундаментальные и прикладные исследования / Е. Михаленко, Е. Гузенко, А. Кильчевский // Наука и инновации. – 2022. – Т. 1, № 8. – С. 27–31.

## References

1. Shmyga E. Yu., Muratova A. A., Kolomiets E. I. Physiological-biochemical and molecular-genetic characteristics of bacteria – the basis of the microbial product “Bioproductin”. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 3, pp. 213–223 (in Russian).
2. Muratova A. A., Akhremchuk A. E., Valentovich L. N. Genome analysis of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 – an antagonist of crop pathogens. *Biotechnologia Acta*, 2021, vol. 14, no. 2, pp. 47–58. <https://doi.org/10.15407/biotech14.02.047>
3. Berezhnaya A. V., Evdokimova O. V., Valentovich L. N., Sverchkova N. V., Titok M. A., Kolomiets E. I. Molecular genetic and functional analysis of the genome of the bacteria *Bacillus velezensis* BIM V-439D. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology], 2019, vol. 55, no. 4, pp. 366–377 (in Russian).
4. Kazantseva O. A., Buzikov R. M., Pilipchuk T. A., Valentovich L. N., Kazantsev A. N., Kalamiyets E. I., Shadrin A. M. The bacteriophage PF-10 – A component of the biopesticide “Multiphage” used to control agricultural crop diseases caused by *Pseudomonas syringae*. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 1, art. 42. <https://doi.org/10.3390/v14010042>
5. Gasich E. L., Bulda K. Yu., Okhremchuk A. E., Valentovich L. N., Drozd A. M., Kras'ko A. G., Shmeleva N. P., Dashkevich A. M., Mikhalenko E. P., Kil'chevskii A. V. Genetic diversity of the SARS-CoV-2 virus circulating in the territory of the Republic of Belarus. *Molekulyarnaya diagnostika i biobezopasnost'-2021. COVID-19: epidemiologiya, diagnostika, profilaktika: sbornik tezisev Onlain-kongressa s mezhdunarodnym uchastiem (Moskva, 28–29 aprelya 2021 goda)* [Molecular diagnostics and biosafety-2021. COVID-19: epidemiology, diagnosis, prevention: collection of abstracts of the Online congress with international participation (Moscow, April 28–29, 2021)]. Moscow, 2021, pp. 71–72 (in Russian).
6. Sinyavskaya M. G., Danilenko N. G., Lukhanina N. V., Shimkevich A. M., Davydenko O. G. Expression of the chloroplast genome: modern concepts and experimental ways of studying. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov journal of genetics and selection], 2015, vol. 19, no. 5, pp. 511–528 (in Russian).
7. Shestibratov K. A., Baranov O. Yu., Mescherova E. N., Kiryanov P. S., Pantelev S. V., Mozharovskaya L. V., Krutovsky K. V., Padutov V. E. Structure and phylogeny of the curly birch chloroplast genome. *Frontiers in Genetics*, 2021, vol. 12, art. 625764. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.625764>
8. Pantelev S. V., Mozharovskaya L. V., Kir'yanov P. S., Kagan D. I., Baranov O. Yu. Structural and functional organization of the mitochondrial genome of the phytopathogenic fungus *Phoma* sp.1. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 4, pp. 359–373 (in Russian).
9. Kagan D. I., Pantelev S. V., Mozharovskaya L. V., Baranov O. Yu., Padutov V. E. High-throughput sequencing of cytoplasmic genomes of the common hornbeam *Carpinus betulus* L. (Betulaceae). *Kletochnaya biologiya i biotekhnologiya rastenii: tezisy dokladov II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Minsk, 28–31 maya 2018 goda)* [Cell biology and plant biotechnology: abstracts of the II International scientific and practical conference (Minsk, May 28–31, 2018)]. Minsk, 2018, pp. 24–25 (in Russian).
10. Pantelev S. V., Mozharovskaya L. V., Baranov O. Yu. Study of the structural features of COI haplotypes of the pine bark beetle (*Ips acuminatus* Gyll.) in the south of Belarus. *Lesnoe khozyaistvo: materialy dokladov 84-i nauchno-tekhnicheskoi konferentsii, posvyashchennoi 90-letnemu yubileyu BGTU i Dnyu belorusskoi nauki (s mezhdunarodnym uchastiem), Minsk, 03–14 fevralya 2020 goda* [Forestry: materials of reports of the 84th scientific and technical conference dedicated to the 90th anniversary of BSTU and the Day of Belarusian Science (with international participation), Minsk, February 03–14, 2020]. Minsk, 2020, pp. 75–78 (in Russian).
11. Mozharovskaya L. V. Comparative analysis of the expression activity of genes in Scots pine seedlings under cold stress conditions. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2021, vol. 30, pp. 95–104 (in Russian).
12. Vasilevskaya E. D., Ivanov O. A., Shevtsov N. A., Lazarevich D. K. Screening of enzymatic activity of micromycetes of East Antarctica. *Sovremennyye problemy eksperimental'noi botaniki: sbornik materialov III Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchenykh (Minsk–Naroch', 25–29 sentyabrya 2023 goda)* [Modern problems of experimental botany: collection of materials of the III International scientific conference of young scientists (Minsk–Naroch, September 25–29, 2023)]. Minsk, 2023, pp. 156–158 (in Russian).
13. Chizhik O. V., Deeva A. M., Reshetnikov V. N. Biologically active compounds of fruits and leaves of *Vaccinium corymbosum* L. *Byulleten' Glavnogo botanicheskogo sada* [Bulletin of the Main Botanical Garden], 2020, no. 4, pp. 45–51 (in Russian).

14. Kovalevich A. I., Konchits A. P., Sidor A. I. Software and technological complex for computer biometrics of seed and planting material of forest tree species. *Trudy BGTU. N 1. Lesnoe khozyaistvo* [Proceedings of BSTU. No 1. Forestry], 2013, no. 1, pp. 23–25 (in Russian).
15. Amel'yanovich M. D., Morozik P. M., Gonchar A. L., Mosse I. B. Genetic risk factors for the development of metabolic syndrome. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2013, vol. 16, pp. 24–31 (in Russian).
16. Romanishko E. L., Mikhailova M. E., Kireeva A. I., Sheiko R. I. Alpha-mannosidosis is a genetic defect in the Belarusian population of Aberdeen-Angus cattle. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2023, vol. 34, pp. 41–48 (in Russian).
17. Zinchenko A. I., Kvach S. V., Shchokolova A. S. Construction of plasmid enriched with immunostimulatory CpG motifs. *East European Science Journal*, 2014, no. 3, pp. 10–13.
18. Ivanova Yu. N., Solovei L. A., Loginova D. B., Miroshnikova E. E., Dubovets N. I., Silkova O. G. Creation and characteristics of a bread wheat line with centric translocation T2DL.2RL. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov journal of genetics and selection], 2019, vol. 23, no. 7, pp. 846–855 (in Russian).
19. Antonevich N., Goncharov A., Timokhina O., Rynda E., Minich Ya., Prokhorov A., Mokhort T., Chizh K. New biomedical cell products for immunotherapy of human diseases. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2022, no. 2 (228), pp. 15–23 (in Russian).
20. Babak O. G., Anisimova N. V., Nikitinskaya T. V., Nekrashevich N. A., Yatshevich K. K., Drozd E. V., Fateev D. A., Berensen F. A., Artem'eva A. M., Kil'chevskii A. V. Study of polymorphism of the R2R3 Myb genes of transcription factors of crops of the *Solanaceae* family and the Myb114 gene of the *Brassica* genus in connection with the regulation of anthocyanin biosynthesis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2022, vol. 66, no. 4, pp. 414–424 (in Russian).
21. Kovalevich A. I., Padutov V. E., Sidor A. I., Konchits A. P., Ivanovskaya S. I., Baranov O. Yu., Kagan D. I., Markevich T. S., Razumova O. A., Padutov A. V. Forest-forming species. *Genetic basis of plant breeding. 2nd ed. Volume 2. Particular plant genetics. Ch. 2*. Minsk, 2020, pp. 602–605 (in Russian).
22. Shishlova-Sokolovskaya A. M., Khmylevskaya E. P., Urbanovich O. Yu. Development of a CRISPR/Cas9 system for genomic editing of the *NtPDS* gene of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2022, vol. 33, pp. 47–57 (in Russian).
23. Popowich E. A., Firsov A. P., Mitiouchkina T. Y., Filipenya V. L., Dolgov S. V., Reshetnikov V. N. Agrobacterium-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2007, vol. 90, no. 3, pp. 237–244. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9254-z>
24. Urban V. A., Nazarenko P. S., Perepechko S. A., Veresov V. G. Using PD-L1 full-length structure, enhanced induced fit docking and molecular dynamics simulations for structural insights into inhibition of PD-1/PD-L1 interaction by small-molecule ligands. *Molecular Simulation*, 2022, vol. 48, no. 14, pp. 1269–1283. <https://doi.org/10.1080/08927022.2022.2080824>
25. Mikhnavev L., Abashkin V., Khamitsevich H., Shcharbin D., Burko A., Krekoten N., Radziuk D. Ultrasonic formation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> reduced graphene oxide–salicylic acid nanoparticles with switchable antioxidant function. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2022, vol. 8, no. 3, pp. 1181–1192. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.1c01603>
26. Abashkin V., Pędziwiatr-Werbicka E., Gómez R., de la Mata F. J., Dzmitruk V., Shcharbin D., Bryszewska M. Prospects of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles as non-viral vectors for delivery of anticancer siRNAs siBCL-xL and siMCL-1. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13, no. 10, art. 1549. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101549>
27. Kabashnikova L. F., Savchenko G. E., Abramchik L. M., Domanskaya I. N., Viks T. N., Pashkevich L. V., Pilipovich T. S., Dovbnyuk Yu. N., Shpilevskii S. N., Martysyuk A. V. Structural and functional state of chloroplasts in connection with the formation of an immune response during infection of spring barley seedlings with the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Botanika. Issledovaniya* [Botany. Research], 2020, no. 49, pp. 275–290 (in Russian).
28. Akhmatova N. K., Akhmetova M. I., Belov G. V., Bondarenko V. V., Volkov V. P., Ekubov K. R. [et al.]. *Morphological foundations of pathology*. Novosibirsk, SibAK Publ., 2015. 176 p. (in Russian).
29. Volotovskii I., Lobanok E., Loiko E. Stem cells: prospects for the development of cellular technologies. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2011, no. 1 (95), p. 17 (in Russian).
30. Kolomiets E. I. Year of science in the Republic of Belarus: achievements and prospects for the development of domestic microbiology. *Mikrobnnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 9* [Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific papers. Vol. 9]. Minsk, 2017, pp. 3–8 (in Russian).
31. Shulyak T. L., Skokova O. I., Golovneva N. A. Creation of low-lactose fermented dairy products. *Pererabotka moloka* [Milk processing], 2017, no. 10 (216), pp. 42–46 (in Russian).
32. Titok V., Reshetnikov V., Veevnik A. Biotechnological complex for the accelerated breeding of valuable plant species. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2019, no. 6 (196), pp. 29–31 (in Russian).
33. Ageets V. Yu., Voronova G. P., Kolomiets E. I., Sverchkova N. V., Petrashevskaya T. V., Proskurina I. V., Adamovich B. V. Biological method of purification of contaminated water discharged from fish farms to water bodies. *Voprosy rybnogo khozyaistva Belarusi* [Issues of fisheries in Belarus], 2017, no. 33, pp. 98–104 (in Russian).
34. Kil'chevskii A. V., Khotyleva L. V. (eds.). *Genetic basis of plant breeding. Vol. 3. Biotechnology in plant breeding. Cellular engineering*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2012. 489 p. (in Russian).
35. Privalov F., Kil'chevskii A., Grib S., Kozlovskaya Z., Kovalevich A. Bank of plant genetic resources. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2016, no. 10 (164), pp. 24–27 (in Russian).

36. Sheiko I. P., Sheiko R. I. Models of development of Belarusian livestock farming. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2018, vol. 62, no. 4, pp. 504–512 (in Russian).
37. Kolomiets E. I. Collection of non-pathogenic microorganisms of the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2016, no. 4, pp. 48–52 (in Russian).
38. Smolikova G. N., Laman N. A., Boriskevich O. V. Role of chlorophylls and carotenoids in seed tolerance to abiotic stressors. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, vol. 58, no. 6, pp. 965–973. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060161>
39. Kilchevsky A. V., Khotyleva L. V. Ecological and genetic aspects of plant breeding. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2009, vol. 9, pp. 14–18 (in Russian).
40. Savina N. V., Kubrak S. V., Mil'ko L. V., Kil'chevskii A. V., Nikitina E. V., Tozhibaev K. Sh. DNA barcoding as a tool for environmental monitoring and assessment of species diversity of rare plant species. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2020, vol. 29, pp. 25–36 (in Russian).
41. Semenchenko V. Alien species of animals in natural ecosystems of Belarus. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2018, no. 7 (185), pp. 20–25 (in Russian).
42. Chumakov L. S., Maslovskii O. M., Chuiko E. V., Sysoi I. P., Shevkunova A. V., Shimanovich R. V. Assessment of the distribution of some invasive plant species on the territory of Minsk. *Ekologicheskii vestnik* [Ecological bulletin], 2014, no. 1 (27), pp. 104–112 (in Russian).
43. Usenya V. V., Blinova N. S. Estimation of the number of apical (*Ips acuminatus* Gyll.) and six-toothed (*Ips sexdentatus* Boern.) bark beetles in pine plantations using pheromone preparations. *Trudy BGTU. Seriya 1: Lesnoe khozyaistvo, prirodoop'zovanie i pererabotka vozobnovlyaemykh resursov* [Proceedings of BSTU. Series 1: Forestry, environmental management and processing of renewable resources], 2019, no. 1 (216), pp. 84–88 (in Russian).
44. Urbanovich O. Yu., Kuzmitskaya P. V., Kil'chevskii A. V. Identification and genetic diversity of varieties of plum crops in Belarus. *Genetika* [Genetics], 2017, vol. 53, no. 7, pp. 805–815 (in Russian).
45. Kartel' N. A., Malyshev S. V., Urbanovich O. Yu., Khatskevich A. A. Molecular markers in the study of economically valuable traits of agricultural crops. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2009, vol. 9, pp. 19–27 (in Russian).
46. Mikhailova M. E., Sheiko R. I., Kireeva A. I., Romanishko E. L., Kamysh N. A., Tikhanovich N. I., Belyak O. A., Bayakhov A. N. DNA screening of recessive mutations causing the development of hereditary defects (BLAD and CVM syndromes) in the cattle population in Belarus. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2019, vol. 27, pp. 90–96 (in Russian).
47. Kovalevich A., Padutov V., Baranov O., Sidor A., Kagan D., Ivanovskaya S. Conservation and rational use of forests on a selection-genetic basis. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2022, no. 4, pp. 12–17 (in Russian).
48. Mikhalenko E., Guzenko E., Kil'chevskii A. Center for the Study of Microbiome: Fundamental and Applied Research. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2022, vol. 1, no. 8, pp. 27–31 (in Russian).

### Information about the authors

*Oleg Yu. Baranov* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Academician-Secretary of the Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

*Valentina V. Rassadina* – Ph. D. (Biol.), Deputy Academician-Secretary of the Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rasval@presidium.bas-net.by

*Zhanna M. Anisova* – Ph. D. (Biol.), Scientific Secretary of the Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anisova@presidium.bas-net.by

### Информация об авторах

*Баранов Олег Юрьевич* – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, академик-секретарь Отделения биологических наук НАН Беларуси (ул. Независимости, 66, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

*Рассадина Валентина Вацлавовна* – канд. биол. наук, заместитель академика-секретаря Отделения биологических наук НАН Беларуси (ул. Независимости, 66, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rasval@presidium.bas-net.by

*Анисова Жанна Михайловна* – канд. биол. наук, ученый секретарь Отделения биологических наук НАН Беларуси (ул. Независимости, 66, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anisova@presidium.bas-net.by

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 581.19:632.3  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-15-24>

Поступила в редакцию 09.11.2023  
Received 09.11.2023

**Н. В. Балюк, Н. А. Ламан, Ж. Н. Калацкая**

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

## **ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛОНАЛЬНО МИКРОРАЗМНОЖЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИХ ОБРАБОТКЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРАМИ**

**Аннотация.** Изучено влияние эпибрассинолида в сочетании с салициловой кислотой и метилжасмонатом на формирование комплексной устойчивости клонально микропропагированных растений картофеля сорта Бриз к вирусу Y картофеля и недостатку влаги, функционирование про-/антиоксидантной системы, а также на физиологическое состояние, продуктивность и качество полученных мини-клубней. Выявлено, что антивирусная устойчивость в условиях комбинированного стресса формируется только в присутствии эпибрассинолида, который запускает серию защитных механизмов за счет накопления перекиси водорода, фенольных соединений и возрастания активности пероксидаз, в результате чего сохраняется продуктивность и улучшается качество получаемой продукции. Применение трехкомпонентной смеси позволяет получить наибольшие массу и количество мини-клубней картофеля, при этом ее защитное действие против вирусной инфекции не проявляется.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*, недостаток влаги, вирус Y картофеля, эпибрассинолид, салициловая кислота, метилжасмонат, перекись водорода, антиоксидантные ферменты, пролин, фенольные соединения

**Для цитирования:** Балюк, Н. В. Физиолого-биохимические особенности реализации адаптивного потенциала клонально микропропагированных растений картофеля при их обработке иммуностимуляторами / Н. В. Балюк, Н. А. Ламан, Ж. Н. Калацкая // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 15–24. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-15-24>

**Natallia V. Baliuk, Nikolai A. Laman, Joanna N. Kalatskaja**

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

## **PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FEATURES OF IMPLEMENTATION OF THE ADAPTIVE POTENTIAL OF CLONALLY MICROPROPAGATED POTATO PLANTS USING IMMUNOSTIMULANTS**

**Abstract.** The effect of epibrassinolide in combination with salicylic acid and methyl jasmonate on the formation of complex resistance of clonally micropropagated potato plants of the Briz variety to the potato virus Y and to moisture lack, their physiological state, the functioning of the pro-/antioxidant system, as well as on the productivity and quality of the obtained mini-tubers was studied. It was revealed that antiviral resistance under combined stress conditions is formed only in the presence of epibrassinolide that triggers a series of protective mechanisms through accumulation of hydrogen peroxide, phenolic compounds and an increase in peroxidase activity, while maintaining productivity and improving the quality of the products obtained. The use of a three-component mixture is accompanied by the largest mass and a number of potato mini-tubers, while its protective effect against a viral infection is not manifested.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, moisture deficiency, potato virus Y, epibrassinolide, salicylic acid, methyl jasmonate, hydrogen peroxide, antioxidant enzymes, proline, phenolic compounds

**For citation:** Baliuk N. V., Laman N. A., Kalatskaja J. N. Physiological and biochemical features of implementation of the adaptive potential of clonally micropropagated potato plants using immunostimulants. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 15–24 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-15-24>

**Введение.** Вирусы растений распространены по всему миру и считаются одними из наиболее опасных патогенов, что приводит к серьезным экономическим потерям в плане продуктивности и качества урожая. В отличие от вредителей, грибов и бактерий, против вирусов нельзя использовать методы прямого контроля. Борьба с вирусными заболеваниями растений зависит от генетической устойчивости растений-хозяев, организации агротехнических приемов ухода, способных

активизировать потенциальные защитные силы растений. Кроме того, растения подвергаются (одновременно или последовательно) неблагоприятным воздействиям абиотической природы, что может существенно влиять на формирование их защитных реакций. Проблема оптимального водообеспечения на территории Республики Беларусь возникает также в регионах с достаточным годовым количеством осадков из-за неравномерности их выпадения в течение вегетационного периода.

В настоящее время малоизученными остаются комбинированные условия окружающей среды (вирусное заражение и недостаток влаги) и физиолого-биохимические механизмы, которые могут приводить к различным взаимоотношениям растений с вирусами – от мутуализма до паразитизма. С одной стороны, засуха повышает восприимчивость растений к патогенам [1], а с другой – вирусы могут повышать способность растений противостоять абиотическим стрессам, вызывая засухоустойчивость или холодостойкость [2].

Анализ литературы по данной проблеме свидетельствует об эффективности некоторых соединений (иммуностимуляторов), таких как брассиностероиды, салициловая кислота (СК) и метилжасмонат (МеЖ), в формировании у растений устойчивости к вирусам и в повышении их засухоустойчивости путем индукции системной устойчивости [3, 4].

Цель данной работы – установить физиолого-биохимические особенности формирования комплексной устойчивости клонально микроразмноженных растений картофеля к вирусному заражению на фоне действия абиотического стресса при их обработке иммуностимуляторами.

**Материалы и методы исследования.** Опыты проведены на клонально микроразмноженных растениях картофеля белорусской селекции сорта Бриз, предоставленных РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». Культивирование растений-регенерантов осуществляли на торфяном почвогрунте «Двина» в условиях водного дефицита – 40–45 % от полной влагоемкости. Листовую поверхность растений обрабатывали путем ее опрыскивания эпибрассинолидом (ЭБЛ) в составе препарата «Эпин-Экстра» (10–7 моль/л) с МеЖ (10–7 моль/л) и/или СК (10–6 моль/л). Для искусственного заражения Y-вирусом картофеля (YVK) листья натирали клеточным соком растений-доноров при помощи мелкозернистой наждачной бумаги через 3 сут после обработки смесями. Условия водного дефицита создавали через неделю после обработки растений и продолжали в течение 14 сут до появления симптомов повреждений на листьях, после чего их фиксировали. Растения выращивали при температуре 20–21 °С, освещенности 12 000 лк и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь).

YVK определяли с помощью иммуноферментного анализа согласно инструкции Коренево, содержание перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) – по цветной реакции с ксиленовым оранжевым; сумму фенольных соединений – согласно методу, основанному на реакции фенолов с реактивом Фолина–Чокальтеу; интенсивность перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ) – по способности 2-тиобарбитуровой кислоты связываться с липидными перекисями; содержание пролина – по цветной реакции с нингидрином при нагревании; извлечение фотосинтетических пигментов осуществляли 96%-ным ацетоном по Lichtenthaler.

Общую активность растворимой пероксидазы определяли по Бояркину, используя в качестве хромогенного субстрата бензидин; активность глутатионредуктазы (ГР) – по кинетике окисления НАДФ(Н) согласно методике, предложенной Smith с соавт.; активность аскорбатпероксидазы (АПО) – по реакции восстановления пероксида водорода аскорбатом согласно методу Nakano и Asada; активность полифенолоксидазы (ПФО) – по изменению оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении пирокатехина за определенный промежуток времени.

Для статистической обработки использовали программу Statistica 8.0. Каждый опыт проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. В работе приведены средние статистические значения и их стандартные ошибки. Различия между вариантами оценивали с помощью критерия Краскела–Уоллеса и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Достоверно различающиеся значения обозначали буквами a, b, c, d.

**Результаты и их обсуждение.** В наших исследованиях дефицит почвенной влаги приводил к снижению степени заражения YVK у инфицированных растений на 35,2 % по сравнению с оп-

тимальными условиями выращивания [5]. Показано, что недостаток влаги негативно влияет на транслокацию вируса в растениях. Например, при засухе за счет активации аутофагии в растениях томата подавляется распространение вируса желтой курчавости листьев [6]. Более того, обнаружено, что повышенная интенсивность засухи снижает вирусную инфекцию в листьях фасоли [7]. Это указывает на то, что уровень водного дефицита имеет важное значение при взаимодействии растений и вирусов.

В условиях комбинированного стресса только при использовании ЭБЛ наблюдалось снижение степени заражения УВК на 27,3 % (рис. 1). В работе [8] показано, что применение ЭБЛ замедляло развитие вируса огуречной мозаики за счет индукции защитных генов, а обработка растений огурца ингибитором синтеза брассинозолом способствовала развитию вирусной инфекции. Применение смесей ЭБЛ + СК и ЭБЛ + МеЖ не вызывало достоверно значимых отличий по содержанию вирусных частиц в сравнении с зараженным контролем, что, вероятно, связано с ингибированием ЭБЛ экспрессии генов, отвечающих за салицилат- и жасмонат-зависимые ответы. Ранее антагонистические взаимодействия были продемонстрированы на растениях риса при экзогенной обработке ЭБЛ против галловой нематоды, что выражалось в подавлении двух основных генов (*OsAOS2* и *OsJAMYB*) жасмонат-индуцируемого сигнального пути [9]. Применение трехкомпонентной смеси (ЭБЛ с СК и МеЖ) приводило к накоплению УВК в листьях картофеля, что может быть связано с интерференцией отдельных сигнальных систем, индуцируемых одновременно засухой и вирусным заражением.

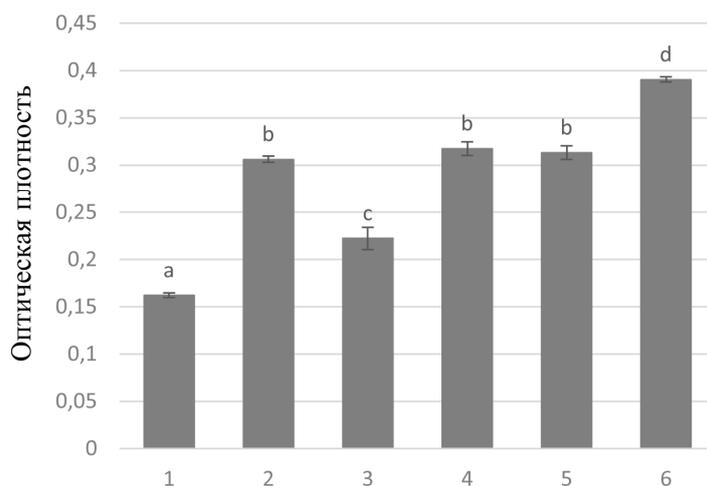


Рис. 1. Антивирусная активность в листьях инфицированных растений картофеля на фоне водного дефицита при обработке смесями иммуностимуляторов (1 – контроль; 2 – УВК; 3 – ЭБЛ; 4 – ЭБЛ + СК; 5 – ЭБЛ + МеЖ; 6 – ЭБЛ + СК + МеЖ)

Fig. 1. Antiviral activity in the leaves of the infected potato plants against the water deficiency background when treated with mixtures of immunostimulants (1 – control; 2 – potato virus Y; 3 – epibrassinolide; 4 – epibrassinolide + salicylic acid; 5 – epibrassinolide + methyl jasmonate; 6 – epibrassinolide + salicylic acid + methyl jasmonate)

Чаще всего в результате вирусного заражения и недостатка влаги отмечается торможение роста растений, что имеет решающее значение для их выживания в условиях стресса. В наших исследованиях инфицирование УВК на фоне дефицита влаги вызывало ингибирование ростовых процессов и уменьшение длины побегов на 26,6 % по сравнению со здоровым контролем (рис. 2, таблица).

Применение всех исследуемых вариантов обработки иммуностимуляторами способствовало индукции ростовых процессов и увеличению длины побегов на 15–37 %. Известно, что брассиностероиды участвуют в ростовых процессах, вызывая удлинение гипокотилия и эпикотилия, увеличивая высоту растения и накопление надземной массы [10]. Увеличение длины побегов при обработке МеЖ в условиях водного дефицита, вероятно, связано с регуляцией синтеза фитогормонов, отвечающих за ростовые процессы. Сообщалось, что комбинированная обработка



Рис. 2. Внешний вид растений картофеля при обработке иммуностимуляторами в условиях вирусного заражения и недостатка влаги

Fig. 2. Appearance of the potato plants when treated with immunostimulants under the conditions of viral infection and moisture lack

**Высота побегов и сумма хлорофиллов в зараженных УВК листьях картофеля в условиях недостатка влаги при обработке иммуностимуляторами**

**Height of shoots and the total chlorophyll content in the potato virus Y-infected potato leaves against the moisture lack background when treated with immunostimulants**

Вариант обработки	Высота побегов		Сумма хлорофиллов	
	см	% к УВК	мг/г сухой массы	% к УВК
Контроль	15,7 ± 0,6 <sup>ac</sup>	126,6	21,0 ± 0,2 <sup>ad</sup>	122,8
УВК	12,4 ± 1 <sup>b</sup>	100,0	17,1 ± 1 <sup>b</sup>	100,0
ЭБЛ	14,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	114,5	15,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	93,0
ЭБЛ + СК	14,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	116,1	19,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	112,3
ЭБЛ + МеЖ	14,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	118,6	19,5 ± 0,7 <sup>ac</sup>	114,0
ЭБЛ + СК + МеЖ	17,0 ± 0,7 <sup>c</sup>	137,1	22,6 ± 0,2 <sup>d</sup>	132,2

смесью МеЖ с СК способствовала наибольшему увеличению длины побегов и корней кукурузы в условиях засухи по сравнению с индивидуальной (МеЖ либо СК), что согласуется с полученными экспериментальными данными [4].

Общеизвестно, что одним из наиболее важных физиологических процессов у растений является фотосинтез, поэтому структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата может служить индикатором неблагоприятных условий при взаимодействии вирус–растение в условиях водного дефицита. По нашим данным (см. таблицу), инфицирование УВК на фоне дефицита влаги вызвало снижение общего содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях картофеля на 22,8 % по отношению к неинфицированному контролю, что может быть вызвано активацией компонентов хлорофилл-синтезной системы, таких как хлорофиллаза, или прямым воздействием вируса на синтез пигментов.

Обработка ЭБЛ в смеси с сигнальными молекулами оказала положительное влияние на биосинтез фотосинтетических пигментов при совокупном действии стрессоров, что подтверждалось увеличением суммы хлорофиллов *a* и *b* на 12–32 % по отношению к инфицированному контролю. Показано, что обработка СК улучшает проницаемость мембран, облегчая поглощение и использование минеральных питательных веществ, таких как Mg и Fe, которые необходимы для биосинтеза хлорофилла и транспорта ассимилятов [11]. Кроме того, имеются данные о влиянии МеЖ на фотосинтетическую активность. Так, при обработке жасмонатами отмечалось увеличение пула хлорофиллов и повышение эффективности фотосистемы II вследствие активации двух ферментов – протохлорофиллидредуктазы и дегидратазы  $\alpha$ -аминолевулиновой кислоты [12].

Повышение устойчивости картофеля к УВК в условиях водного дефицита под влиянием иммуностимуляторов может быть связано с изменением концентрации  $H_2O_2$  в тканях растений. Применение ЭБЛ вызывало значительное накопление  $H_2O_2$ , которое, вероятно, способствовало снижению вирусного заражения. Однако в данном варианте содержание ПОЛ не изменилось относительно инфицированного контроля (рис. 3). Полученные результаты согласуются с литературными данными. Так, при опрыскивании растений *Nicotiana benthamiana* brassиностероидами в верхних необработанных листьях наблюдалась резистентность к вирусу, сопровождающаяся накоплением  $H_2O_2$  [3]. Накопление  $H_2O_2$  в стрессовых условиях происходило также при применении варианта ЭБЛ с МеЖ (содержание продуктов ПОЛ сохранялось на уровне инфицированного контроля). Вероятно, способность МеЖ вызывать оксидативный стресс связана с ингибированием общей активности пероксидазы. Сообщалось, что добавление МеЖ к суспензионной культуре *Panax ginseng* индуцировало окислительный стресс, о чем свидетельствовало повышение в клетках содержания  $H_2O_2$  и снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы [13]. Пониженный уровень  $H_2O_2$  при применении ЭБЛ + СК, вероятно, является следствием функциональной общей активности пероксидазы. Обработка растений трехкомпонентной смесью (ЭБЛ с СК и МеЖ) вызывала меньшее накопление  $H_2O_2$ , что может быть результатом образования гидроксильного радикала, более токсичного по сравнению с  $H_2O_2$ , который способен проходить через мембраны и запускать процесс самоокисления липидов, что подтверждается максимальным накоплением продуктов ПОЛ при применении данного варианта.

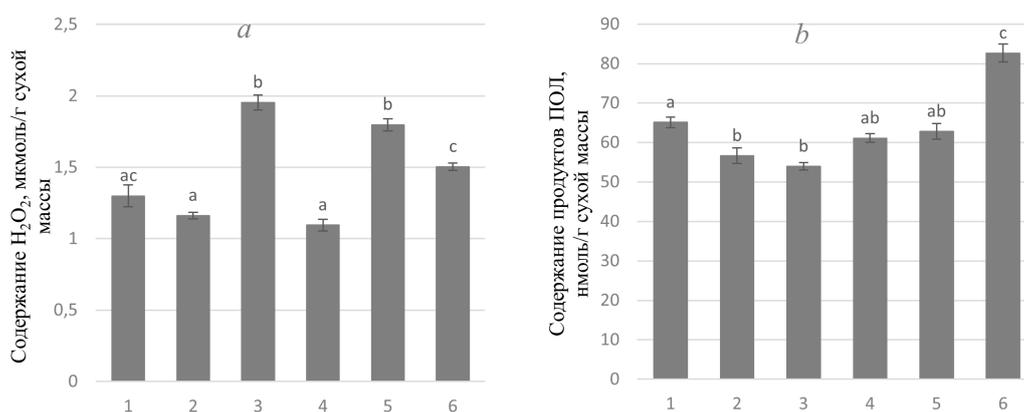


Рис. 3. Содержание  $H_2O_2$  (a), продуктов ПОЛ (b) в листьях картофеля на фоне вирусного заражения и недостатка влаги при обработке иммуностимуляторами: 1 – контроль; 2 – УВК; 3 – ЭБЛ; 4 – ЭБЛ + СК; 5 – ЭБЛ + МеЖ; 6 – ЭБЛ + СК + МеЖ

Fig. 3. Content of  $H_2O_2$  (a), lipid peroxidation products (b) in potato leaves against the background of viral infection and moisture lack when treated with immunostimulants: 1 – control; 2 – potato virus Y; 3 – epibrassinolide; 4 – epibrassinolide + salicylic acid; 5 – epibrassinolide + methyl jasmonate; 6 – epibrassinolide + salicylic acid + methyl jasmonate

Далее была изучена сравнительная активность антиоксидантных ферментов у растений картофеля в условиях совокупно действующих факторов при обработке иммуностимуляторами (рис. 4). При заражении растений картофеля УВК активность ГР повышалась, а общая активность пероксидазы и АПО сохранялась на уровне неинфицированного контроля. Обработка ЭБЛ способствовала увеличению общей активности пероксидазы и АПО, что может свидетельствовать о формировании защитных реакций, направленных на детоксикацию активных форм кислорода. Использование ЭБЛ + СК вызывало увеличение общей активности пероксидазы на фоне снижения активности АПО и ГР, что, вероятно, указывает на участие СК в регуляции внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$ . В варианте с обработкой ЭБЛ с МеЖ наблюдалось снижение общей активности пероксидазы и ГР по сравнению с инфицированным контролем. Считается, что активность ферментов зависит от продолжительности стрессового воздействия и приводит к изменению активности других сопряженных ферментов. Можно предположить, что повышение активности пероксидазы в ответ на воздействие стресс-факторов происходит на ранних этапах

формирования адаптивных реакций, а к концу эксперимента снижается на фоне индукции других антиоксидантных ферментов, участвующих в утилизации  $H_2O_2$ . Это предположение подтверждает сохранение активности АПО на уровне инфицированного контроля.

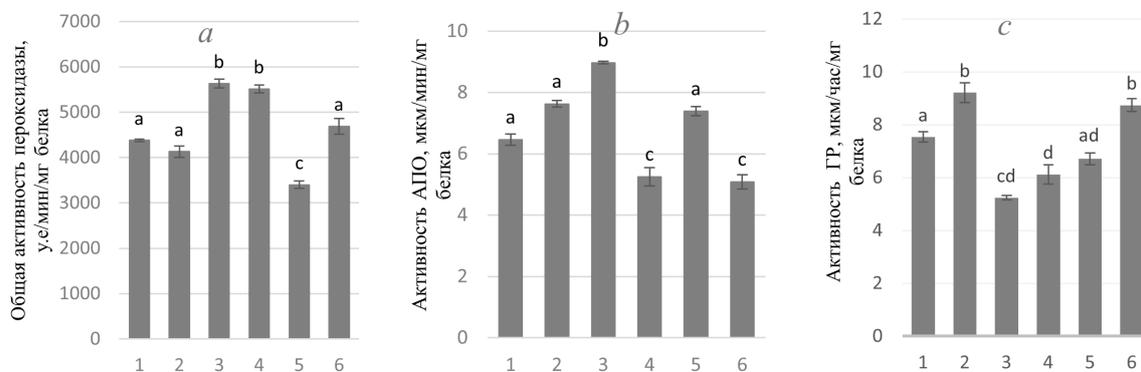


Рис. 4. Общая активность пероксидазы (a), АПО (b) и ГР (c) в листьях картофеля на фоне недостатка влаги и вирусного заражения при обработке растений иммуностимуляторами (1 – контроль; 2 – УВК; 3 – ЭБЛ; 4 – ЭБЛ + СК; 5 – ЭБЛ + МеЖ; 6 – ЭБЛ + СК + МеЖ)

Fig. 4. Total activity of peroxidase (a), ascorbate peroxidase (b) and glutathione reductase (c) in potato leaves against the background of moisture deficiency and viral infection when plants are treated with immunostimulants (1 – control; 2 – potato virus Y; 3 – epibrassinolide; 4 – epibrassinolide + salicylic acid; 5 – epibrassinolide + methyl jasmonate; 6 – epibrassinolide + salicylic acid + methyl jasmonate)

Применение трехкомпонентной смеси (ЭБЛ с МеЖ и СК) вызывало увеличение активности пероксидазы, что можно объяснить участием антиоксидантной системы в ответ на повышенное содержание ПОЛ и  $H_2O_2$ . При тех же условиях наблюдалось ингибирование активности АПО и увеличение ГР.

Таким образом, иммуностимуляторы позволяют кардинально изменять активность антиоксидантных ферментов путем формирования адаптивных реакций к вирусному заражению на фоне водного дефицита.

В условиях недостаточного почвенного влагообеспечения активность ПФО при заражении растений вирусом УВК выросла практически в 2 раза, а общее содержание фенольных соединений сохранялось на уровне неинфицированного контроля (рис. 5). Так как в обработанных ЭБЛ растениях существенно возростала общая активность пероксидазы и снижалась ПФО, можно

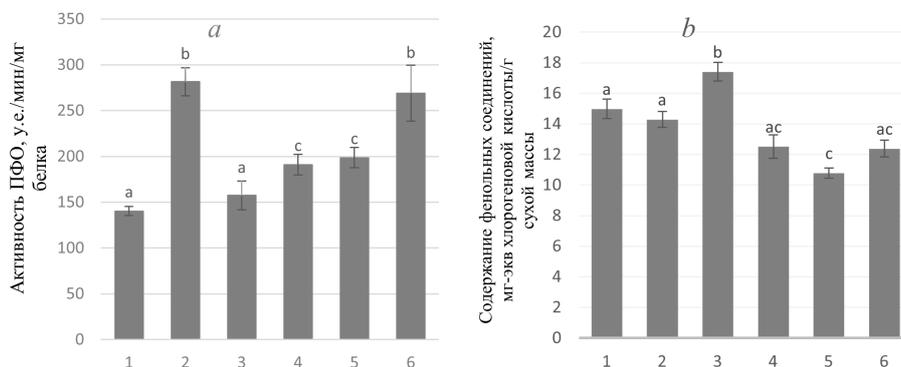


Рис. 5. Активность ПФО (a) и содержание фенольных соединений (b) в листьях картофеля на фоне недостатка влаги и вирусного заражения при обработке растений иммуностимуляторами (1 – контроль; 2 – УВК; 3 – ЭБЛ; 4 – ЭБЛ + СК; 5 – ЭБЛ + МеЖ; 6 – ЭБЛ + СК + МеЖ)

Fig. 5. Activity of polyphenol oxidase (a) and the content of phenolic compounds (b) in potato leaves against the background of moisture lack and viral infection when plants are treated with immunostimulants (1 – control; 2 – potato virus Y; 3 – epibrassinolide; 4 – epibrassinolide + salicylic acid; 5 – epibrassinolide + methyl jasmonate; 6 – epibrassinolide + salicylic acid + methyl jasmonate)

предположить, что в патосистеме картофель–УВК при недостатке влаги защитное действие связано с формированием адаптивных реакций на уровне индукции фенолпропаноидного метаболизма, который приводит к синтезу фенолов-прекурсоров лигнина. Во-первых, это выполняет важную защитную функцию в растении, создавая механический барьер на пути проникающих вирусов. Во-вторых, предшественники лигнина и свободные радикалы, образующиеся при их окислении, являются высокотоксичными соединениями для патогена.

Обработка СК или МеЖ способствует ингибированию активности ПФО, а в варианте с ЭБЛ + МеЖ – статистически значимому уменьшению содержания фенольных соединений по отношению к инфицированному контролю. Применение трехкомпонентной смеси способствовало сохранению активности ПФО и содержания фенольных соединений на уровне инфицированного контроля (рис. 5), что может быть связано с образованием токсичных для патогена хинонов, принимающих участие в образовании фитоалексинов, синтезе лигнина и суберина, генерировании активных форм кислорода.

При стрессовых условиях, особенно связанных с водным дефицитом, в растениях возрастает содержание низкомолекулярных протекторов, таких как пролин. При этом основной функцией пролина является поддержание водного баланса, а именно связанной воды в растительной клетке, и, как следствие, защита биологических мембран и органических молекул от деструкции. В условиях абиотического стресса содержание пролина регулируется не только синтезом, но и деградацией с участием сигнальных посредников и фитогормонов. Ферментом, лимитирующим скорость деградации пролина, является пролиндегидрогеназа, играющая важную роль в накоплении пролина. По сравнению с инфицированным вариантом обработка ЭБЛ не привела к статистически значимому отличию по содержанию пролина и активности пролиндегидрогеназы. Показано, что у растений арабидопсиса обработка экзогенным брассиностероидом ингибирует экспрессию гена основного изофермента  $\Delta 1$ -пирролин-5-карбоксилатсинтазы и не воздействует на образование транскриптов пролиндегидрогеназы [14], что согласуется с нашими результатами. В варианте с обработкой ЭБЛ + СК отмечалось снижение накопления пролина и ингибирование активности пролиндегидрогеназы на 22,5 и 25 % соответственно (рис. 6).

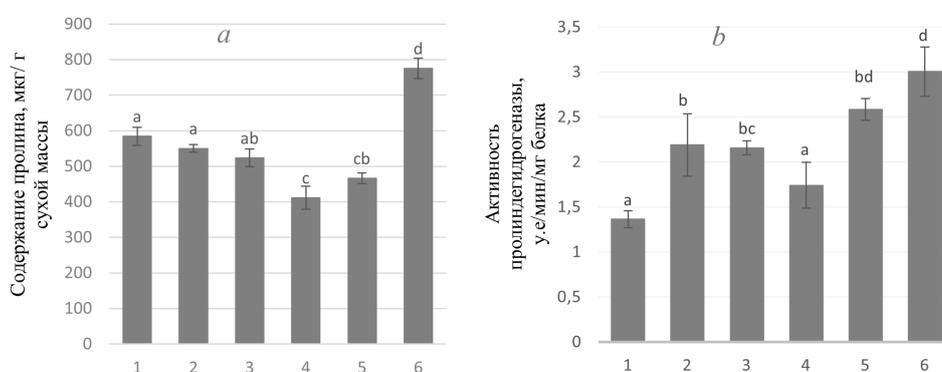


Рис. 6. Содержание пролина (а) и активность пролиндегидрогеназы (б) в листьях картофеля на фоне недостатка влаги и вирусного заражения при обработке растений иммуностимуляторами (1 – контроль; 2 – УВК; 3 – ЭБЛ; 4 – ЭБЛ + СК; 5 – ЭБЛ + МеЖ; 6 – ЭБЛ + СК + МеЖ)

Fig. 6. Proline content (a) and proline dehydrogenase activity (b) in potato leaves against the background of moisture lack and viral infection when plants are treated with immunostimulants (1 – control; 2 – potato virus Y; 3 – epibrassinolide; 4 – epibrassinolide + salicylic acid; 5 – epibrassinolide + methyl jasmonate; 6 – epibrassinolide + salicylic acid + methyl jasmonate)

Незначительное снижение содержания пролина при действии ЭБЛ с МеЖ происходит, вероятно, за счет увеличения активности фермента пролиндегидрогеназы. Кроме того, нельзя исключать влияние МеЖ на метаболизм пролина со стресс-индуцируемым накоплением  $H_2O_2$  в качестве сигнального посредника, так как этот фитогормон активно воздействует на системы образования и деградации активных форм кислорода. Увеличение содержания аминокислоты и активности пролиндегидрогеназы на 47,2 % отмечено только при применении смеси

ЭБЛ + СК + МеЖ. В работе [15] показано накопление пролина при заражении риса сферическим тунгровирусом, при этом его содержание увеличивается с развитием заболевания, что согласуется с нашими данными, где в варианте с обработкой смесью ЭБЛ + СК + МеЖ вирусное заражение было максимальным. Полученные результаты доказывают, что при накоплении вируса растения стараются повысить содержание пролина в клетке для формирования защитных реакций.

Для растений картофеля свойственно слабое развитие корневой системы, поэтому представляло интерес изучить продуктивность растений картофеля в условиях вирусного заражения и недостатка влаги. При обработке иммуностимуляторами наблюдали сохранение или увеличение количества мини-клубней, однако их масса снижалась. Максимальный коэффициент размножения и увеличение общей массы полученных мини-клубней зафиксированы при обработке трехкомпонентной смесью иммуностимуляторов – ЭБЛ + СК + МеЖ. Статистически значимое накопление сухого вещества и крахмала в таких же условиях отмечалось в вариантах с ЭБЛ, а увеличение содержания аскорбиновой кислоты в мини-клубнях картофеля – при обработке ЭБЛ + МеЖ.

**Заключение.** Оценено влияние эпибрасинолида в сочетании с салициловой кислотой и метилжасмонатом на формирование комплексной устойчивости клонально микроразмноженных растений к УВК и недостатку влаги, их физиологическое состояние, функционирование про-антиоксидантной системы (содержание пероксида водорода и продуктов ПОЛ, активность антиоксидантных ферментов, содержание фенольных соединений и пролина), продуктивность и качество мини-клубней картофеля. В условиях совокупно действующих факторов – вирусного заражения и недостаточного почвенного влагообеспечения – только использование эпибрасинолида способствует снижению содержания вирусных частиц, что сопровождается значительным накоплением  $H_2O_2$  в тканях и активизацией адаптивных процессов, включая увеличение содержания фенольных соединений и активности пероксидаз, а также сохранение продуктивности и улучшение качества сформированных мини-клубней картофеля. Вместе с тем при применении трехкомпонентной смеси отмечаются наибольшие масса и количество получаемых мини-клубней, при этом ее защитное действие против вирусной инфекции не проявляется. По сравнению с действием эпибрасинолида на биохимическом уровне зарегистрировано низкое содержание  $H_2O_2$  и фенольных соединений, незначительное накопление ПОЛ и пролина, отсутствие изменений в активности ферментов пероксидаз и увеличение содержания пролиндегидрогеназы.

Таким образом, выявленное положительное влияние эпибрасинолида в условиях комбинированного стресса при подавлении вирусного заражения и сохранении продуктивности подтверждает их взаимный вклад в поддержание баланса между развитием растений и их иммунитетом. Понимание физиолого-биохимических механизмов и специфики интегрирования различных гормональных сигналов под действием иммуностимуляторов при формировании защитного ответа растений к совокупному действию неблагоприятных факторов необходимо для разработки стратегии повышения стресс-толерантности сельскохозяйственных культур.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № B22M-037).

**Acknowledgements.** This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project no. B22M-037).

### Список использованных источников

1. Combined biotic and abiotic stress resistance in tomato / S. Kissoudis [et al.] // *Euphytica*. – 2015. – Vol. 202. – P. 317–332. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1363-x>
2. Environment and host genotype determine the outcome of a plant-virus interaction: from antagonism to mutualism / J. Hily [et al.] // *New Phytologist*. – 2016. – Vol. 209, N 2. – P. 812–822. <https://doi.org/10.1111/nph.13631>
3. Orchestration of hydrogen peroxide and nitric oxide in brassinosteroid-mediated systemic virus resistance in *Nicotiana benthamiana* / X. G. Deng [et al.] // *Plant J.* – 2016. – Vol. 85, N 4. – P. 478–493. <https://doi.org/10.1111/tbj.13120>
4. Combined seed and foliar pre-treatments with exogenous methyl jasmonate and salicylic acid mitigate drought-induced stress in maize / N. Tayyab [et al.] // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15, N 5. – P. e0232269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232269>
5. Балюк, Н. В. Защитные реакции инфицированных вирусом у растений картофеля при обработке 24-эпибрасинолидом с салициловой кислотой и метилжасмонатом / Н. В. Балюк, Ж. Н. Калацкая, Н. А. Ламан // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2023. – Т. 68, № 2. – С. 95–103.

6. Interplay between abiotic (drought) and biotic (virus) stresses in tomato plants / R. Mishra [et al.] // *Molec. Plant Pathol.* – 2022. – Vol. 23, N 4. – P. 475–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.13172>
7. Yarwood, C. E. Virus susceptibility increased by soaking bean leaves in water / C. E. Yarwood // *Plant Dis. Reporter.* – 1959. – Vol. 43. – P. 841–844.
8. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber / X. J. Xia [et al.] // *Plant Physiol.* – 2009. – Vol. 150, N 2. – P. 801–814. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138230>
9. Brassinosteroids suppress rice defense against root-knot nematodes through antagonism with the jasmonate pathway / K. Nahar [et al.] // *Molec. Plant-Microbe Interact.* – 2013. – Vol. 26, N 1. – P. 106–115. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0108-FI>
10. Yusuf, M. Brassinosteroids: Physiological roles and its signalling in plants / M. Yusuf, T. A. Khan, Q. Fariduddin // *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective* / ed.: M. Sarwat [et al.]. – New York, 2017. – Vol. 2. – P. 241–260. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4_10)
11. Effects of salicylic acid on yield and quality characters of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / M. Javaheri [et al.] // *Int. J. Agric. Crop Sci.* – 2012. – Vol. 4, N 16. – P. 1184–1187.
12. Jasmonic acid and methyl jasmonate modulate growth, photosynthetic activity and expression of photosystem II subunit genes in *Brassica oleracea* L / G. Sirhindi [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 9322–1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65309-1>
13. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and nonenzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors / B. M. Ali [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2006. – Vol. 25, N 6. – P. 613–620. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0065-6>
14. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis* / E. Abraham [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 51. – P. 363–372. <https://doi.org/10.1023/A:1022043000516>
15. Mohanty, S. K. Physiology of rice tungro virus disease: proline accumulation due to infection / S. K. Mohanty, R. Sridhar // *Phys. Plantarum.* – 1982. – Vol. 56, N 1. – P. 89–93. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb04904.x>

## References

1. Kissoudis C., Chowdhury R., van Heusden S., van de Wiel C., Finkers R., Visser R. G., Bai Y., van der Linden G. Combined biotic and abiotic stress resistance in tomato. *Euphytica*, 2015, vol. 202, pp. 317–332. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1363-x>
2. Hily J.-M., Poulicard N., Mora M.-Á., Pagán I., García-Arenal F. Environment and host genotype determine the outcome of a plant-virus interaction: from antagonism to mutualism. *New Phytologist*, 2016, vol. 209, no. 2, pp. 812–822. <https://doi.org/10.1111/nph.13631>
3. Deng X. G., Zhu T., Zou L. J., Han X. Y., Zhou X., Xi D. H., Zhang D. W., Lin H. H. Orchestration of hydrogen peroxide and nitric oxide in brassinosteroid-mediated systemic virus resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, 2016, vol. 85, no. 4, pp. 478–493. <https://doi.org/10.1111/tpj.13120>
4. Tayyab N., Naz R., Yasmin H., Nosheen A., Keyani R., Sajjad M., Hassan M. N., Roberts T. H. Combined seed and foliar pre-treatments with exogenous methyl jasmonate and salicylic acid mitigate drought-induced stress in maize. *PLoS ONE*, 2020, vol. 15, no. 5, p. e0232269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232269>
5. Balyuk N. V., Kalatskaya Zh. N., Laman N. A. Protective reactions of potato plants infected with Y virus when treated with 24-epibrassinolide with salicylic acid and methyl jasmonate. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 2, pp. 95–103 (in Russian).
6. Mishra R., Shteinberg M., Shkolnik D., Anfoka G., Czosnek H., Gorovits R. Interplay between abiotic (drought) and biotic (virus) stresses in tomato plants. *Molecular Plant Pathology*, 2022, vol. 23, no. 4, pp. 475–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.13172>
7. Yarwood C. E. Virus susceptibility increased by soaking bean leaves in water. *Plant Disease Reporter*, 1959, vol. 43, pp. 841–844.
8. Xia X. J., Wang Y. J., Zhou Y. H., Tao Y., Mao W. H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J. Q. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology*, 2009, vol. 150, no. 2, pp. 801–814. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138230>
9. Nahar K., Kyndt T., Hause B., Höfte M., Gheysen, G. Brassinosteroids suppress rice defense against root-knot nematodes through antagonism with the jasmonate pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, vol. 26, no. 1, pp. 106–115. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0108-FI>
10. Yusuf M., Khan T. A., Fariduddin Q. Brassinosteroids: Physiological roles and its signalling in plants. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective. Vol. 2*. New York, 2017, pp. 241–260. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4_10)
11. Javaheri M., Mashayekhi K., Dadkhah A., Tavallae F. Z. Effects of salicylic acid on yield and quality characters of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 2012, vol. 4, no. 16, pp. 1184–1187.
12. Sirhindi G., Mushtaq R., Gill S. S., Sharma P., Abd Allah E. F., Ahmad P. Jasmonic acid and methyl jasmonate modulate growth, photosynthetic activity and expression of photosystem II subunit genes in *Brassica oleracea* L. *Scientific Reports*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 9322–1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65309-1>

13. Ali M. B., Yu K. W., Hahn E. J., Paek K. Y. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and nonenzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 2006, vol. 25, no. 6, pp. 613–620. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0065-6>

14. Abrahám E., Rigó G., Székely G., Nagy R., Koncz C., Szabados L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2003, vol. 51, pp. 363–372. <https://doi.org/10.1023/A:1022043000516>

15. Mohanty S. K., Sridhar R. Physiology of rice tungro virus disease: proline accumulation due to infection. *Physiologia Plantarum*, 1982, vol. 56, no. 1, pp. 89–93. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb04904.x>

### Информация об авторах

*Балюк Наталья Валерьевна* – канд. биол. наук. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: balyuck.natalya@yandex.ru

*Ламан Николай Афанасьевич* – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1067-4936>. E-mail: laman.nikolai@gmail.com

*Калацкая Жанна Николаевна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6395-0757>. E-mail: kalatskayaj@mail.ru

### Information about the authors

*Natallia V. Balyuk* – Ph. D. (Biol.). V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: balyuck.natalya@yandex.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., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1067-4936>. E-mail: laman.nikolai@gmail.com

*Joanna N. Kalatskaja* – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6395-0757>. E-mail: kalatskayaj@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 592:502.4(476)  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-25-35>

Поступила в редакцию 27.01.2023  
Received 27.01.2023

**В. М. Байчоров, М. Д. Мороз, Ю. Г. Гигиняк, И. Ю. Гигиняк,  
Е. А. Куликова, Е. В. Корзун**

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

## **ФАУНА ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ РОДНИКОВЫХ ЭКОСИСТЕМ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ**

**Аннотация.** Приведены новые данные по водным беспозвоночным родниковых экосистем Минской области. Обнаружено 104 низших определяемых таксона (НОТ) представителей макрозообентосного и плейстонного комплексов, относящихся к 4 типам водных беспозвоночных животных: Platyhelminthes – 2 НОТ, Mollusca – 20, Annelida – 7, Arthropoda – 75 НОТ. До вида идентифицировано 75 таксономических элементов. Среднее количество выявленных водных беспозвоночных в изученных родниках Минской области составило 12–13 видов, численность – 205 экземпляров. В источниках обитают охраняемые виды животных, внесенных в Красную книгу Беларуси и Красные списки ряда стран Западной Европы. Ядро фауны изученных родников образуют виды, проявляющие кренофильные и реофильные свойства.

**Ключевые слова:** родниковые экосистемы, водные беспозвоночные, видовая структура, редкие и охраняемые виды, Беларусь

**Для цитирования:** Фауна водных беспозвоночных родниковых экосистем Минской области / В. М. Байчоров [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 25–35. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-25-35>

**Vladimir M. Baitchorov, Michael D. Moroz, Yuri G. Hihiniak, Irina Yu. Giginyak,  
Alena A. Kulikova, Jahor V. Korzun**

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

## **FAUNA OF AQUATIC INVERTEBRATES OF THE SPRING ECOSYSTEMS IN THE MINSK REGION**

**Abstract.** New data on aquatic invertebrates of the spring ecosystems of the Minsk region are presented. 104 lowest defined taxa (LDT) species and forms of representatives of macrozoobenthos and pleistone complexes belonging to 4 phyla of aquatic invertebrates were found: Platyhelminthes – 2, Mollusca – 20, Annelida – 7, Arthropoda – 75 species and forms. 75 taxonomic elements have been identified before the species. The average number of identified aquatic invertebrate species in the studied springs of the Minsk region was 12–13 species, and the number of 205 specimens. The sources are inhabited by protected species of animals listed in the Red Book of Belarus and the Red Lists of a number of Western European countries. It was concluded that the fauna of aquatic invertebrate animals is rich and represented by a number of species rare in Belarus and Europe.

**Keywords:** spring ecosystems, aquatic invertebrates, species structure, rare and protected species, Belarus

**For citation:** Baitchorov V. M., Moroz M. D., Hihiniak Yu. G., Giginyak I. Yu., Kulikova A. A., Korzun Ja. V. Fauna of aquatic invertebrates of the spring ecosystems in the Minsk region. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 25–35 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-25-35>

**Введение.** Родники (источники или ключи) являются естественными выходами подземных вод на земную поверхность. Они могут быть как самостоятельными водными объектами, так и истоками ручьев, рек или части акватории озер. Источники играют огромную роль в водном питании водоемов, поддержании водного баланса и сохранении стабильности окружающих их наземных биоценозов. Часто они являются центральным компонентом окружающих ландшафтов, повышая эстетические свойства и рекреационный потенциал последних. Однако начиная с середины прошлого века количество родников в Беларуси в силу различных причин (мелиоративных мероприятий, вырубки лесов, строительных и дорожных работ и др.) начало значительно и повсеместно сокращаться.

Основное отличие родниковых комплексов от других типов водных объектов заключается в том, что в большинстве источников температура воды в течение всего года имеет низкие значе-

ния – в пределах 3,0–12,0 °С. По этой причине в состав фауны родников могут входить виды, не обитающие в других типах водных экосистем. Здесь живут выходцы из холодных водоемов севера Евразии и горных районов Центральной и Южной Европы. Многие обитатели источников проявляют кренофильные, реофильные и оксифильные свойства. Встречаются также эврибионтные организмы. Фауна родников является важнейшим компонентом общего биологического разнообразия природы Беларуси. Число родников и их распределение по Минской области неравномерно, большинство из них приурочено к крупно-холмисто-моренным ландшафтам или к глубоко врезанным долинам рек. Изучение биоты родников в Беларуси началось в конце прошлого века [1–4].

Тем не менее необходимо признать, что в настоящее время базовых данных о таксономическом составе и численности гидробионтов, обитающих в родниках Беларуси, недостаточно, а имеющаяся информация ограничена или фрагментарна, что и определило цель наших исследований.

**Материалы и методы исследования.** Исследования были проведены в 2020 г. в течение весеннего, летнего и осеннего сезонов.

Взятие проб осуществляли при помощи стандартного гидробиологического сачка (25×25 см, 500 µm) методом траления по всей площади источника. Кроме того, для получения более полных репрезентативных данных по видовому составу фауны водных беспозвоночных на каменистых грунтах и в местах развития макрофитов производили выемку камней, растений и коряг с целью осмотра и сбора выявленных животных. Полученные материалы фиксировали с помощью 70%-ного раствора этилового спирта. Полный разбор коллектированного материала и проведение видовой идентификации проводили в лабораторных условиях.

При описании таксономического богатства беспозвоночных животных использовали термин НОТ – низший определяемый таксон [5].

За время исследований изучены 43 родниковые экосистемы, выявлены и определены 7266 экземпляров животных, находящихся на личиночной и имагинальной стадиях развития. В число объектов, включающих фауну беспозвоночных, входят следующие родники:

1 – окрестности (окр.) населенного пункта (н. п.) Беларучи (Логойский р-н), координаты: N54.11715, E27.58734; 2 – окр. н. п. Карпиловка (Логойский р-н), координаты: N54.20857, E27.47360; 3 – окр. н. п. Мурованка (Логойский р-н), координаты: N54.28680, E27.58734; 4 – окр. н. п. Гайна (Логойский р-н), координаты: N54.25298, E27.58734; 5 – окр. н. п. Логозинка (Логойский р-н), координаты: N54.20216, E27.85037; 6 – окр. н. п. Добренево (Логойский р-н), координаты: N54.25118, E27.82695; 7 – окр. н. п. Нивки (Логойский р-н), координаты: N54.27129, E27.89871; 8 – окр. н. п. Погробище (Логойский р-н), координаты: N54.25844, E28.01524; 9 – окр. н. п. Мурожное (Логойский р-н), координаты: N54.31012, E28.22474; 10 – окр. н. п. Забродье (Смолевичский р-н), координаты: N53.1352, E27.58734; 11 – окр. н. п. Трубенюк (Смолевичский р-н), координаты: N54.05413, E28.32352; 12 – окр. ст. Автозаводец (Смолевичский р-н), координаты: N54.11306, E28.17204; 13 – окр. н. п. Гливин (Борисовский р-н), координаты: N54.17338, E28.59296; 14 – окр. н. п. Кринички (Борисовский р-н), координаты: N54.44763, E28.72773; 15 – окр. н. п. Иканы (Борисовский р-н), координаты: N54.50115, E28.21310; 16 – окр. н. п. Новое Житье (Крупский р-н), координаты: N54.28844, E29.130734; 17 – окр. н. п. Крупа (Березинский р-н), координаты: N53.57201, E28.4152; 18 – окр. н. п. Дягильно (Дзержинский р-н), координаты: N53.41205, E27.04399; 19 – окр. н. п. Большие Новоселки (Дзержинский р-н), координаты: N53.44484, E27.06233; 20 – окр. н. п. Чырвоная Смена (Дзержинский р-н), координаты: N53.4801, E27.08407; 21 – окр. н. п. Юцки (Дзержинский р-н), координаты: N53.47508, E27.10045; 22 – окр. н. п. Гарбузы (Дзержинский р-н), координаты: N53.34013, E27.04097; 23 – окр. н. п. Родина (Дзержинский р-н), координаты: N53.35323, E27.17457; 24 – окр. н. п. Новины (Воложинский р-н), координаты: N53.59031, E26.54442; 25 – окр. н. п. Юржишки (Воложинский р-н), координаты: N53.57220, E26.56037; 26 – окр. н. п. Карбаны (Мядельский р-н), координаты: N54.78960, E26.65295; 27 – автокемпинг на берегу оз. Нарочь (Мядельский р-н), координаты: N54.83027, E26.72836; 28 – окр. н. п. Нарочь (Мядельский р-н), координаты: N54.88788, E26.90054; 29 – окр. н. п. Есьмановцы (Вилейский р-н), координаты: N54.41210, E27.18082; 30 – окр. пионерского лагеря, на берегу р. Вилия (Вилейский р-н), координаты:

наты: N54.42617, E26.84533; 31 – окр. н. п. Забродье (Вилейский р-н), координаты: N54.53918, E26.72886; 32 – окр. н. п. Свидичи (Копыльский р-н), координаты: N53.24270, E27.20938; 33 – окр. н. п. Свидичи (Копыльский р-н), координаты: N53.23786, E27.20125; 34 – источник, д. Малые Прусы (Копыльский р-н), координаты: N53.09318, E26.99819; 35 – источник, д. Степуры (Копыльский р-н), координаты: N53.12969, E26.96083; 36 – источник, д. Малые Городятичи (Любанский р-н), координаты: N52.54003, E28.31285; 37 – окр. н. п. Гайдуковка (Минский р-н), координаты: N54.20121, E27.38528; 38 – окр. н. п. Рогово (Минский р-н), координаты: N54.12582, E27.30041; 39 – окр. н. п. Хмелевка (Минский р-н), координаты: N54.03241, E27.25531; 40 – окр. н. п. Тычины-2 (Солигорский р-н), координаты: N52.76474, E27.50770; 41 – окр. н. п. Тычины-1 (Солигорский р-н), координаты: N52.76502, E27.50780; 42 – окр. н. п. Митявичи (Солигорский р-н), координаты: N52.79922, E27.588772; 43 – окр. н. п. Лань (Несвижский р-н), координаты: N53.14881, E26.69883.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные исследования родников Минской области позволили определить 104 НОТ представителей макрозообентосного и плейстонного комплексов, относящихся к 4 типам водных беспозвоночных животных: Platyhelminthes – 2 НОТ, Mollusca – 20, Annelida – 7, Arthropoda – 75 НОТ. До вида было идентифицировано 75 таксономических элементов (см. таблицу).

Наиболее многочисленной группой в таксономическом отношении были водные насекомые – 68 НОТ (65,4 % от всех идентифицированных водных беспозвоночных и 75,3 % от общей численности всех коллектированных животных).

**Таксономический состав и распределение водных беспозвоночных в родниках Минской области**

**Taxonomic composition and distribution of aquatic invertebrates of the springs in Minsk region**

№ п/п	Таксон, вид	Исученные источники	Всего, экз.
<b>Тип PLATYHELMINTHES</b>			
Класс Rhabditophora			
Отр. Tricladida			
Сем. Planariidae			
1	<i>Crenobia alpina</i> (Dana, 1766)	4	39
2	<i>Planariidae gen. spp.</i>	2, 3, 5, 11, 16, 32, 34, 38	36
<b>Тип MOLLUSCA</b>			
Класс Gastropoda			
Отр. Architaenioglossa			
Сем. Valvatidae			
1	<i>Valvata cristata</i> (O. F. Müller, 1774)	1, 3, 16, 34, 36	50
2	<i>Valvata piscinalis</i> (O. F. Müller, 1774)	1, 16	33
Отр. Neotaenioglossa			
Сем. Bithyniidae			
3	<i>Bithynia tentaculata</i> (Linnaeus, 1758)	16	8
Сем. Amnicolidae			
4	<i>Marstoniopsis scholtzi</i> (A. Schmidt, 1856)	9, 10, 11	3
Отр. Pulmonata			
Сем. Ancyliidae			
5	<i>Ancylus fluviatilis</i> O. F. Müller, 1774	8, 17, 32	23
Сем. Physidae			
6	<i>Aplexa hypnorum</i> (Linnaeus, 1758)	43	7
7	<i>Physa fontinalis</i> (Linnaeus, 1761)	40	2
Сем. Lymnaeidae			
8	<i>Galba truncatula</i> (O. F. Müller, 1774)	3, 4, 5, 6, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 26, 28, 29, 33, 34, 35, 37, 39	52
9	<i>Stagnicola palustris</i> (O. F. Müller, 1774)	1, 10, 40	13
10	<i>Radix sp.</i>	4, 13, 15, 35	4
Сем. Planorbidae			
11	<i>Anisus spinorbis</i> (Linnaeus, 1758)	8, 11, 15, 16, 37, 42	112
12	<i>Gyraulus albus</i> (O. F. Müller, 1774)	32, 33	17

Продолжение таблицы

№ п/п	Таксон, вид	Изученные источники	Всего, экз.
13	<i>Planorbarius corneus</i> (Linnaeus, 1758)	41	1
14	<i>Planorbis planorbis</i> (Linnaeus, 1758)	3, 13, 16	10
15	<i>Segmentina nitida</i> (O. F. Müller, 1774)	5, 6	2
Класс Bivalvia Отр. Veneroidea Сем. Sphaeriidae			
16	<i>Pisidium amnicum</i> O. F. Müller, 1774	1	36
17	<i>Pisidium casertanum</i> (Poli, 1791)	1	12
18	<i>Pisidium personatum</i> Malm, 1855	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41	369
19	<i>Pisidium subtruncatum</i> Malm, 1855	13, 15	57
20	<i>Pisidium</i> sp.	1, 5, 15, 18, 25, 28, 33	60
<b>Тип ANNELIDA</b> Класс Oligochaeta Отр. Nematoda Сем. Tubificidae			
1	<i>Eiseniella tetraedra</i> (Savigny, 1826)	42	5
2	<i>Stylaria lacustris</i> (Linnaeus, 1767)	33	2
3	<i>Oligochaeta</i> gen. spp.	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 43	410
Класс Hirudinea Отр. Rhynchobdellida Сем. Glossiphoniidae			
4	<i>Glossiphonia concolor</i> (Apathy, 1888)	11	1
5	<i>Glossiphonia heteroclita</i> (Linnaeus, 1761)	16	1
6	<i>Helobdella stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	16	3
Сем. Erpobdellidae			
7	<i>Erpobdella octoculata</i> (Linnaeus, 1758)	10, 16	3
<b>Тип ARTROPODA</b> Класс Crustacea Отр. Isopoda Сем. Asellidae			
1	<i>Asellus aquaticus</i> (Linnaeus, 1758)	1, 3, 4, 10, 11, 13, 15, 16, 22, 23, 24, 30, 31, 33, 35, 36, 40, 41, 42	547
Отр. Amphipoda Сем. Gammaridae			
2	<i>Gammarus lacustris</i> Sars, 1863	8, 14	74
3	<i>Synurella ambulans</i> (F. Müller, 1846)	4, 11, 12, 13, 16, 33, 34, 36, 40, 41	67
Класс Arachnida Отр. Araneae Сем. Tetragnathidae			
4	<i>Tetragnatha extensa</i> (Linnaeus, 1758)	14, 19, 26	3
Сем. Agelenidae			
5	<i>Argyroneta aquatica</i> (Clerck, 1757)	26, 34	5
6	<i>Araneae</i> gen. spp.	13	1
Отр. Trombidiformes			
7	<i>Hydracarina</i> gen. spp.	2, 3, 4, 5, 13, 19, 28, 37, 43	15
Класс Insecta Отр. Collembola Сем. Poduridae			
8	<i>Podura aquatica</i> (Linnaeus, 1758)	3	1
Сем. Isotomidae			
9	<i>Isotoma viridis</i> Bourlet, 1839	3, 27, 38	6
10	<i>Isotomurus palustris</i> (F. Müller, 1776)	26	1

Продолжение таблицы

№ п/п	Таксон, вид	Изученные источники	Всего, экз.
Отр. Plecoptera Сем. Nemouridae			
11	<i>Amphinemura standfussi</i> (Ris, 1902)	6, 21, 24, 31, 37	50
12	<i>Nemurella pictetii</i> (Klapálek, 1900)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37	1339
13	<i>Nemoura cinerea</i> (Retzius, 1783)	10, 11, 13, 21, 22, 36	15
Сем. Leuctridae			
14	<i>Leuctra digitata</i> Kempny, 1899	31, 37	70
15	<i>Leuctra nigra</i> (Olivier, 1811)	2, 14, 25	17
16	<i>Leuctra</i> sp.	8, 14, 24, 25	8
Отр. Ephemeroptera Сем. Baetidae			
17	<i>Baetis muticus</i> (Linnaeus, 1758)	8	11
18	<i>Baetis vernus</i> Curtis, 1834	8, 37	2
19	<i>Baetis tracheatus</i> Keffermüller et Machel, 1967	3, 19, 21	59
20	<i>Baetis</i> sp.	1	1
Сем. Leptophlebiidae			
21	<i>Paraleptophlebia cincta</i> (Retzius, 1783)	14	1
Сем. Caenidae			
22	<i>Caenis horaria</i> (Linnaeus, 1758)	16	3
Отр. Trichoptera Сем. Polycentropodinae			
23	<i>Plectrocnemia conspersa</i> (Curtis, 1834)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 17, 21, 34, 35, 37, 38	51
24	<i>Plectrocnemia</i> sp.	3	1
Сем. Limnephilidae			
25	<i>Anabolia</i> sp.	1, 2, 10, 11, 21,	17
26	<i>Chaetopteryx</i> sp.	2, 3, 4, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 31, 31	331
27	<i>Drusus annulatus</i> (Stephens, 1837)	26, 28, 35	13
28	<i>Halesus digitatus</i> von Paula Schrank, 1781	1, 6, 11, 13, 17	14
29	<i>Grammotaulius nigropunctatus</i> (Retzius, 1783)	43	1
30	<i>Limnephilus rhombicus</i> (Linnaeus, 1758)	5, 10	3
31	<i>Potamophylax rotundipennis</i> (Brauer, 1857)	1, 6, 11, 12, 15	7
32	<i>Limnephilus</i> sp.	16	1
Сем. Brachycentridae			
33	<i>Brachycentrus subnubilus</i> Curtis, 1834	1, 2, 5	20
34	<i>Micrasema setiferum</i> (Pictet, 1834)	28, 30, 31	11
Сем. Sericostomatidae			
35	<i>Notidobia ciliaris</i> (Linnaeus, 1761)	2, 6, 31	8
36	<i>Sericostoma personatum</i> (Kirby et Spence, 1826)	2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 34	44
Сем. Beraeidae			
37	<i>Beraea pullata</i> Curtis, 1834	8, 15, 17, 19, 20, 24	37
Сем. Hydroptilidae			
38	<i>Oxyethira</i> sp.	43	1
Отр. Heteroptera Сем. Nepidae			
39	<i>Nepa cinerea</i> Linnaeus, 1758	42	1
Сем. Mesoveliidae			
40	<i>Mesovelia furcata</i> Mulsant et Rey, 1852	43	1
Сем. Gerridae			
41	<i>Gerris argentatus</i> Schummel, 1832	15	2
Отр. Coleoptera Сем. Haliplidae			
42	<i>Haliphus heydeni</i> Wehncke, 1875	36, 42	3

Окончание таблицы

№ п/п	Таксон, вид	Изученные источники	Всего, экз.
43	<i>Haliphus lineaticollis</i> (Marsham, 1802)	29	1
44	<i>Haliphus</i> sp.	40	1
Сем. Dytiscidae			
45	<i>Agabus guttatus</i> (Paykull, 1798)	1, 2, 24, 26, 31, 32	6
46	<i>Agabus paludosus</i> (Fabricius, 1801)	8, 33	2
47	<i>Hydroporus discretus</i> Fairmaire, 1859	28	2
48	<i>Hydroporus erythrocephalus</i> (Linnaeus, 1758)	42	1
49	<i>Hydroporus palustris</i> (Linnaeus, 1761)	41, 42	2
50	<i>Dytiscidae</i> gen. spp.	2, 3, 12, 13, 17, 19, 21, 23, 27, 31, 32, 37, 40, 41, 42	43
Сем. Hydrophilidae			
51	<i>Anacaena lutescens</i> (Stephens, 1829)	7, 11, 13, 43	5
52	<i>Chaetarthria seminulum</i> (Herbst, 1797)	27	1
53	<i>Hydrobius fuscipes</i> (Linnaeus, 1758)	40, 41	2
54	<i>Laccobius bipunctatus</i> (Fabricius, 1775)	42	2
Сем. Spercheidae			
55	<i>Spercheus emarginatus</i> (Schaller, 1783)	41, 42	2
Сем. Hydraenidae			
56	<i>Hydraena palustris</i> Erichson, 1837	17	1
57	<i>Limnebius truncatellus</i> (Thunberg, 1794)	27	1
58	<i>Ochthebius minimus</i> (Fabricius, 1792)	43	1
Сем. Helophoridae			
59	<i>Helophorus aquaticus</i> (Linnaeus, 1758)	34, 43	3
60	<i>Helophorus minutus</i> Fabricius, 1775	34	1
61	<i>Helophorus</i> sp.	3, 40	3
Сем. Elmidae			
62	<i>Elmidae</i> gen. spp.	4	1
Сем. Scirtidae			
63	<i>Elodes</i> sp.	1, 2, 3, 6, 12, 15, 18, 20, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 33, 34, 35, 37	201
Сем. Chrisomelidae			
64	<i>Donacia</i> sp.	6, 23	2
Отр. Lepidoptera Сем. Crambidae			
65	<i>Cataclysta lemnata</i> (Linnaeus, 1758)	38, 40	3
Отр. Diptera			
66	<i>Ceratopogonidae</i> gen. spp.	1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 25, 28, 29, 39	111
67	<i>Chaoboridae</i> gen. spp.	7, 9	9
68	<i>Chironomidae</i> gen. spp.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43	2217
69	<i>Culicidae</i> gen. spp.	7, 9, 42, 43	170
70	<i>Dixidae</i> gen. spp.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 16, 20, 26, 37, 39	340
71	<i>Limoniidae</i> gen. spp.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 37, 39, 43	71
72	<i>Ptychopteridae</i> gen. sp.	1, 8, 13, 21, 28	74
73	<i>Simuliidae</i> gen. spp.	6, 9, 21, 26, 31, 33, 37	25
74	<i>Stratiomyiidae</i> gen. spp.	17, 26, 29	5
75	<i>Tabanidae</i> gen. spp.	4, 18, 19, 26, 27, 28, 29, 30, 39, 40	13

Примечание. Географическое расположение и координаты родников указаны в тексте.

Второй по видовому богатству и численности таксономической группой оказались водные моллюски – 20 НОТ (19,2 % от всех выявленных водных беспозвоночных животных и 12,0 % от всех животных).

Видовое богатство и численность остальных изученных таксономических групп были относительно небольшими.

Наибольшее количество водных беспозвоночных (22 НОТ) было отмечено в родниках в окр. н. п. Беларучи (Логойский р-н) и н. п. Мурованка (Логойский р-н), наименьшее (4 НОТ) – в источнике в окр. н. п. Нивки (Логойский р-н) (рис. 1).

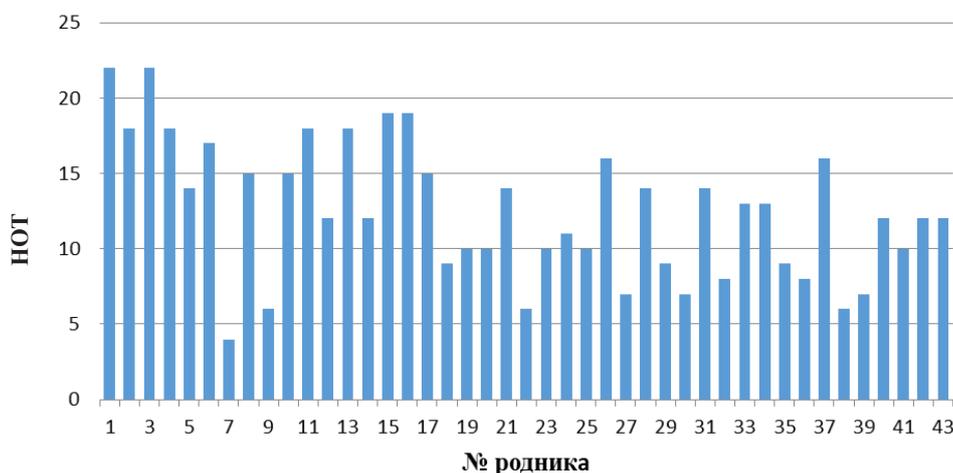


Рис. 1. Число НОТ водных беспозвоночных животных, выявленных в родниковых комплексах Минской области (географическое расположение и координаты изученных родников указаны в тексте)

Fig. 1. Number of LDT aquatic invertebrates identified in the spring complexes of the Minsk region (geographical location and coordinates of the studied springs are indicated in the text)

Следует отметить, что среднее количество выявленных таксономических единиц водных беспозвоночных для родника Минской области составило 12–13 видов.

Наибольшее количество водных беспозвоночных было зарегистрировано в роднике в окр. н. п. Забродье Смолевичского района (558 экземпляров, или 7,68 % от всех выявленных водных беспозвоночных) и в источнике н. п. Карабаны Мядельского района (521 экз., или 7,17 %), наименьшее – в источнике в окр. н. п. Чырвоная Смена Дзержинского района (32 экз., или 0,44 % от выявленных гидробионтов) (рис. 2).



Рис. 2. Численность представителей макрозообентоса, выявленных в родниковых комплексах Минской области (географическое расположение и координаты изученных родников указаны в тексте)

Fig. 2. Number of representatives of macrozoobenthos identified in the spring complexes of the Minsk region (geographical location and coordinates of the studied springs are indicated in the text)

Средняя численность водных беспозвоночных животных в изученных родниках составила 205 экз.

Оценивая выявленный видовой состав изученных родников Минской области, следует отметить, что наиболее многочисленными оказались личинки веснянки *Nemurella pictetii* (Klapálek, 1900) – 1339 экз. (18,43 % от общего количества всех выявленных гидробионтов). Этот вид имел также высокую встречаемость – он был обнаружен в 27 родниках (62,79 % от всех изученных источников). Этот вид имеет транспалеарктический ареал и распространен от Западной Европы до Монголии, является видом-индикатором родниковых экосистем и проявляет кренофильные свойства [6].

Наиболее часто встречаемым видом являлся водный моллюск *Pisidium personatum* Malm, 1855, обнаруженный в 28 родниках (65,11 %), его численность составила 369 экз. (5,07 %). Этот вид встречается в основном в родниках, является региональным кренобионтом и видом-индикатором родниковых экосистем.

Для 19 (44,19 %) родников была характерна относительно высокая численность равноногого рака *Asellus aquaticus* (Linnaeus, 1758) – 547 экз. (7,53 % от всех коллектированных гидробионтов). Этот вид имеет эврибионтные свойства, благодаря которым обитает практически во всех типах континентальных текущих и стоячих водоемов Беларуси и Европы.

Среди обитателей родниковых вод Минской области выявлены виды, встречающиеся в горных водоемах или имеющие ареалы в арктических областях Европы. К ним относятся планария *Crenobia alpina* (Dana, 1766) и плавунец *Agabus guttatus* (Paykull, 1798). Ближайшие известные места обитания *Crenobia alpina* (Dana, 1766) – горные ручьи и источники Центральной Европы. *Crenobia alpina* проявляет кренофильные свойства, а также является интерстициальным видом. Эта планария может обитать в водоемах с температурой воды не выше 15,0 °C [7]. *Agabus guttatus* (Paykull, 1798) из ближайших к Беларуси мест отмечен в Польше и Украине, где населяет горные ручьи, изредка олиготрофные высокогорные озера, на равнинах встречается только в родниковых экосистемах [8–10]. В европейской части России отмечен в холодных озерах Карелии. Учитывая распространение и экологическую предрасположенность, можно предположить, что данные виды могут являться реликтами холодовой ледниковой фауны, а родники, таким образом, для них – рефугиумы.

Важной природоохранной особенностью изученных родников Минской области является обитание в них охраняемых видов животных, внесенных в Красную книгу Республики Беларусь и Красные списки ряда стран Западной Европы. К ним относится бокоплав *Synurella ambulans* (F. Müller, 1846), включенный в Приложение к Красной книге Республики Беларусь [11] как требующий дополнительного изучения и внимания в целях профилактической охраны (категория охраны DD). Это ракообразное, являясь древне-пресноводным видом североамериканского происхождения, пережило ледниковую эпоху благодаря проникновению в подземные воды. В Евразии все виды рода *Synurella* не заходят выше 55° с. ш. [12]. Следует отметить, что присутствие этого вида в экосистеме часто указывает на родниковый тип питания водоема [13]. Синурелла охраняется также в Чехии, категория охраны VU [14].

В Красные списки ряда стран Европы входят: *Crenobia alpina* (Dana, 1766); *Pisidium amnicum* O. F. Müller, 1774; *Physa fontinalis* (Linnaeus, 1761); *Anisus spinorbis* (Linnaeus, 1758); *Synurella ambulans* (F. Müller, 1846); *Amphinemura standfussi* (Ris, 1902); *Plectrocnemia conspersa* (Curtis, 1834); *Brachycentrus subnubilus* Curtis, 1834; *Micrasema setiferum* (Pictet, 1834); *Halesus digitatus* von Paula Schrank, 1781; *Notidobia ciliaris* (Linnaeus, 1761); *Sericostoma personatum* (Spence, 1826); *Beraea pullata* (Curtis, 1834) [14–21].

Таким образом, богатая фауна водных беспозвоночных родников Минской области представлена редкими и охраняемыми видами не только в Беларуси, но и в Европе.

**Заключение.** Всего в изученных родниках Минской области идентифицировано 104 низших определяемых таксона представителей макрозообентосного и плейстонного комплексов, относящихся к 4 типам водных беспозвоночных животных: Platyhelminthes – 2 НОТ; Mollusca – 20; Annelida – 7, Arthropoda – 75 НОТ. До вида было идентифицировано 75 таксономических элементов.

Среднее количество выявленных водных беспозвоночных в изученных родниках Минской области составило 12–13 видов, а численность – 205 экземпляров.

Оценивая в целом экологическую предрасположенность комплексов выявленных водных беспозвоночных, необходимо отметить, что в исследованных родниках обитают как эврибионтные виды, встречающиеся практически во всех типах водоемов в Беларуси, так и стенобионтные виды. Среди последних выделяются обитатели подземных грунтовых вод (интерстициальные виды); холодолюбивые виды, живущие только в родниках (региональные кренобионты); виды, обитающие преимущественно в родниках (кренофилы), но встречающиеся и в других водоемах со сходными температурными условиями.

Родники Минской области являются своеобразными рефугиумами для ряда видов, населяющих водоемы горных систем Европы.

В источниках обитают редкие и охраняемые виды водных беспозвоночных животных, которые являются одним из важных компонентов общего биологического разнообразия водоемов Беларуси.

**Благодарности.** Исследование выполнено при поддержке государственной научно-технической программы «Разработка и освоение инновационных технологий комплексного использования и глубокой переработки природных ресурсов, определение предельных антропогенных нагрузок на хозяйственно значимые экосистемы» на 2016–2020 годы («Природопользование и экологические риски») подпрограммы 01 «Рациональное природопользование и инновационные технологии глубокой переработки природных ресурсов» по заданию П.4.6. «Изучить биологическое и ландшафтное разнообразие уникальных родниковых экосистем Беларуси, определить гидрохимические характеристики, историко-культурное значение и разработать научные и технико-экономические обоснования объявления родников памятниками природы».

**Acknowledgements.** The study was carried out with support of the state scientific and technical program “Development and development of innovative technologies for integrated use and deep processing of natural resources, determination of maximum anthropogenic loads on economically significant ecosystems” for 2016–2020 (“Nature management and environmental risks”), subprogram 01 “Rational environmental management and innovative technologies for deep processing of natural resources” according to assignment P.4.6. “To study the biological and landscape diversity of unique spring ecosystems in Belarus, determine hydrochemical characteristics, historical and cultural significance and develop scientific and feasibility studies for declaring springs natural monuments.”

### Список использованных источников

1. Khmeleva, N. The macroinvertebrate fauna of some Byelorussian, Karelian, and Altaian springs and its relation with certain factors / N. Khmeleva, A. Nesterovich, S. Czachorowski // *Acta Hydrobiol.* – 1994. – Vol. 36, N 1. – P. 75–90.
2. Nesterovich, A. Studies of the fauna of Belarusian springs / A. Nesterovich // *Crunoecia.* – 1996. – N 5. – P. 79–85.
3. Фауна водных беспозвоночных Болцковского родника в Национальном парке «Нарочанский» (Беларусь) / М. Мороз [и др.] // *Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody.* – 2001. – Vol. 20, N 4. – S. 67–74.
4. Мороз, М. Д. Фауна водных беспозвоночных родникового комплекса «Иканы» / М. Д. Мороз, Ю. Г. Гигиняк, В. В. Вежновец // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География.* – 2002. – № 3. – С. 46–51.
5. Баканов, А. И. Использование характеристик разнообразия зообентоса для мониторинга состояния пресноводных экосистем / А. И. Баканов // *Мониторинг биоразнообразия / под общ. ред. В. Е. Соколова [и др.].* – М., 1997. – С. 278–282.
6. Мороз, М. Д. Каталог поденок (Ephemeroptera), веснянок (Plecoptera) и ручейников (Trichoptera) Беларуси / М. Д. Мороз, Т. П. Липинская. – Минск: Беларус. навука, 2014. – 315 с.
7. Reynoldson, T. B. A key to the British species of freshwater triclads / T. B. Reynoldson. – *Ambleside: Freshwater Biol. Assoc.*, 1967. – 28 p. – (Scientific publication (Freshwater Biological Association); no. 23).
8. Зайцев, Ф. А. Плавунцовые и вертячки. Фауна СССР. Насекомые жесткокрылые / Ф. А. Зайцев. – М.; Л.: АН СССР, 1953. – Т. 4. – 376 с.
9. Кирейчук, А. Г. Семейство Dytiscidae (Плавунцы) (имаго, куколки) // *Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / Зоол. ин-т Рос. акад. наук.* – СПб., 2001. – Т. 5: Высшие насекомые / В. Д. Иванов [и др.]. – С. 79–369.
10. Galewski, K. *Chrzaszczce (Coleoptera) Rodziny Plywakowate (Dytiscidae), Flisakowate (Halipilidae), Morkzelicowate (Hydrobiidae), Kretakowate (Gyrinidae).* Fauna Slodkowodna Polska / K. Galewski, E. Tranda. – Warszawa; Poznan: PWN, 1978. – 396 s.
11. Красная книга Республики Беларусь. Животные / гл. ред. И. М. Кочановский [и др.]. – Минск: Беларус. энцыкл., 2015. – 320 с.
12. Дедю, И. И. Амфиподы пресных и солоноватых вод юго-запада СССР / И. И. Дедю. – Кишинев: Штиинца, 1980. – 224 с.
13. Бентосные животные родниковых экосистем Национального парка «Браславские озера» / М. Д. Мороз [и др.] // *Вест. НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2007. – № 1. – С. 100–106.

14. Beran L., Juříčková L., Horsak M. Mollusca (měkkyši) // Červený seznam ohrožených druhů České republiky / L. Beran, L. Juříčková, M. Horsak. – Praha, 2005. – S. 69–74.
15. Chvojka, P. Trichoptera (chrosici) / P. Chvojka, E. Novak, E. Sedlak // Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí / ed.: J. Farač, D. Král, M. Škorpík. – Praha, 2005. – S. 160–180.
16. Ďuriš, S. Amphipoda (různonožci) / S. Ďuriš, I. Horka // Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí / ed.: J. Farač, D. Král, M. Škorpík. – Praha, 2005. – S. 122–124.
17. Helešic, J. Plecoptera (pošvatky) / J. Helešic, T. Soldan, J. Špaček // Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí / ed.: J. Farač, D. Král, M. Škorpík. – Praha, 2005. – S. 128–131.
18. Klima, F. Rote Liste der Kocherfliegen (Trichoptera), in Binot / F. Klima // Rote Liste gefährdeter Tiere Deutschlands.- Schriftenreihe für Landschaftspflege und Naturschutz / eds: M. Bless, R. Boye. P. Gruttke, H. P. Pretscher. – 1998. – Vol. 55. – P. 112–118.
19. Kubiček, F. Opravilova / F. Kubiček // Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí / ed.: J. Farač, D. Král, M. Škorpík. – Praha, 2005. – S. 45–48.
20. Malicky, H. Rote Liste der gefährdeten Kocherfliegen (Trichoptera) Österreichs / H. Malicky // Rote Liste gefährdeter Tiere Österreichs. Im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit und Umweltschutz. Wien / ed. J. Gepp. – 1994. – P. 149–150.
21. Szczęsny, B. Trichoptera Chruściki / B. Szczęsny // Czerwona lista zwierząt ginących i zagrożonych w Polsce / ed.: Z. Głowaciński. – Kraków, 2002. – S. 76–79.

## References

1. Khmeleva N., Nesterovich A., Czachorowski S. The macroinvertebrate fauna of some Byelorussian, Karelian, and Altaian springs and its relation with certain factors. *Acta Hydrobiologica*, 1994, vol. 36, no. 1, pp. 75–90.
2. Nesterovich A. Studies of the fauna of Belarusian springs. *Crunoecia*, 1996, no. 5, pp. 79–85.
3. Moroz M., Golubev A., Giginyak Yu., Mukhin Yu. Fauna of aquatic invertebrates of the Boltsik spring in the Narochansky National Park (Belarus). *Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody*, 2001, vol. 20, no. 4, pp. 67–74 (in Russian).
4. Moroz M. D., Giginyak Yu. G., Vezhnovets V. V. Fauna of aquatic invertebrates of the spring complex “Icany”. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya* [Bulletin of the Belarusian State University. Episode 2, Chemistry. Biology. Geography], 2002, no. 3, pp. 46–51 (in Russian).
5. Bakanov A. I. Using the characteristics of the diversity of zoobenthos for monitoring the state of freshwater ecosystems. *Biodiversity monitoring*. Moscow, 1997, pp. 278–282 (in Russian).
6. Moroz M. D., Lipinskaya T. P. *Catalogue of the mayflies (Ephemeroptera), stoneflies (Plecoptera) and caddisflies (Trichoptera) of Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2014. 315 p. (in Russian).
7. Reynoldson T. B. *A key to the British species of freshwater triclads*. Ambleside, Freshwater Biological Association, 1967. 28 p.
8. Zaitsev F. A. *Plavuntsovye and vertyachki. Fauna in the USSR. Insects of Coleoptera*. Moscow, Leningrad, USSR Academy of Sciences, 1953, vol. 4. 376 p. (in Russian).
9. Kireichuk A. G. Family Dytiscidae (Plavuncy) (imagos, pupae). *Key to freshwater invertebrates of Russia and adjacent lands. Vol. 5. Higher insects*. Saint-Petersburg, 2001, pp. 79–369 (in Russian).
10. Galewski K., Tranda E. *Chraszczce (Coleoptera) Rodziny Plywakowate (Dytiscidae), Flisakowate (Halipilidae), Morkzelicowate (Hydrobiidae), Kretakowate (Gyrinidae). Fauna Slodkowodna Polska*. Warszawa, Poznan, PWN, 1978. 396 p.
11. Kochanovskii I. M. (ed.). *The Red Book of the Republic of Belarus. Animals*. Minsk, Belaruskaya ehntsyklapedyya Publ., 2015. 320 p. (in Russian).
12. Dedyu I. I. *Amphipods of fresh and brackish waters of the South-West of the USSR*. Kishinev, Shtiintsa Publ., 1980. 224 p. (in Russian).
13. Moroz M. D., Baichorov V. M., Tishchikov I. G., Toropov V. V. Benthic animals of spring ecosystems of Braslav Lakes National Park. *Vestnik Natsyyanalnai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2007, no. 1, pp. 100–106 (in Russian).
14. Beran L., Juříčková L., Horsak M. Mollusca (měkkyši). *Červený seznam ohrožených druhů České republiky*. Praha, 2005, pp. 69–74.
15. Chvojka P., Novak E., Sedlak E. *Trichoptera (chrosici). Červený seznam ohrožených druhů České republiky*. Praha, 2005, pp. 160–180.
16. Ďuriš S., Horka I. Amphipoda (různonožci). *Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí*. Praha, 2005, pp. 122–124.
17. Helešic J., Soldan T., Špaček J. Plecoptera (pošvatky). *Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí*. Praha, 2005, pp. 128–131.
18. Klima F. Rote Liste der Kocherfliegen (Trichoptera). *Rote Liste gefährdeter Tiere Deutschlands*. Schriftenreihe für Landschaftspflege und Naturschutz, 1998, vol. 55, pp. 112–118.
19. Kubiček F., Opravilova V. Tricladida (trojvětvevní). *Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí*. Praha, 2005, pp. 45–48.
20. Malicky H. Rote Liste der gefährdeten Kocherfliegen (Trichoptera) Österreichs. *Rote Liste gefährdeter Tiere Österreichs. Im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit und Umweltschutz*. Wien, 1994, pp. 149–150.
21. Szczęsny B. Trichoptera Chruściki. *Czerwona lista zwierząt ginących i zagrożonych w Polsce*. Kraków, 2002, pp. 76–79.

**Информация об авторах**

*Байчоров Владимир Мухтарович* – д-р биол. наук, заведующий сектором. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vbaitch@gmail.com

*Мороз Михаил Дмитриевич* – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mdmoroz@bk.ru

*Гигиняк Юрий Григорьевич* – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: antarctida\_2010@mail.ru

*Гигиняк Ирина Юрьевна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: i.giginyak@gmail.com

*Куликова Елена Александровна* – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Elen.Kulikova@gmail.com

*Корзун Егор Викторович* – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natrix109@gmail.com

**Information about the authors**

*Vladimir M. Baitchorov* – D. Sc. (Biol.), Head of the Department. Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vbaitch@gmail.com

*Michael D. Moroz* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mdmoroz@bk.ru

*Yuri G. Hihiniak* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antarctida\_2010@mail.ru

*Irina Ju. Giginyak* – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: i.giginyak@gmail.com

*Alena A. Kulikova* – Senior Researcher. Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Elen.Kulikova@gmail.com

*Jahor V. Korzun* – Senior Researcher. Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natrix109@gmail.com

П. В. Кузмицкая, Е. С. Королева, О. Ю. Урбанович

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

## ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СТРЕСС-АССОЦИИРОВАННЫЕ БЕЛКИ ЯБЛОНИ

**Аннотация.** У растений стресс-ассоциированные белки (SAP, stress-associated proteins) участвуют в ответе на воздействие неблагоприятных биотических и абиотических факторов. С целью изучения влияния засухи на изменение уровня экспрессии SAP у яблони и их вовлеченности в стрессовый ответ проведен анализ уровней экспрессии 14 генов, отнесенных к этому семейству, с помощью количественной ПЦР (qPCR). Показано их участие в геноме подвоя яблони сорта ММ-106 при стрессовом ответе на засуху.

При этом к 4-му часу воздействия засухи наблюдалась тенденция к повышению экспрессии данных генов, а к 24-му часу отмечалось ее снижение. Сравнение этих данных с результатами, полученными при моделировании засухи в более мягких условиях, показало, что при моделировании засухи в более жестких условиях экспрессия у большего количества генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, повышается и имеет место более выраженный ответ. Оценка влияния степени идентичности нуклеотидных последовательностей этих генов на сходство их профилей экспрессии при воздействии засухи не выявила непосредственной зависимости между первичной структурой генов и характером их экспрессии.

В структуре стресс-ассоциированных белков, кодируемых генами, которые наиболее сильно реагируют на засуху (например, у *Malus*, *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, *Cucumis sativus*), чаще всего по сравнению с другими типами доменов цинковых пальцев встречается домен типа A20-AN1. Анализ сходства последовательностей стресс-ассоциированных белков и уровней экспрессии кодирующих их генов в условиях засухи у разных видов растений (яблони, хлопчатника, томата и огурца) позволяет предположить, что у каждого вида эволюция механизмов адаптации, включающих гены, кодирующие SAP, происходила независимо и, вероятнее всего, после выделения этих видов от общего предка. Полученные результаты позволяют уточнить роль отдельных генов, кодирующих SAP, в формировании стрессового ответа яблони на воздействие засухи.

**Ключевые слова:** SAP, *Malus*, домен типа цинковые пальцы A20-AN1, экспрессия, qPCR, стресс

**Для цитирования:** Кузмицкая, П. В. Влияние дефицита влаги на экспрессию генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки яблони / П. В. Кузмицкая, Е. С. Королева, О. Ю. Урбанович // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 36–46. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-36-46>

Polina V. Kuzmitskaya, Katsiaryna S. Karaleva, Oksana Yu. Urbanovich

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

## EFFECT OF MOISTURE DEFICIENCY ON THE APPLE STRESS-ASSOCIATED PROTEINS EXPRESSION LEVEL

**Abstract.** In plants, stress-associated proteins (SAP) are involved in response to adverse biotic and abiotic factors. In order to study the drought effect on changes in the SAP expression level in apple trees and their involvement in stress response, an expression level of fourteen genes belonging to this family was analyzed using qPCR. Their participation in a stress response to drought in the genome of the MM-106 apple tree rootstock was shown. At that, the genes demonstrated a tendency to increase their expression by the fourth hour of drought exposure followed by its decrease by the twenty-fourth hour.

A comparison of the data obtained during the described experiment with the data obtained when modeling drought under milder conditions showed that under more severe drought conditions, an expression of a greater number of gene encoding stress-associated proteins increases, and a more pronounced response occurs. Evaluation of the effect of an identity degree of nucleotide sequences of gene encoding stress-associated proteins on the similarity of their expression profiles under drought exposure did not reveal any direct relationship between the primary structure of genes and the nature of their expression.

In the structure of stress-associated proteins encoded by the genes most strongly response to drought in *Malus*, *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, and *Cucumis sativus*, the A20-AN1 type domain occurs more frequently than other types of zinc finger domains. Analysis of the similarity of stress-associated protein sequences and the expression levels of genes encoding them under drought conditions in different plant species (apple, cotton, tomato, and cucumber) suggests that in each species, the evolution of adaptation mechanisms, including SAP encoding genes, occurred independently and, most likely,

after separation of those species from their common ancestor. The results obtained will make it possible to clarify the role of individual genes, encoding SAP, in the formation of an apple stress response to the drought effect.

**Keywords:** SAP, *Malus*, A20-AN1 zinc finger domain, expression, qPCR, stress

**For citation:** Kuzmitskaya P. V., Karaleva K. S., Urbanovich O. Yu. Effect of moisture deficiency on the apple stress-associated protein expression level. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 36–46 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-36-46>

**Введение.** Неблагоприятные абиотические факторы, такие как экстремальные температуры, засоление, засуха, оказывают значительное влияние на рост и развитие растений, снижают их продуктивность и могут угрожать продовольственной безопасности [1]. Чтобы противостоять воздействию различных факторов окружающей среды и адаптироваться к ним, растения вырабатывают сложные молекулярные механизмы, которые регулируют уровни транскрипции ряда генов и, таким образом, дополнительно контролируют сигнальные сети, участвующие в стрессовых ответах. Установлено, что при передаче сигналов ответа на стресс включается большое количество чувствительных к стрессу генов [2–5], кодирующих функциональные и регуляторные белки. К ним относятся белки, непосредственно участвующие в защите клеток от повреждений и в поддержании их жизнеспособности, такие как шапероны, белки позднего эмбриогенеза, осмотины, белки-антифризы, мРНК-связывающие белки, детоксификационные ферменты, транспортеры, белки, задействованные в транспортировке липидов, ферменты, участвующие в биосинтезе осмопротекторов и др., а также транскрипционные факторы [6]. Среди последних у яблони известны NAC [7], MYB [8], DREB [9], SnRK [10].

В последние годы SAP (stress-associated proteins) признаны одними из ключевых молекулярных факторов, которые участвуют в опосредованной регуляции развития растений и формировании стрессовых реакций [11]. С помощью технологии высокопроизводительного секвенирования генома и последующего биоинформатического анализа полученных последовательностей удалось идентифицировать гены, кодирующие SAP, у ряда растений: *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* [12], *Gossypium hirsutum* [13], *Solanum lycopersicum* [14], *Populus euphratica* [15], *Ricinus communis* [16] и др. SAP относят к семейству белков, содержащих в своей структуре домены типа цинковых пальцев: N-концевой A-20 домен в комбинации с AN1 доменом и/или Cys2-His2 домен на C-конце [17]. В зависимости от наличия A20, AN1 или C2H2 доменов цинковых пальцев различают пять типов представителей семейства SAP. К типу I относят A20-AN1, в структуре домена которого имеется один A20 и один AN1 домен типа цинковых пальцев; к типу II – AN1, который содержит только один AN1 домен типа I; к типу III – AN1-AN1, который содержит два домена AN1 типа II; к типу IV – AN1-AN1-C2H2-C2H2, который содержит два домена AN1 типа II и два домена C2H2; к типу V – AN1-AN1-C2H2, который содержит два домена AN1 типа II и один домен C2H2. Наиболее распространенным типом SAP является A20-AN1 [18].

У растений гены, кодирующие SAP, участвуют в ответе на действие различных абиотических и биотических стрессовых факторов. Так, у риса наблюдается повышенная экспрессия гена *OsSAP1* в ответ на действие засухи, холода, засоления и др. [19]. У тополя *P. euphratica* все гены, кодирующие SAP, отличаются повышенным уровнем экспрессии в ответ на действие засухи, засоления и повышенной температуры [15]. В последнее время данная группа генов активно изучается.

Яблоня является широко культивируемой плодовой культурой во всем мире, поэтому изучение генетических механизмов, обеспечивающих ее устойчивость к стрессовым факторам, имеет не только научное, но и прикладное значение, поскольку может способствовать формированию новых подходов к повышению адаптационной способности создаваемых сортов. Ранее нами идентифицированы гены, кодирующие SAP, в геноме *Malus domestica* сорта Golden Delicious [20]. Параллельно та же работа была проведена Dong с соавт. [21]. Авторы проанализировали профили экспрессии SAP в ответ на действие засухи, которая моделировалась в достаточно мягких условиях путем приостановки полива растений до 8 дней с отбором проб на 0, 4 и 8-е сутки воздействия [21]. При этом экспрессия кодирующих SAP генов в более жестких условиях воздействия не изучалась.

Цель данной работы – анализ профилей экспрессии генов яблони, кодирующих SAP, в моделирующих засуху условиях.

**Материалы и методы исследования.** Аминокислотные последовательности белков SAP были получены из соответствующих баз данных: для *Cucumis sativus* – CuGenDB (<http://cucurbitgenomics.org/>), для *Malus domestica* – GDR (<https://www.rosaceae.org/>), для *Gossypium hirsutum* – Cotton research institute (<https://www.cicr.org.in/>), для *Solanum lycopersicum* – UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей приведенных выше культур осуществляли с помощью MEGA X, применяя алгоритм CLUSTALW [22], филогенетический анализ проводили с помощью MegaX [23], используя метод объединения ближайших соседей.

Исследовали клоновые подвои яблони сорта ММ-106. Данный подвой характеризуется средней морозостойчивостью и низкой устойчивостью к засухе. Подвои выращивали в условиях длинного светового дня 16ч/8ч (день/ночь) при температуре 22 °С. Для изучения экспрессии генов, кодирующих SAP, растения были разделены на две группы, одна из которых, контрольная, находилась в описанных выше условиях, а вторая была подвергнута действию засухи путем помещения сухих корней на фильтровальную бумагу. При этом полив растений не проводили. Каждая группа была представлена тремя деревьями. Отбор листьев осуществляли в 0-й и к 2, 4, 24-му часу. Отбор в 0-й час производили непосредственно после воздействия стрессовых факторов на растения, до этого находившиеся в контрольных условиях. Отобранные листья незамедлительно замораживали в жидком азоте.

**Олигонуклеотиды, используемые в качестве праймеров при постановке ПЦР в режиме реального времени**

**Oligonucleotides used as primers when performing real-time PCR**

Название гена	Праймеры для qRT-PCR
<i>MdSAP1</i> (MD01G1186300)	F: GCAGTTTGCTAAGCCTGCAGCC R: ACCCCTCATTGTCTCAAACCTCCACT
<i>MdSAP2</i> (MD02G1204500)	F: TGACAGAGCGTCCCTGCTGC R: CCATGGCGGACTCTGCCCTC
<i>MdSAP3</i> (MD02G1204600)	F: TGTCACCCTTGACAGAGCGGG R: TTCAGTGCCGCTGTGGTGGT
<i>MdSAP4</i> (MD02G1314600)	F: GCGTCAACAACGCGGCGTC R: TTACGGCAGGTCTCGGCAGC
<i>MdSAP6</i> (MD07G1007300)	F: GCGTCAACAACGCGGCGTC R: CCGCGGACGAAGACGACGAT
<i>MdSAP8</i> (MD07G1258500)	F: GCAGTTTGCTAAGCCTGCAGCC R: CACACTCAGTGAAGCTCC
<i>MdSAP11</i> (MD12G1023200)	F: GATCGCCAGGAGCAACCCGT R: AGATCGACGGTCCGCGTGG
<i>MdSAP12</i> (MD14G1020200)	F: GATCGCCAGGAGCAACCCGT R: TCAGTTCCGCGGACAGCCTG
<i>MdSAP16</i> (MD12G1065100)	F: GAATGGCGGCGGCAGCAG R: CCAACGCGTTTCGGCAAGT
<i>MdSAP17</i> (MD14G1065100)	F: GCGTCGATGGCAGCAGCAAC R: CCAACGCGTTTCGGCAAGT
<i>MdSAP18</i> (MD09G1039300)	F: TTCGCCGGTGCAAGGAGATTC R: GCGGGTAATGGCGTCAGCT
<i>MdSAP19</i> (MD17G1040300)	F: TTCGCCGGTGCAAGGAGATTC R: CGTCGTTGGTGGGGAAGCCT
<i>MdSAP20</i> (MD12G1077300)	F: CCGGGACTACATAATCCCGCCG R: GCGACGTAGCAATGCCTACCCA
<i>MdSAP21</i> (MD14G1070700)	F: AAAACTAGGGCGGCCGTGGC R: GCGACGTAGCAATGCCTACCCA

Примечание. Названия генов даны в соответствии с [20].

Для выделения РНК из замороженных листьев использовали СТАВ-метод [24]. Качество выделенной РНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью прибора NanoDrop (ND-8000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), очистку РНК от ДНК – с применением реактивов DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом. Построение минус-цепи кДНК проводили с помощью RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу.

Ранее в исследовании [20] нами определены гены, к которым были разработаны праймеры (см. таблицу) для постановки qPCR. Оценка эффективности этих праймеров по реакции qPCR на матрице кДНК яблони сорта MM-106 показала, что для каждой пары праймеров она входит в диапазон допустимых значений – 90–110 % [25]. По приведенной выше реакции определена специфичность каждой пары праймеров, а график кривых плавления показал наличие одного острого пика, что гарантирует амплификацию уникального фрагмента кДНК. Реакцию амплификации проводили с помощью прибора CFX96 Real Time System (Bio-Rad, США). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл: qPCRmix-HS SYBR (Евроген) – 4 мкл, праймеры F и R – 1 мкл (5 пмоль/мкл), кДНК – 2 мкл, стерильная деионизированная вода – 12 мкл. Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 95 °C (5 мин), затем 38 циклов при 95 °C (20 с), 58 °C (20 с) и 2 °C (20 с). На каждом цикле происходило считывание флуоресценции красителя SYBR-green. В качестве внутреннего контроля был выбран фактор элонгации *Efl-α* [9]. В качестве отрицательного контроля вместо кДНК использовали равное количество деионизированной воды. Для анализа экспрессии генов, кодирующих SAP, в ответ на действие абиотических стрессовых факторов использовали три биологических повтора в каждом из экспериментальных условий. Подсчет относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли по методу  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  [26].

**Результаты и их обсуждение.** В предыдущей работе [20] нами *in silico* проведена полногеномная идентификация генов, кодирующих SAP, в геноме яблони Golden Delicious. Анализ последовательностей, расположенных непосредственно перед этими генами, позволяет предположить, что экспрессия SAP у яблони, как и у других изученных растений, будет изменяться в ответ на стресс [13–16, 19].

Для оценки изменения уровня экспрессии 14 генов, кодирующих SAP в геноме яблони, в условиях действия стресса, вызванного нехваткой влаги, корневую систему участвовавших в эксперименте растений извлекали из земли. Профили экспрессии генов яблони сорта MM-106 в 0-й и к 2, 4 и 24-му часу воздействия засухи представлены на рис. 1.

Согласно результатам исследования, уровень экспрессии генов, кодирующих SAP, в условиях пересыхания корневой системы растения ко 2-му часу воздействия по сравнению с точкой начала эксперимента повышается: для *MdSAP12* – с 0,16 до 2,96 (в 18,5 раза), для *MdSAP1* – с 0,11 до 0,96 (в 8,7 раза), для *MdSAP19* – с 0,1 до 0,61 (в 6,1 раза), для *MdSAP4* – с 0,76 до 2,36 (в 3,1 раза). При этом у ряда генов уровень экспрессии не изменялся, а у некоторых – снижался (например, у *MdSAP3* – с 2,42 до 0,79). К 4-му часу воздействия засухи для большинства генов было характерно достижение максимального уровня экспрессии. Для генов *MdSAP21*, *MdSAP19*, *MdSAP6*, *MdSAP4*, *MdSAP12*, *MdSAP2*, *MdSAP20* он увеличился (наиболее значительно у *MdSAP6* и *MdSAP4* – в 12,04 и 9,38 раза соответственно) по сравнению с референсным геном *Efl-α*. К 24-му часу воздействия стрессового фактора наблюдалось снижение уровня экспрессии почти для всех исследуемых генов, кроме *MdSAP3*, у которого он снизился к 2-му и 4-му часу воздействия, а на 24-м увеличился в 6,36 раза, что в 2,62 раза больше его уровня в точке начала эксперимента.

Таким образом, наблюдалась тенденция к максимальному увеличению экспрессии генов, кодирующих SAP, к 4-му часу воздействия засухи с последующим ее снижением к 24-му часу. При этом у отдельных генов (например, *MdSAP4*, *MdSAP6*, *MdSAP12*, *MdSAP19*) уровень экспрессии повышался по сравнению со 2-м часом достаточно резко, а у других (например, *MdSAP1*, *MdSAP20*) – не так значительно. Такую скорость накопления транскриптов можно обосновать структурной организацией генов, кодирующих SAP, для которых характерна безинтронная или малоинтронная организация генов у разных видов. Результатом этого является быстрое накопление транскрипта благодаря уменьшению посттранскрипционной обработки [17]. Уровни экспрессии

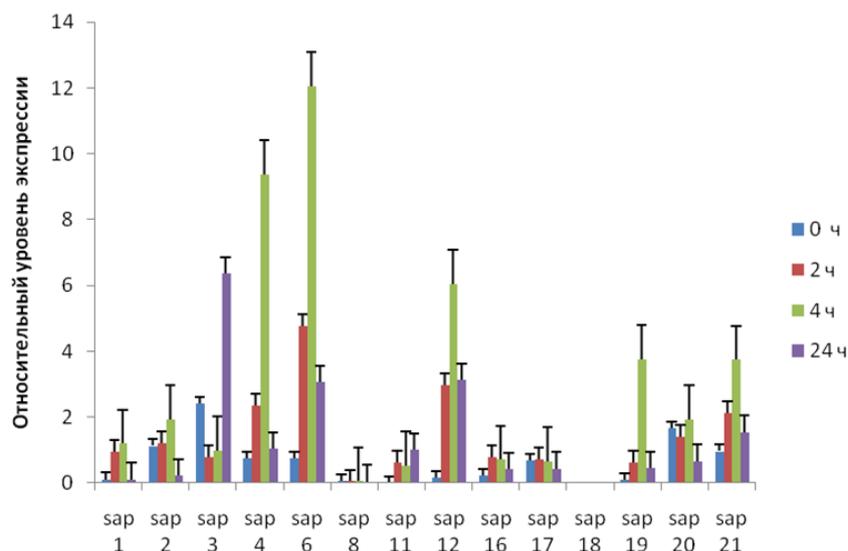


Рис. 1. Профиль экспрессии генов яблони сорта ММ-106, кодирующих SAP, в условиях водного дефицита с точками измерения 0, 2, 4 и 24 ч. Данные нормализованы относительно гена домашнего хозяйства яблони *Ef1-α*.

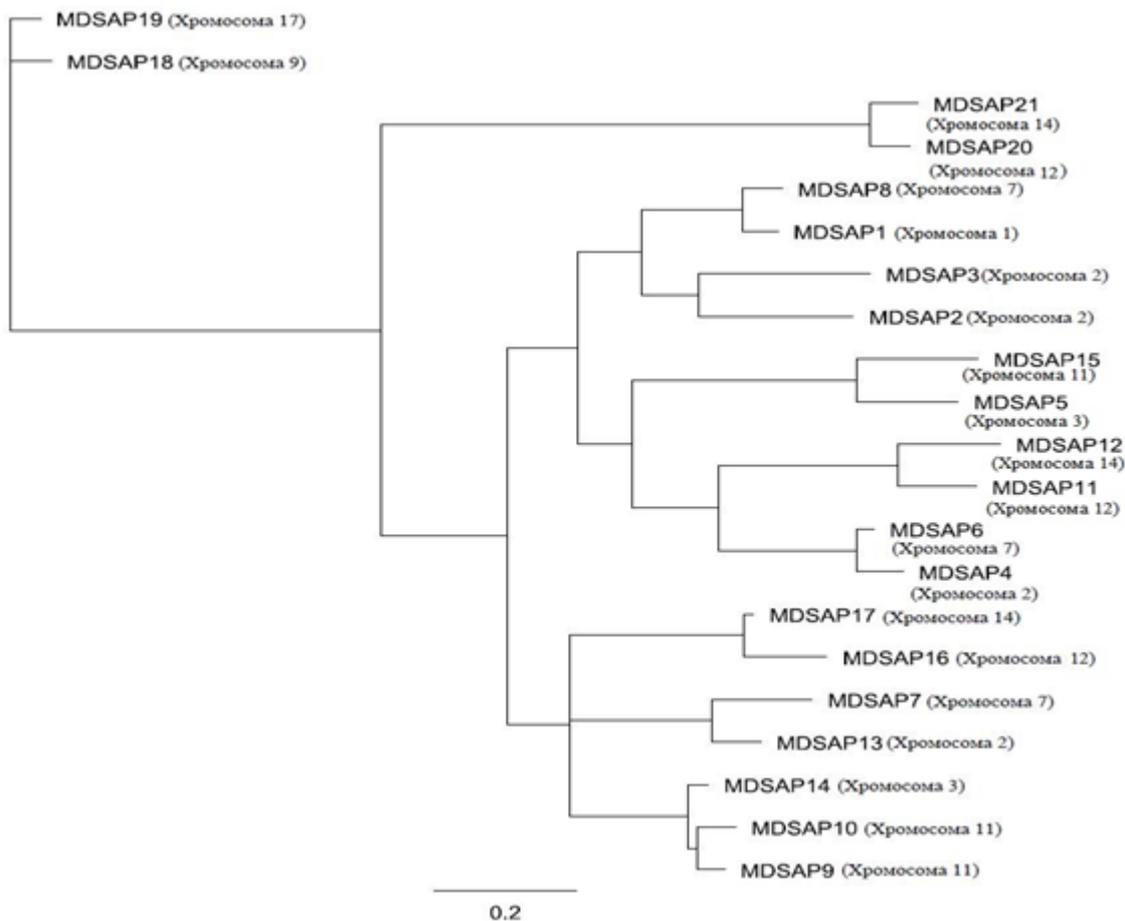
Вертикальные полосы отображают стандартную ошибку среднего. Уровень значимости –  $\alpha = 0,05$

Fig. 1. MdTH gene expression profiles under the drought condition on the MM-106 apple variety with measurement points at 0, 2nd, 4th, and 24th hour. The data were normalised in relation to the apple housekeeping gene *Ef1-α*. The vertical stripes show the standard error of the mean. The significance value is  $\alpha = 0.05$

отдельных генов (например, *MdSAP8*, *MdSAP17*) мало изменялись при воздействии засухи. Один из генов (*MdSAP18*) не экспрессировался ни в одной точке эксперимента.

На следующем этапе работы оценено влияние степени идентичности белковых последовательностей стресс-ассоциированных белков, полученных с помощью трансляции *in silico*, на сходство их профилей экспрессии при воздействии засухи. Филогенетическое древо, отражающее степень идентичности последовательностей, представлено на рис. 2. Филогенетический анализ показал, что среди SAP яблони можно выделить пары последовательностей с высокой степенью идентичности между собой. Таким образом, 14 изучаемых нами генов были разделены на 7 пар.

Следует отметить значительное увеличение экспрессии обоих генов в парах *MdSAP4* и *MdSAP6*, при этом их уровень экспрессии повышался ко 2-му часу эксперимента, резко повышался к 4-му часу и снижался к 24-му часу, оставаясь выше, чем в 0-й точке. В паре *MdSAP20* и *MdSAP21* уровень экспрессии первого гена изменялся незначительно к 2-му и 4-му часу и значительно снижался к 24-му часу по сравнению с первой точкой отбора проб, в то время как у второго гена наблюдалось более значительное повышение уровня экспрессии. В паре *MdSAP18* и *MdSAP19* первый ген не экспрессировался, в то время как *MdSAP19* показал значительное увеличение экспрессии к 4-му часу воздействия засухи. В паре *MdSAP11* и *MdSAP12* уровень экспрессии первого гена был максимальным к 24-му часу воздействия, в то время как уровень экспрессии *MdSAP12* был максимальным к 4-му часу воздействия и снизился к 24-му часу, однако все равно оказался выше уровня в начальной точке эксперимента. В паре *MdSAP1* и *MdSAP8* экспрессия первого гена значительно увеличилась ко 2-му часу, еще немного повысилась к 4-му часу, после чего снизилась и к 24-му часу была такой же, что и в начале эксперимента, в то время как уровень экспрессии *MdSAP8* практически не изменился. В паре генов *MdSAP16* и *MdSAP17* уровень экспрессии первого являлся максимальным ко 2-му часу воздействия, хотя по-прежнему оставался невысоким, а у *MdSAP17* – мало изменялся на протяжении всего эксперимента, кардинальных различий в уровнях экспрессии не обнаружено. В паре *MdSAP2* и *MdSAP3* ген *MdSAP3* показал отличное от всех генов значительное увеличение экспрессии ко 24-му часу воздействия засухи. Таким образом, не наблюдается связи между характером экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки у яблони, в условиях водного дефицита и степенью идентичности их последовательностей.

Рис. 2. Филогенетический анализ последовательностей 14 SAP *Malus domestica*Fig. 2. Phylogenetic tree of 14 SAP *Malus domestica*

Сравнение полученных нами данных об экспрессии генов, кодирующих SAP яблони, в условиях засухи, обусловленной пересыханием корневой системы, с данными, полученными Dong с соавт. [21], при изучении засухи в более мягких условиях (прекращение полива растений на 8 дней) показало, что в смоделированных нами условиях повышенной экспрессии на водный дефицит отреагировало большее количество генов, чем в эксперименте [21]. Следует отметить, что в этих двух экспериментах были использованы разные сорта яблони (подвой MM-106 и сорт Golden Delicious на подвое *M. hupehensis*), что не исключает индивидуальной реакции генотипов. Согласно полученным нами результатам, можно отметить пять кодирующих стресс-ассоциированные белки генов (*MdSAP21*, *MdSAP19*, *MdSAP6*, *MdSAP4*, *MdSAP12*), относительные уровни экспрессии которых превысили значение 2 и составили 3,74; 3,76; 12,04; 9,38; 6,05 соответственно (здесь и далее – классификация генов согласно [20]). В работе Dong с соавт. [21] отмечены повышенные уровни экспрессии для трех генов (*MdSAP7*, *MdSAP21*, *MdSAP19*), относительные значения которых составили приблизительно 5,5; 3,5; 2,2 соответственно [21].

Таким образом, изменение условий эксперимента по моделированию засухи от приостановки полива до пересыхания корневой системы растений, которое оказало губительное воздействие на растения (яблоням так и не удалось восстановиться при возобновлении полива), привело к повышению экспрессии генов *MdSAP3*, *MdSAP4*, *MdSAP12*, *MdSAP6*, *MdSAP19*, *MdSAP21*. Следует отметить, что в более жестких условиях засухи экспрессия у большего количества генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, повышается и имеет место более выраженный ответ по сравнению с более мягкими условиями.

На заключительном этапе работы проведена оценка того, насколько уровни экспрессии в стрессовых условиях генов-гомологов, кодирующих SAP у разных видов растений, будут зависеть от



В самой многочисленной второй группе (выделена на рис. 3 зеленым цветом) 27 последовательностей, среди которых у огурца – 5, у томата – 4, у хлопка – 10, у яблони – 8. Для 25 из них характерен тип цинковых пальцев A20-AN1 и лишь для 2 – AN1 (огурца, яблони). Среди них выделено 8 генов, активно экспрессируемых в условиях засухи, 2 из которых – у хлопчатника (*GhSAP17*, *GhSAP6*), 4 – у яблони (*MdSAP1*, *MdSAP3*, *MdSAP11*, *MdSAP12*), 1 – у томата (*SISAP6*), 1 – у огурца (*CsSAP10*). Для белков, кодируемыми этими генами, характерен домен A20-AN1. Причем в эту группу входит ген хлопчатника *GhSAP6*, имеющий максимальный уровень экспрессии среди других генов, кодирующих SAP, у хлопчатника.

Для самой малочисленной третьей группы (выделена на рис. 3 оранжевым цветом), представленной 9 последовательностями, из которых у хлопка – 3, у томата – 2, у огурца – 2, у яблони – 2, характерен, как и для двух предыдущих групп, тип цинковых пальцев A20-AN1 и лишь для двух – AN1 (хлопка, томата). В ней были обнаружены три активно экспрессируемых в условиях засухи гена, два из которых у яблони (*MdSAP6*, *MdSAP4*), один у хлопчатника (*GhSAP9*), причем оба гена яблони проявляли максимальный уровень экспрессии относительно других генов, кодирующих SAP, у яблони. Для представленных последовательностей белков SAP характерен домен A20-AN1.

В состав четвертой группы (выделена на рис. 3 розовым цветом) входит 11 последовательностей, среди которых у томата – 2, у хлопка – 3, у яблони – 4, у огурца – 2. Эта группа отличается нетипичной комбинацией доменов типа цинковых пальцев: AN1-AN1 для шести последовательностей, AN1-C2H2 для двух последовательностей яблони, AN1-AN1-C2H2-C2H2 для двух последовательностей хлопка. Приведенные комбинации доменов типа цинковых пальцев, характерные для данной группы, не встречаются в описанных выше группах, поэтому можно предположить, что эта группа эволюционно отдалена от трех ранее перечисленных, а их гомология опосредована наличием общего домена AN1, который, как предполагается, является более древним [9]. В четвертой группе количество активно экспрессируемых генов, кодирующих SAP, представлено четырьмя последовательностями. Так, у яблони значительный уровень экспрессии показали *MdSAP19*, у огурца – *CsSAP1*, *CsSAP6* [11, 14], у томата – *SISAP11* [11, 14]. Для генов, кодирующих SAP, которые входят в эту группу, характерна нетипичная комбинация доменов: для *MdSAP19* яблони, *SISAP11* томата, *CsSAP5* огурца – AN1-AN1, для *CsSAP6* огурца – AN1-AN1-C2H2-C2H2. Два гена из этой группы, кодирующих SAP (*CsSAP5* огурца и *SISAP11* томата), показали максимальный уровень экспрессии относительно других генов в соответствующих экспериментах [11, 14].

Из приведенных результатов видно, что в каждой из групп, кроме первой, был найден активно экспрессируемый ген с максимальным уровнем экспрессии среди генов, кодирующих SAP, для соответствующей культуры. Почти для всех указанных активно экспрессируемых генов характерно наличие домена A20-AN1. Что касается яблони, то гены *MdSAP4* и *MdSAP6* с максимальным уровнем экспрессии относятся к третьей группе, а гены *MdSAP11*, *MdSAP12*, которые характеризуются как активно экспрессируемые с увеличением экспрессии через 2 ч в 18 и 61 раз соответственно, – ко второй группе. Для хлопчатника оба гена со значительным уровнем экспрессии относятся ко второй группе филогенетического дерева. Кодирующие SAP гены томата и огурца с максимальным уровнем экспрессии относятся к четвертой группе и в структуре их белков обнаружен AN1-AN1 домен. У томата гены *SISAP4*, *SISAP3* со значительным уровнем экспрессии относят также к первой группе, для них характерен A20-AN1 домен. Таким образом, анализ сходства последовательностей стресс-ассоциированных белков и уровней экспрессии кодирующих их генов позволяет предположить, что у каждого вида эволюция механизмов адаптации, включающих гены, кодирующие SAP, происходила независимо и, вероятнее всего, после выделения этих видов от общего предка.

**Заключение.** Анализ профилей экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки яблони, показал их участие в стрессовом ответе на водный дефицит. Наиболее значительное изменение уровней экспрессии отмечалось у генов *MdSAP3*, *MdSAP4*, *MdSAP12*, *MdSAP6*, *MdSAP19*, *MdSAP21*. При этом наблюдалась тенденция к повышению экспрессии генов к 4-му часу воздействия засухи, с последующим снижением к 24-му часу. У отдельных генов уровень экспрессии повышался по сравнению со 2-м часом достаточно резко, а у других – более плавно.

Эта информация подтверждает предположение о резком повышении уровня транскриптов SAP на ранних стадиях реализации ответа на абиотический стресс с последующим его снижением.

Оценка влияния степени идентичности нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, на сходство их профилей экспрессии не выявила связи между характером экспрессии генов яблони в условиях моделирования засухи и сходством их первичной структуры.

Анализ сходства последовательностей стресс-ассоциированных белков и уровней экспрессии кодирующих их генов у разных видов растений (яблони, хлопчатника, томата и огурца) на примере засухи позволяет предположить, что у каждого вида эволюция механизмов адаптации, включающих гены, кодирующие SAP, происходила независимо и, вероятнее всего, после выделения этих видов от общего предка. В структуре стресс-ассоциированных белков, кодируемых генами, наиболее сильно реагируют на засуху *Malus*, *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, *Cucumis sativus*, чаще по сравнению с другими типами доменов цинковых пальцев встречается домен типа A20-AN1.

Полученные результаты позволяют уточнить роль отдельных генов, кодирующих SAP, в формировании стрессового ответа яблони на воздействие засухи.

### Список использованных источников

1. Genomic analysis of stress associated proteins in soybean and the role of GmSAP16 in abiotic stress responses in Arabidopsis and soybean / X.-Z. Zhang [et al.] // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – Art. 1453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01453>
2. Gene networks involved in drought stress response and tolerance / K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // J. Exp. Bot. – 2007. – Vol. 58, N 2. – P. 221–227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>
3. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality / C. Bailly [et al.] // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52, N 357. – P. 701–708. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701>
4. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispansing transmembrane protein family from cereals and Arabidopsis / G. Breton [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 132, N 1. – P. 64–74. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015255>
5. A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco / Y. Wang [et al.] // Plant Sci. – 2006. – Vol. 171, N 6. – P. 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.011>
6. Li, K.-Q. Identification of differentially expressed genes related to dehydration resistance in a highly drought-tolerant pear, *Pyrus betulaefolia*, as through RNA-Seq / K.-Q. Li, X.-Y. Xu, X.-S. Huang // PloS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 2. – P. e0149352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149352>
7. An apple (*Malus domestica*) NAC transcription factor enhances drought tolerance in transgenic apple plants / D. Jia [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2019. – Vol. 139. – P. 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.011>
8. R2R3-MYB transcription factor Md MYB 23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple / J. P. An [et al.] // Plant J. – 2018. – Vol. 96, N 3. – P. 562–577. <https://doi.org/10.1111/tpj.14050>
9. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress / T. Zhao [et al.] // Mol. Genet. Genomics. – 2012. – Vol. 287, N 5. – P. 423–436. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0687-7>
10. Genome-wide identification and expression profiling of the SnRK2 gene family in *Malus prunifolia* / Y. Shao [et al.] // Gene. – 2014. – Vol. 552, N 1. – P. 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.017>
11. Identification and expression analysis of Stress-Associated Proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cucumber / W. Lai [et al.] // Plants. – 2020. – Vol. 9, N 3. – Art. 400. <https://doi.org/10.3390/plants9030400>
12. Genome-wide analysis of the stress-associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger (s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis / S. Vij, A. K. Tyagi // Mol. Genet. Genomics. – 2006. – Vol. 276, N 6. – P. 565–575. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0165-1>
13. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton / W. Gao [et al.] // Mol. Genet. Genomics. – 2016. – Vol. 291, N 6. – P. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>
14. Characterization and phylogenetic analysis of environmental stress-responsive SAP gene family encoding A20/AN1 zinc finger proteins in tomato / A. U. Solanke [et al.] // Mol. Genet. Genomics. – 2009. – Vol. 282, N 2. – P. 153–164. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0455-5>
15. Genome-wide survey and expression analysis of the stress-associated protein gene family in desert poplar, *Populus euphratica* / H. Jia [et al.] // Tree Genet. Genomes. – 2016. – Vol. 12, N 4. – Art. 78. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1033-8>
16. Genomic characterization and expression profiles of stress-associated proteins (SAPs) in castor bean (*Ricinus communis*) / Z. Wang [et al.] // Plant Diversity. – 2020. – Vol. 43, N 2. – P. 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.07.010>
17. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants / J. Giri [et al.] // Bioessays. – 2013. – Vol. 35, N 7. – P. 639–648. <https://doi.org/10.1002/bies.201200181>
18. A stress-associated protein, AtSAP13, from *Arabidopsis thaliana* provides tolerance to multiple abiotic stresses / A. Dixit [et al.] // Plant, Cell Environ. – 2018. – Vol. 41, N 5. – P. 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/pce.13103>

19. Mukhopadhyay, A. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco / A. Mukhopadhyay, S. Vij, A. K. Tyagi // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 101, N 16. – P. 6309–6314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401572101>
20. Идентификация генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, содержащие домены A20/AN1, в геноме яблони *in silico* и анализ их филогенетических связей / П. В. Кузмицкая, О. Ю. Урбанович, А. В. Кильчевский // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2018. – Т. 62. – С. 455–462.
21. Genome-wide analysis and cloning of the apple stress-associated protein gene family reveals MdSAP15, which confers tolerance to drought and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis* / Q. Dong [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 9. – Art. 2478. <https://doi.org/10.3390/ijms19092478>
22. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucl. Acids Res.* – 1994. – Vol. 22, N 22. – P. 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
23. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 35, N 6. – P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
24. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit / L. Jaakola [et al.] // *Mol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 19, N 2. – P. 201–203. <https://doi.org/10.1385/MB:19:2:201>
25. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments / S. A. Bustin [et al.] // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55, N 4. – P. 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
26. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis / X. Rao [et al.] // *Biostat., Bioinform. Biomath.* – 2013. – Vol. 3, N 3. – P. 71–85.
27. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton / W. Gao [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* – 2016. – Vol. 291, N 6. – P. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>

## References

1. Zhang X.-Z., Zheng W.-J., Cao X.-Y., Cui X.-Y., Zhao S.-P., Yu T.-F. [et al.]. Genomic analysis of stress associated proteins in soybean and the role of GmSAP16 in abiotic stress responses in *Arabidopsis* and soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10, art. 1453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01453>
2. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol. 58, no. 2, pp. 221–227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>
3. Bailly C., Audigier C., Ladonne F., Wagner M. H., Coste F., Corbineau F., Côme D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany*, 2001, vol. 52, no. 357, pp. 701–708. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701>
4. Breton G., Danyluk J., Charron J.-B. F., Sarhan F. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispansing transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003, vol. 132, no. 1, pp. 64–74. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015255>
5. Wang Y., Jiang J., Zhao X., Liu G., Yang C., Zhan L. A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science*, 2006, vol. 171, no. 6, pp. 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.011>
6. Li K.-Q., Xu X.-Y., Huang X.-S. Identification of differentially expressed genes related to dehydration resistance in a highly drought-tolerant pear, *Pyrus betulaefolia*, as through RNA-Seq. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 2, p. e0149352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149352>
7. Jia D., Jiang Q., van Nocker S., Gong X., Ma F. An apple (*Malus domestica*) NAC transcription factor enhances drought tolerance in transgenic apple plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, vol. 139, pp. 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.011>
8. An J. P., Li R. Qu F. J., You C. X. Wang, X. F., Hao Y. J. R2R3-MYB transcription factor Md MYB 23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple. *Plant Journal*, 2018, vol. 96, no. 2, pp. 562–577. <https://doi.org/10.1111/tpj.14050>
9. Zhao T., Liang, D., Wang P., Liu J., Ma F. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, vol. 287, no. 5, pp. 423–436. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0687-7>
10. Shao Y., Qin Y., Zou Y., Ma F. Genome-wide identification and expression profiling of the SnRK2 gene family in *Malus prunifolia*. *Gene*, 2014, vol. 552, no. 1, pp. 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.017>
11. Lai W., Zhou Y., Pan R., Liao L., He J., Liu H., Yang Y., Liu S. Identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cucumber. *Plants*, 2020, vol. 9, no. 3, art. 400. <https://doi.org/10.3390/plants9030400>
12. Vij S., Tyagi A. K. Genome-wide analysis of the stress-associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger (s) in rice and their phylogenetic relationship with *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, vol. 276, no. 6, pp. 565–575. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0165-1>
13. Gao W., Long L., Tian X., Jin J., Liu H., Zhang H., Xu F., Song C. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, vol. 291, no. 6, pp. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>
14. Solanke A. U., Sharma M. K., Tyagi A. K., Sharma A. K. Characterization and phylogenetic analysis of environmental stress-responsive SAP gene family encoding A20/AN1 zinc finger proteins in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, vol. 282, no. 2, pp. 153–164. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0455-5>

15. Jia H., Li J., Zhang J., Ren Y., Hu J., Lu M., Genome-wide survey and expression analysis of the stress-associated protein gene family in desert poplar, *Populus euphratica*. *Tree Genetics and Genomes*, 2016, vol. 12, no. 4, art. 78. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1033-8>
16. Wang Z., Kuang J., Han B., Chen S., Liu A. Genomic characterization and expression profiles of stress-associated proteins (SAPs) in castor bean (*Ricinus communis*). *Plant Diversity*, 2020, vol. 43, no. 2, pp. 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.07.010>
17. Giri J., Dansana P. K., Kothari K. S., Sharma G., Vij S., Tyagi A. K. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. *Bioessays*, 2013, vol. 35, no. 7, pp. 639–648. <https://doi.org/10.1002/bies.201200181>
18. Dixit A., Tomar P., Vaine E., Abdullah H., Hazen S., Dhankher O. P. A stress-associated protein, AtSAP13, from *Arabidopsis thaliana* provides tolerance to multiple abiotic stresses. *Plant, Cell & Environment*, 2018, vol. 41, no. 5, pp. 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/pce.13103>
19. Mukhopadhyay A., Vij S., Tyagi A. K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, vol. 101, no. 16, pp. 6309–6314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401572101>
20. Kuzmitskaya P. V., Urbanovich O. Yu., Kil'chevskii A. V. Identification of genes encoding stress-associated proteins containing the domains A20/AN1 in the apple genome in silico and analysis of their phylogenetic relationship. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, no. 62, pp. 455–462 (in Russian).
21. Dong Q., Duan D., Zhao S., Xu B., Luo J., Wang Q. [et al.]. Genome-wide analysis and cloning of the apple stress-associated protein gene family reveals MdSAP15, which confers tolerance to drought and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 9, art. 2478. <https://doi.org/10.3390/ijms19092478>
22. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
24. Jaakola L., Pirttilä A. M., Halonen M., Hohtola A. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Molecular Biotechnology*, 2001, vol. 19, no. 2, pp. 201–203. <https://doi.org/10.1385/MB:19:2:201>
25. Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M. [et al.]. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 4, pp. 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
26. Rao X., Huang X., Zhou Z., Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinformatics and Biomathematics*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 71–85.
27. Gao W., Long L., Tian X., Jin J., Liu H., Zhang H., Xu F., Song C. Genome-wide identification and expression analysis of stress-associated proteins (SAPs) containing A20/AN1 zinc finger in cotton. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, vol. 291, no. 6, pp. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1252-6>

### Информация об авторах

Кузмицкая Полина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1929-4315>. E-mail: p.kuzmitskaya@igc.by

Королева Екатерина Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.koroleva@igc.by

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: o.urbanovich@igc.by

### Information about the authors

Polina V. Kuzmitskaya – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoriny Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1929-4315>. E-mail: p.kuzmitskaya@igc.by

Katsiaryna S. Karaleva – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoriny Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.koroleva@igc.by

Oksana Yu. Urbanovich – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoriny Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: o.urbanovich@igc.by

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 596; 574.3  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-47-56>

Поступила в редакцию 10.05.2023  
Received 10.05.2023

**Е. В. Корзун, Е. А. Куликова**

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

## **ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ЛИЧИНОК ЗЕМНОВОДНЫХ И ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЕЕ ФАКТОРЫ В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО ВОДОЕМА В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ БЕЛАРУСИ**

**Аннотация.** Изучены динамика численности личинок земноводных и влияние факторов абиотического и биотического происхождения на их смертность в естественных условиях.

Научная новизна исследования заключается в изучении степени взаимодействия личинок земноводных между собой и с беспозвоночными хищниками в природных условиях. В основной части работы дан обзор литературы, описана методика проведения работы и представлены полученные результаты.

Установлено, что в природных условиях степень воздействия хищников на численность личинок земноводных не столь значима, как считалось ранее, и они не способны существенно влиять на регулирование численности головастиков. Абиотические факторы среды, находясь в границах оптимума, не оказывают влияние на смертность личинок, а количество пищи в природных водоемах не является лимитирующим численность фактором. Наиболее интенсивная гибель личинок происходит на ранних стадиях их развития. Несмотря на низкую общую плотность личинок земноводных в естественном водоеме, большинство из них периодически подвергается воздействию метаболитов и испытывает на себе влияние так называемого эффекта группы. Это выражается в угнетении роста и развития особей, в гибели или снижении жизнеспособности наиболее чувствительных особей. Кроме того, велика вероятность их гибели и от других факторов.

**Ключевые слова:** личинки земноводных, головастики, хищные водные беспозвоночные, эффект группы, метаболиты, взаимодействие хищник–жертва

**Для цитирования:** Корзун, Е. В. Динамика численности личинок земноводных и определяющие ее факторы в условиях искусственного водоема в центральной части Беларуси / Е. В. Корзун, Е. А. Куликова // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 47–56. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-47-56>

**Jahor V. Korzun, Alena A. Kulikova**

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

## **DYNAMICS OF CHANGE IN THE NUMBER OF AMPHIBIAN LARVAE IN POND CONDITIONS AND FACTORS DETERMINING IT IN THE CENTRAL PART OF BELARUS**

**Abstract.** The aim of the work is to study the influence of factors of abiotic and biotic origin on abundance, growth rate and development of amphibian larvae in natural conditions.

The scientific novelty of the work lies in studying the degree of interaction of amphibian larvae with each other and with invertebrate predators, their interaction in natural conditions. The main part of the work contains a literature review, the work methodology and the result description.

In conclusion, it was noted that under natural conditions, the magnitude of impact of predators on the number of amphibian larvae is much lower than it has been previously thought; they are not able to provide a significant function of regulating the number of tadpoles. Abiotic environmental factors, being within the optimum limits, do not affect the mortality of larvae, and food in natural water bodies is not a factor limiting abundance. The most intensive death of larvae occurs in the early larval development stage. Despite a low overall density of larvae in a natural water body, most amphibian larvae are periodically exposed to metabolites and are affected by the “group effect”. This is expressed in the inhibition of growth and development of individuals, the death or decrease in the decline in the viability of the most sensitive individuals, and also increases the likelihood of their death from other factors.

**Keywords:** amphibian larvae, tadpoles, predatory aquatic invertebrates, group effect, metabolites, predator–prey interaction

**For citation:** Korzun Ja. V., Kulikova A. A. Dynamics of change in the number of amphibian larvae in pond conditions and factors determining it in the central part of Belarus. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 47–56 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-47-56>

**Введение.** Динамика численности популяции животных отражает их борьбу за существование, определяемую спецификой вида и условиями существования [1]. Изменение численности популяции зависит от соотношения плодовитости к гибели организмов на каждой стадии онтогенеза, а в критические периоды индивидуального развития имеет наибольшее значение [2]. Согласно этому, периоды, связанные с резкой морфологической перестройкой развивающегося организма и сменой экологии, характеризуются повышенной чувствительностью к внешним воздействиям, а следовательно, повышенной смертностью. Для земноводных такими критическими периодами считаются стадии гастрюляции [3] и метаморфоза [4, 5]. Гибель животных в это время может достигать 85–99 % от исходного числа икринок [6–10]. Наибольшая смертность личинок земноводных достигается в период эмбриогенеза и раннего постнатального развития, а в ходе онтогенеза постепенно снижается [11–13]. Кроме того, нами и другими авторами установлено, что на численность личинок амфибий оказывают воздействие биотические факторы (влияние хищников, взаимодействия между личинками) и абиотические условия жизни.

Цель настоящего исследования – изучение динамики численности личинок земноводных, влияния факторов абиотического и биотического происхождения на смертность личинок земноводных в естественных условиях. В результате работы изучены численность личинок земноводных, изменение их плотности в период личиночного развития в естественных условиях, дана оценка степени влияния хищных беспозвоночных на смертность личинок амфибий.

Влияние хищных беспозвоночных на популяцию амфибий на личиночной стадии развития многими авторами долгое время считалось основным фактором регуляции численности популяции в водоемах. Это обосновывалось высокой прожорливостью хищников (личинки и имаго стрекоз, жуков плавунцов, гладышей) в экспериментальных условиях [8, 14]. Однако концентрация хищников в естественных условиях значительно ниже, чем в экспериментальных, и они не способны существенно влиять на численность головастиков по сравнению с их естественной гибелью [15].

К лимитирующим абиотическим факторам относятся температура, pH среды, содержание кислорода и углекислого газа в воде. Икра и личинки земноводных выдерживают очень широкие колебания температуры, оптимум для головастиков бурых лягушек лежит в пределах 21–25 °C [12]. Темпы их развития сильно зависят от температуры воды – в более прогреваемых водоемах выход сеголетков начинается раньше, чем в менее прогреваемых водоемах [7]. Кислотность воды влияет на развитие икры – с возрастанием кислотности увеличивается гибель зародышей [16]. Оптимум кислотности среды для головастиков лежит между 7,1 и 7,7. Ее влияние на выживаемость личинок отмечается при значении pH меньше 6,0 и выше 8,4 [17].

Выявленные географические различия между популяциями указывают на то, что имеется две стратегии роста и развития личинок. Особи из южных популяций (с менее ограниченной длительностью сезона активности) как в природе, так и в условиях опыта не только дольше развиваются до стадии метаморфоза, но и вырастают более крупными, при этом даже уступая в скорости роста. Особи из северных популяций, наоборот, минимизируют длительность предметаморфозного развития, даже в ущерб достигнутому ко времени выхода на сушу размерам [18].

Большое внимание уделяется исследователями вопросу о химической коммуникации личинок через выделяемые в водную среду продукты метаболизма, оказывающие воздействие на рост, состояние, поведение и численность животных. В строго контролируемых условиях эксперимента проявлением так называемого эффекта группы является метаболическая регуляция роста и развития личинок. В зависимости от плотности личинок в среде накапливается различное количество продуктов обмена веществ, представляющих собой биологически активные вещества, которые оказывают неодинаковое воздействие на рост и развитие животных разных стадий развития [19]. В случае повышенной плотности эффект группы проявляется и в естественных условиях обитания, оказывая воздействие на процессы роста, развития и смертности различных видов личинок амфибий [7, 20, 21]. Однако средняя плотность личинок в природных условиях существенно ниже (это подтверждается результатами данной работы и исследованиями других авторов [22, 23]), чем определенная опытным путем плотность, при которой начинается влияние эффекта группы [24].

**Материалы и методы исследования.** Изучение динамики численности и пространственного распределения личинок земноводных проводили в 2022 г. на территории Копыльского района Минской области в естественных условиях – небольшом постоянном водоеме, который 6 видов амфибий – обыкновенный тритон *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758), краснобрюхая жерлянка *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761), обыкновенная чесночница *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768), обыкновенная квакша *Hyla arborea* (Linne, 1758), травяная лягушка *Rana temporaria* (Linne, 1758), прудовая лягушка *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) – используют как стацию размножения и развития личинок. Кроме них в водоеме и прибрежной зоне отмечена зеленая жаба *Bufo viridis* (Laurenti, 1768).

Водоем расположен на сельскохозяйственных угодьях, представляет собой прямоугольный искусственный пруд глубиной до 1,0 м. Площадь водоема колебалась в течение года и зависела от количества осадков. Она составляла более 500 м<sup>2</sup> в апреле и постепенно сократилась до 90 м<sup>2</sup> в августе. Водоем хорошо прогревается солнцем, имеет богатую водную растительность, которая сильно разрастается в середине лета. В водоеме складывается благоприятный температурный и кислотный режим (значения не выходили за рамки оптимумов).

Видовое определение взрослых и личинок амфибий осуществляли при помощи определителей [25–27].

Плотность, пространственное распределение личинок земноводных и хищных беспозвоночных определяли при помощи биоценометра, численность – путем пересчета полученных данных на всю площадь водоема [28]. Учеты проводили с начала июня до середины августа с интервалом 14–16 дней. Температуру и жесткость воды определяли приборами – электронным термометром с точностью до 0,1 °С и портативным рН-метром Hanna Checker.

**Результаты и их обсуждение.** Икротетание в водоеме началось в первой декаде апреля при температуре воды 8,5–9 °С – появились первые кладки травяной лягушки, а также токующие самцы обыкновенной чесночницы. В середине апреля при температуре воды 14–15 °С обнаружены икра обыкновенного тритона, кладки чесночницы. В водоеме начали встречаться взрослые особи обыкновенной квакши, краснобрюхой жерлянки, прудовой лягушки. В начале мая при температуре воды 15–16 °С завершилось эмбриональное развитие травяной лягушки – головастики вышли из икряных оболочек и перешли к свободноплавающей стадии развития личинок.

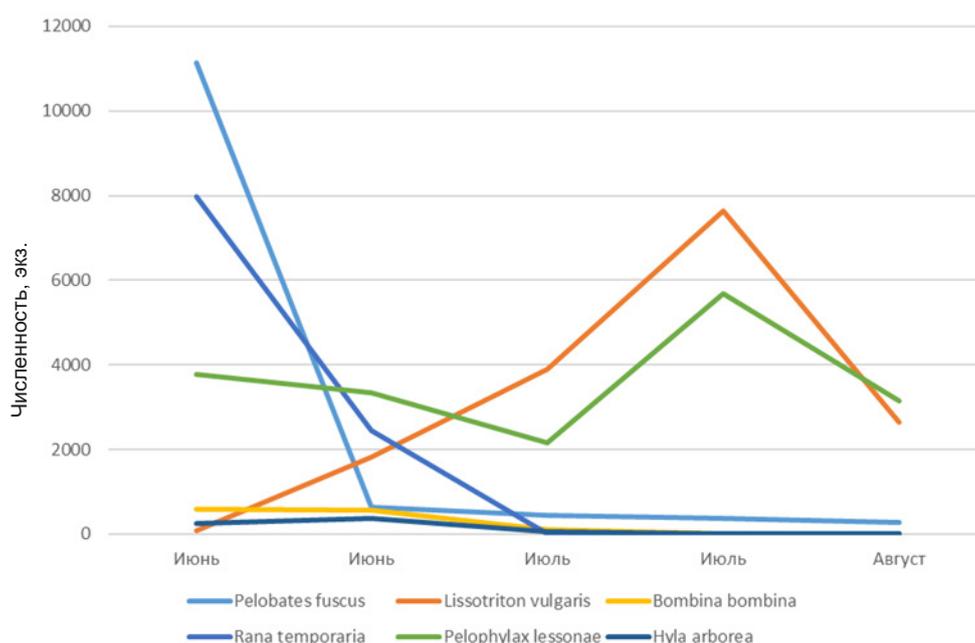


Рис. 1. Изменение численности различных видов земноводных в период их личиночного развития в естественных условиях

Fig. 1. Change in the number of different species of amphibians during larval development in natural conditions

В середине мая начался период икрометания у краснобрюхой жерлянки, обыкновенной квакши, прудовой лягушки. Первые головастики и личинки обыкновенного тритона появились в начале июня. Во второй половине июня начался метаморфоз у головастика травяной лягушки, в июле головастики краснобрюхой жерлянки, обыкновенной квакши и травяной лягушки закончили метаморфоз и в водоеме не встречались. В середине июля начался метаморфоз у чесночницы и прудовой лягушки. Личинки обыкновенного тритона встречались в водоеме до середины сентября, однако их численность в это время была низкой.

Результаты учета численности личинок земноводных приведены на рис. 1. Наиболее интенсивные изменения численности и высокие показатели гибели личинок наблюдались на ранних стадиях их развития, в дальнейшем показатель смертности снизился.

Для видов с коротким периодом икрометания (обыкновенная чесночница, травяная лягушка) общая начальная численность высока и интенсивно снижается в начале личиночного развития из-за высокой смертности головастика. Изменение численности и плотности видов с длительным порционным икрометанием (обыкновенный тритон, краснобрюхая жерлянка, квакша, прудовая лягушка) происходит не так резко и носит плавный характер за счет постепенного появления новых личинок из отложенной икры (табл. 1, 2, рис. 2, 3). Сильное влияние на плотность оказывает изменение физических размеров водоема – под влиянием погодных условий его площадь интенсивно сократилась с 446 до 89 м<sup>2</sup>.

Интенсивность смертности в генерации головастика травяной лягушки и обыкновенной чесночницы определяется начальной плотностью животных и только потом их возрастом и стадией развития. Зависимость смертности головастика от плотности подразумевает наличие факторов, действие которых снижается по мере уменьшения плотности земноводных. Такими факторами могут быть как биотические, так и абиотические условия жизни головастика, а также прямое внутри- и межвидовое взаимодействие между особями личинок.

Оптимальная кислотность среды для головастика лежит между 7,1 и 7,7, и ее значение начинает сказываться на выживаемости личинок при pH больше 8,4 и меньше 6,0 [17].

В процессе исследований значение кислотности воды в водоеме плавно снижалось с 8,2 до 7,2. Самые значительные колебания температуры воды отмечались в весенние месяцы под влиянием погодных условий (рис. 4).

Т а б л и ц а 1. Плотность (экз/л) земноводных в водоеме в период их личиночного развития

Table 1. Density (ind/l) of amphibian larvae in the reservoir during the development period

Номер/ месяц учета	Площадь водоема, м <sup>2</sup>	Плотность, экз/л					
		<i>Pelobates fuscus</i>	<i>Lissotriton vulgaris</i>	<i>Bombina bombina</i>	<i>Rana temporaria</i>	<i>Pelophylax lessonae</i>	<i>Hyla arborea</i>
1/июнь 2022 г.	446	0,07	0,0004	0,004	0,05	0,024	0,001
2/июнь 2022 г.	350	0,004	0,013	0,004	0,017	0,023	0,002
3/июль 2022 г.	220	0,007	0,062	0,002	0	0,035	0,001
4/июль 2022 г.	188	0,007	0,144	0	0	0,108	0
5/август 2022 г.	89	0,022	0,215	0	0	0,257	0

Т а б л и ц а 2. Плотность (экз/м<sup>2</sup>) земноводных в водоеме в период их личиночного развития

Table 2. Density (ind/m<sup>2</sup>) of amphibian larvae in the reservoir during the development period

Номер/ месяц учета	Площадь водоема, м <sup>2</sup>	Плотность, экз/м <sup>2</sup>					
		<i>Pelobates fuscus</i>	<i>Lissotriton vulgaris</i>	<i>Bombina bombina</i>	<i>Rana temporaria</i>	<i>Pelophylax lessonae</i>	<i>Hyla arborea</i>
1/июнь 2022 г.	446	25,384	0,15	1,31	18,15	8,62	0,54
2/июнь 2022 г.	350	1,83	5,29	1,63	7,12	9,71	1,06
3/июль 2022 г.	220	2,0	18,0	0,46	0	10	0,31
4/июль 2022 г.	188	2,05	40,68	0	0	30,26	0
5/август 2022 г.	89	3,08	30,15	0	0	36,0	0

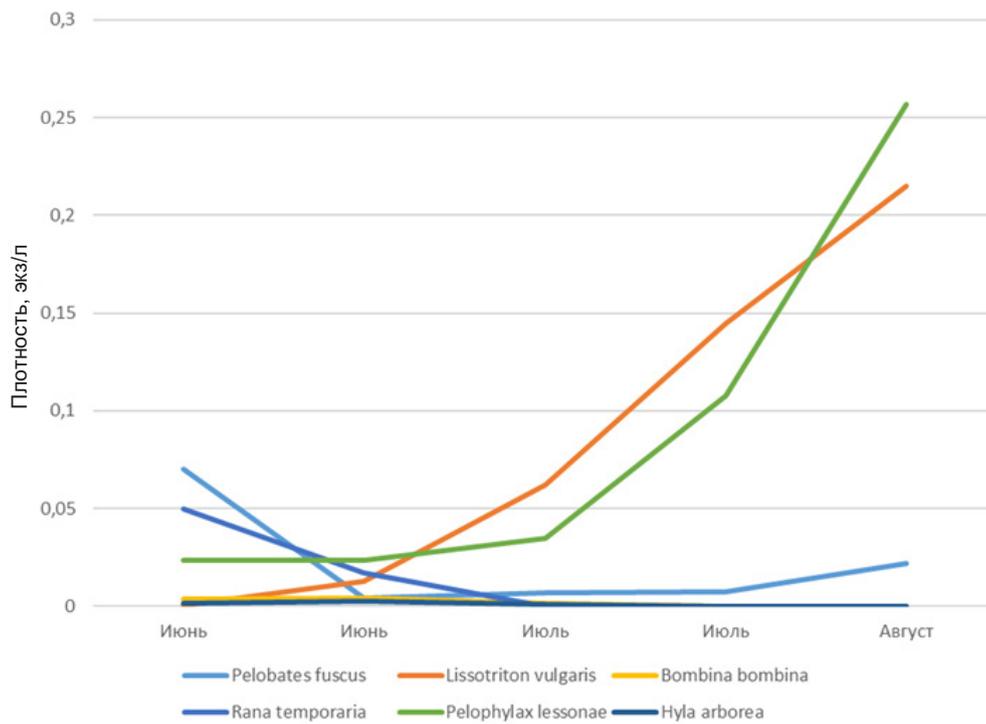


Рис. 2. Изменение плотности (экз/л) различных видов земноводных в период их личиночного развития в естественных условиях

Fig. 2. Change in the density (ind/l) of different species of amphibians during larval development in natural conditions

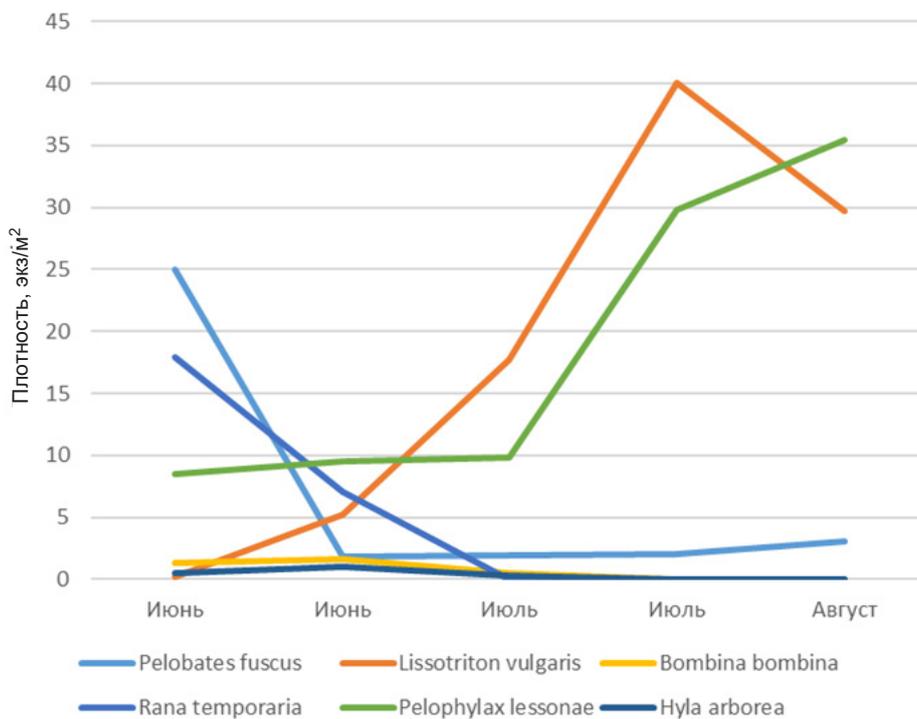


Рис. 3. Изменение плотности (экз/м²) различных видов земноводных в период их личиночного развития в естественных условиях

Fig. 3. Change in the density (ind/m<sup>2</sup>) of different amphibian species during the larval development period in natural conditions

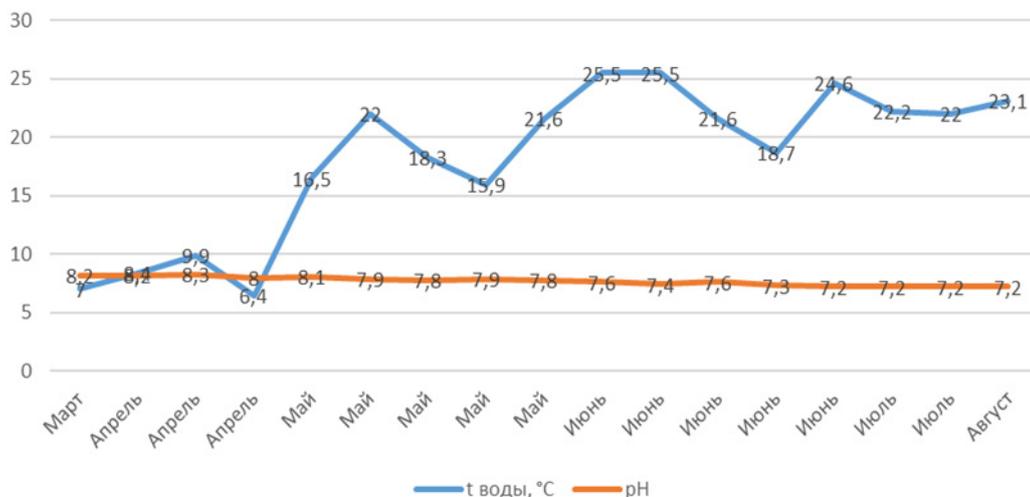


Рис. 4. Параметры абиотических факторов среды (температура и pH воды) с марта по август  
Fig. 4. Parameters of abiotic environmental factors (water temperature and pH) from March to August

Икра и головастики травяной лягушки выдерживают очень широкие колебания температуры – от  $-1,1$  до  $33-35$  °C [4, 12]. Колебания температуры в пределах  $15$  °C не оказывают существенного влияния на развитие эмбрионов [29], а температурный оптимум для головастиков составляет  $21-25$  °C [12]. В процессе наблюдений колебания температуры не выходили за пределы нормы. Таким образом, значения изученных абиотических факторов в течение всего периода личиночного развития не выходят за пределы нормы и не могут вызывать повышенную смертность личинок земноводных.

Влияние биотических факторов заключается в уничтожении хищниками и обеспеченностью пищей [7]. Личинки земноводных всеядны, но основным источником их питания являются водоросли [30, 31]. Головастики питаются в любое время суток, по мере переваривания пищи, а в природных водоемах нет недостатка пищи. Таким образом, пища не может лимитировать численность генерации [7].

Долгое время считалось, что влияние хищников на регуляцию численности личинок земноводных довольно значимо, однако эксперименты в искусственных условиях и наблюдения в естественных условиях опровергли это предположение [7, 15, 32].

Из хищных беспозвоночных в водоеме встречаются имаго и личинки жука плавунца окаймленного *Dytiscus marginalis* (Linnaeus, 1758), личинки стрекоз, имаго и личинки клопов гладышей *Notonecta glauca* (Linnaeus, 1758). Эти хищники используют в пищу не только головастиков, но и других беспозвоночных – личинок комаров, мелких низших ракообразных, моллюсков и т. д.

Экспериментальные работы в искусственных и естественных условиях показали, что основными хищными беспозвоночными, использующими головастиков в пищу, являются имаго и личинки жука-плавунца [7, 15, 32]. В табл. 3 представлены соотношения числа особей личинок земноводных на одного хищника в изученном водоеме. Количество головастиков на одного имаго и одну личинку плавунца в водоеме довольно сильно колеблется, но все равно остается высоким.

Т а б л и ц а 3. Соотношение имаго и личинок плавунца с личинками земноводных

T a b l e 3. Ratio of adults and larvae of the swimmer with larvae of amphibians

Показатель	1/июнь 2022 г.	2/июнь 2022 г.	3/июль 2022 г.	4/июль 2022 г.	5/август 2022 г.
Число личинок земноводных на 1 плавунца	58,7	23,1	6,45	61	2,9
Число личинок земноводных на 1 личинку плавунца	8,3	5,1	18,2	213,5	–

При наличии в водоемах большого объема воды и разнородности мест обитания могут меняться как способы охоты хищников, так и тактика избегания хищника жертвами. Кроме того, головастики не единственный источник пищи хищных беспозвоночных.

Установлено, что в естественных условиях плотность хищников и личинок земноводных существенно ниже, чем в описанных выше экспериментах по изучению влияния беспозвоночных хищников на численность головастика земноводных (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Количественные показатели имаго, личинок плавунца и личинок земноводных в естественных условиях

Table 4. Quantitative indicators of adults, swimmer larvae and amphibian larvae in natural conditions

Номер/месяц учета	Площадь водоема, м <sup>2</sup>	Плотность, экз/л		Плотность, экз/м <sup>2</sup>	
		Личинки земноводных	Хищники	Личинки земноводных	Хищники
1/июнь 2022 г.	446	0,15	0,02	54,15	7,46
2/июнь 2022 г.	350	0,06	0,013	26,63	6,34
3/июль 2022 г.	220	0,11	0,02	30,76	6,46
4/июль 2022 г.	188	0,26	0,005	72,99	1,54
5/август 2022 г.	89	0,49	0,17	69,232	23,69

Из полученных результатов учета численности, изменения кислотности и температурного режима водоема следует, что каждый из изученных факторов, таких как температура и кислотность среды, доступность и обеспеченность пищей, влияние хищников, сам по себе не обуславливает массовую гибель личинок земноводных в естественных условиях. Роль хищников в регуляции численности может по-прежнему быть неоднозначной, однако в водоеме, где они отсутствовали, численность генерации головастика травяной лягушки убывала [7]. Это подразумевает наличие какого-то зависящего от плотности популяции фактора, имеющего сильное влияние на жизнеспособность животных. Таким фактором является взаимодействие головастика через выделяемые ими в воду экзометаболиты, которые регулируют рост, развитие и жизнеспособность личинок земноводных. Чем выше общая или локальная плотность, тем медленнее растут и развиваются животные и тем больше вероятность их гибели во время личиночного развития.

Личинки амфибий свободно перемещаются по всей акватории водоема и могут образовывать массовые скопления с повышенной (по сравнению с общей) плотностью – на прогреваемых участках, в местах скопления пищи и рядом с укрытиями. Кроме того, они по-разному распределяются в пространстве и на глубине. Головастики чесночницы и квакши проводят больше времени в пелагиале и предпочитают более глубоководные участки водоема. Личинки обыкновенного тритона, краснобрюхой жерлянки держатся в основном в придонном слое воды и предпочитают более мелководные, с богатой водной растительностью участки водоема. Головастики травяной и прудовой лягушек встречаются как в мелководной, так и в глубоководной зоне водоема.

Скопления головастика травяной, прудовой лягушек образовывались в прибрежной части водоема, на глубине до 20 см. Головастики располагались плотным слоем на расстоянии 1–3 см друг от друга. Учет их скоплений показал, что плотность головастика травяной и прудовой лягушек достигает 20 и 23 экз/л соответственно и существенно превышает их среднюю плотность в водоеме.

Таким образом, несмотря на низкую общую плотность, личинки в течение дня периодически находятся в скоплениях и испытывают на себе воздействие эффекта группы. Однако состав личинок в них не постоянен: особи могут свободно входить и выходить из них, минимизируя влияние метаболитов.

## Выводы

1. Наиболее интенсивные изменения численности и высокие показатели гибели личинок земноводных наблюдаются на ранних стадиях личиночного развития, в дальнейшем показатель смертности снижается.

2. Абиотические факторы среды, такие как температура, кислотность воды, находясь в границах оптимума, не являются факторами, определяющими высокую смертность личинок.

3. Воздействие хищников не способно оказывать существенного влияния на численность личинок земноводных. В естественных условиях обитания (большой объем воды в водоеме, наличие другого корма, растительности, малые плотность хищников и соотношение хищник–жертва) влияние хищников на численность смягчается и не способно изменять структуру личиночных популяций амфибий.

4. Общая плотность личинок земноводных в водоеме в процессе развития колебалась в пределах от 0,06 до 0,49 экз/л. Личинки некоторых видов земноводных образовывали локальные скопления, в которых плотность головастиков была существенно выше, чем в остальном водоеме, и достигала 23 экз/л. Головастики в таких скоплениях подвергаются воздействию вырабатываемых ими продуктов метаболизма и испытывают на себе их негативное влияние. Это выражается в угнетении роста и развития особей, снижении жизнеспособности наиболее чувствительных из них, повышении смертности, увеличении вероятности их гибели от других факторов.

В разнообразной обстановке естественного водоема личинки всегда могут выбрать наиболее благоприятные условия, но полностью избежать влияния факторов среды и их последствий им не удается, а главным регулирующим численность фактором являются внутри- и межвидовые взаимодействия личинок земноводных посредством вырабатываемых ими продуктов метаболизма.

#### Список использованных источников

- Северцов, С. А. Динамика населения и приспособительная эволюция животных / С. А. Северцов. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1941. – 316 с.
- Светлов, П. Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез / П. Г. Светлов // Вопросы цитологии и общей физиологии : сб. ст., посвящ. памяти Д. Н. Насонова / редкол.: Ю. И. Полянский (отв. ред.) [и др.]. – М.; Л., 1960. – С. 263–274.
- Нейфах, А. А. Сравнительное радиационное исследование морфогенетической функции ядер в развитии животных / А. А. Нейфах // Журн. общ. биологии. – 1961. – Т. 22, № 1. – С. 42–57.
- Дастюг, Г. Личинки амфибий как биологические реагенты / Г. Дастюг, Ж. Сукиер; под ред. Е. Н. Павловского. – М.: Изд-во иностр. лит., 1949. – 160 с.
- Щупак, Е. Л. К развитию головастиков остромордой лягушки в естественных водоемах / Е. Л. Щупак // Материалы отчетной сессии Лаборатории популяционной экологии позвоночных животных / отв. ред. В. Н. Большаков. – Свердловск, 1969. – Вып. 3. – С. 17–19.
- Ищенко, В. Г. Пространственная структура и продуктивность популяции малоазиатской лягушки (*Rana macroscymetis*) / В. Г. Ищенко, Ж. Н. Молов // Популяционные механизмы динамики численности животных: тр. Ин-та экол. раст. и жив. УНЦ АН СССР. – Свердловск, 1979. – С. 61–74.
- Северцов, А. С. Гибель личинок травяной лягушки (*Rana temporaria*) и факторы, ее определяющие / А. С. Северцов, Г. С. Сурова // Зоол. журн. – 1979. – Т. 58, вып. 3. – С. 393–411.
- Calef, G. W. Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora* / G. W. Calef // Ecology. – 1973. – Vol. 54, N 4. – P. 741–758. <https://doi.org/10.2307/1935670>
- Licht, L. E. Palatability of *Rana* and *Hyla* eggs / L. E. Licht // Am. Midland Naturalist. – 1969. – Vol. 82, N 1. – P. 296–298. <https://doi.org/10.2307/2423845>
- Cecil, S. G. Survival rate, population density and development of naturally occurring anuran larva (*Rana catesbeiana*) / S. G. Cecil, J. J. Just // Copeia. – 1979. – Vol. 1979, N 3. – P. 447–453. <https://doi.org/10.2307/1443221>
- Банников, А. Г. О колебании численности бесхвостых амфибий / А. Г. Банников // Докл. АН СССР. – 1948. – Т. 61, вып. 1. – С. 131–134.
- Терентьев, П. В. Лягушка / П. В. Терентьев. – М.: Совет. наука, 1950. – 346 с.
- Молов, Ж. К. О биологической продуктивности популяции малоазиатской лягушки / Ж. К. Молов, В. Г. Ищенко // Экология. – 1973. – Вып. 3. – С. 95–97.
- Brockelman, W. Y. An analysis of density effects and predation in *Bufo americanus* tadpoles / W. Y. Brockelman // Ecology. – 1969. – Vol. 50, N 4. – P. 632–644. <https://doi.org/10.2307/1936252>
- Сурова, Г. С. Действие хищников на личинок бурых лягушек в условиях эксперимента / Г. С. Сурова, А. С. Северцов // Зоол. журн. – 1988. – Т. 67, № 10. – С. 1509–1518.
- Сурова, Г. С. Влияние кислой среды на жизнеспособность икры травяной лягушки (*Rana temporaria*) / Г. С. Сурова // Зоол. журн. – 2002. – Т. 81, № 5. – С. 608–616.
- Costa, H. N. Avoidance of anoxic water by tadpoles of *Rana temporaria* / H. N. Costa // Hydrobiologia. – 1967. – Vol. 30, N 3–4. – P. 374–384. <https://doi.org/10.1007/bf00964023>
- Формирование направленной географической изменчивости особенностей жизненного цикла бурых лягушек / С. М. Ляпков [и др.] // Совр. герпетология. – 2009. – Т. 9, № 3/4. – С. 103–121.

19. Эффект группы в популяциях водных животных и химическая экология / С. С. Шварц [и др.]. – М.: Наука, 1976. – 152 с.
20. Пикулик, М. М. Экспериментальное изучение роста и развития личинок амфибий в природе / М. М. Пикулик // Вопросы герпетологии : автореф. докл.: четвертая всесоюз. герпетол. конф., Ленинград, 1–3 февр. 1977 г. / Акад. наук СССР, Зоол. ин-т; отв. ред. И. С. Даревский. – Л., 1977. – С. 169–170.
21. Астрадамов, В. И. К экологии и поведению бесхвостых амфибий / В. И. Астрадамов, Г. И. Алышева // Эколого-фаунистические исследования в Нечерноземной зоне РСФСР: межвуз. сб. науч. тр. / Мордов. гос. ун-т им. Н. П. Огарева; редкол.: Душин А. И. (отв. ред.) [и др.]. – Саранск, 1979. – С. 64–76.
22. Ищенко, В. Г. Внутрипопуляционная изменчивость скорости роста и развития личинок остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilss.) / В. Г. Ищенко, Е. Л. Шупак // Популяционные механизмы динамики численности животных: сб. ст. / отв. ред. Л. Н. Добринский, Л. М. Сюзюмова. – Свердловск, 1979. – С. 49–60. – (Тр. Ин-а экологии растений и животных / Акад. наук СССР, Урал. филиал; вып. 126).
23. Ищенко, В. Г. Хронографическая изменчивость пространственной структуры популяции остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilss.) и ее возможные экологические последствия / В. Г. Ищенко // Динамика популяционной структуры млекопитающих и амфибий: сб. ст. / АН СССР, Урал. науч. центр; отв. ред. Л. Н. Добринский. – Свердловск, 1982. – С. 23–49.
24. Шварц, С. С. Регуляторы роста и развития личинок земноводных. 1. Специфичность действия / С. С. Шварц, О. А. Пястолова // Экология. – 1970. – № 1. – С. 77–82.
25. Пикулик, М. М. Земноводные Белоруссии / М. М. Пикулик. – Минск: Наука и техника, 1985. – 189 с.
26. Земноводные Беларуси: распространение, экология и охрана / С. М. Дробенков [и др.]. – Минск: Белорус. наука, 2006. – 215 с.
27. Кузьмин, С. Л. Земноводные бывшего СССР / С. Л. Кузьмин. – Изд. 2-е, перераб. – М.: Т-во науч. изд. КМК, 2012. – 369 с.
28. Хейер, В. Р. Измерение и мониторинг биологического разнообразия: стандартные методы для земноводных / Р. В. Мак Дайермид [и др.]; под ред. С. Л. Кузьмина. – М.: Изд-во КМК, 2003. – 380 с.
29. Bachmann, K. Temperature adaptation of *Amphibia* embryos / K. Bachmann // Am. Nat. – 1969. – Vol. 103, N 930. – P. 115–130.
30. Кузьмин, С. Л. Трофология хвостатых земноводных: экологические и эволюционные аспекты / С. Л. Кузьмин. – М.: Наука, 1992. – 168 с.
31. Корзиков, В. А. Трофология пяти видов личинок бесхвостых амфибий из разных местообитаний северо-запада Верхнего Поочья / В. А. Корзиков, А. М. Глущенко, А. Б. Ручин // Совр. герпетология. – 2014. – Т. 14, № 3–4. – С. 119–125.
32. Сурова, Г. С. Действие хищников на личинок остромордой лягушки (*Rana arvalis*) в естественных условиях / Г. С. Сурова // Зоол. журн. – 1990. – Т. 69, вып. 10. – С. 86–97.

## References

- Severtsov S. A. *Population dynamics and adaptive evolution of animals*. Moscow, Leningrad, Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1941. 316 p. (in Russian).
- Svetlov P. G. The theory of critical periods of development and its significance for understanding the principles of the action of the environment on ontogenesis. *Voprosy tsitologii i obshchei fiziologii: sbornik statei, posvyashchennyi pamyati D. N. Nasonova* [Questions of cytology and general physiology: a collection of articles dedicated to the memory of D. N. Nasonov]. Moscow, Leningrad, 1966, pp. 263–274 (in Russian).
- Neyfakh A. A. Comparative radiation study of the morphogenetic function of nuclei in the development of animals. *Zhurnal obshchei biologii* [Journal of general biology], 1961, vol. 22, no. 1, pp. 42–57 (in Russian).
- Dastugue G., Souquière J. *Les larves de batraciens, réactif biologique*. Paris, Maloine, 1942. 167 p.
- Shchupak E. L. *Development of moor frog tadpoles in natural reservoirs*. Sverdlovsk, 1969, vol. 3, pp. 17–19 (in Russian).
- Ishchenko V. G., Molov Zh. N. Spatial structure and productivity of the Asia Minor frog (*Rana macrocnemis*) population. *Materialy otchetnoi sessii Laboratorii populyatsionnoi ehkologii pozvonochnykh zhivotnykh. Vypusk 3* [Materials of the reporting session of the Laboratory of population ecology of vertebrate animals. Issue 3]. Sverdlovsk, 1979, pp. 61–74 (in Russian).
- Severtsov A. S., Surova G. S. The death of larvae of the common frog (*Rana temporaria*) and the factors that determine it. *Zoologicheskii zhurnal* [Zoological journal], 1979, vol. 58, no. 3, pp. 393–411 (in Russian).
- Calef G. W. Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora*. *Ecology*, 1973, vol. 54, no. 4, pp. 741–758 (in Russian). <https://doi.org/10.2307/1935670>
- Licht L. E. Palatability of *Rana* and *Hyla* eggs. *American Midland Naturalist*, 1969, vol. 82, no. 1, pp. 296–298. <https://doi.org/10.2307/2423845>
- Cecil S. G., Just J. J. Survival rate, population density and development of naturally occurring anuran larva (*Rana catesbeiana*). *Copeia*, 1979, vol. 1979, no. 3, pp. 447–453. <https://doi.org/10.2307/1443221>
- Bannikov A. G. The fluctuations in the number of tailless amphibians. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Reports of the USSR Academy of Sciences], 1948, vol. 61, no. 1, pp. 131–134 (in Russian).
- Terent'ev P. V. *The frog*. Moscow, Sovetskaya nauka Publ., 1950. 346 p. (in Russian).

13. Molov Zh. K., Ishchenko V. G. The biological productivity of the Asia Minor frog population. *Ekologiya* [Ecology], 1973, no. 3, pp. 95–97 (in Russian).
14. Brockelman W. Y. An analysis of density effects and predation in *Bufo americanus* tadpoles. *Ecology*, 1969, vol. 50, no. 4, pp. 632–644. <https://doi.org/10.2307/1936252>
15. Surova G. S., Severtsov A. S. Effects of predators on brown frogs larvae under experimental conditions. *Zoologicheskii zhurnal* [Zoological journal], 1988, vol. 67, no. 10, pp. 1509–1518 (in Russian).
16. Surova G. S. Influence of acidic environment on the viability of eggs of common frog (*Rana temporaria*). *Zoologicheskii zhurnal* [Zoological journal], 2002, vol. 81, no. 5, pp. 608–616 (in Russian).
17. Costa H. H. Avoidance of anoxic water by tadpoles of *Rana temporaria*. *Hydrobiologia*, 1967, vol. 30, no. 3–4, pp. 374–384. <https://doi.org/10.1007/bf00964023>
18. Lyapkov S. M., Kornilova M. B., Serbinova I. A., Korzun E. V., Novitskii R. V. Formation of directed geographic variability of features of the life cycle of brown frogs. *Sovremennaya gerpetologiya* [Modern herpetology], 2009, vol. 9, no. 3/4, pp. 103–121 (in Russian).
19. Shvarts S. S., Pyastolova O. A., Dobrinskaya L. A., Runkova G. G. *Group effect in aquatic animal populations and chemical ecology*. Moscow, Nauka Publ., 1976. 152 p. (in Russian).
20. Pikulik M. M. Experimental study of the growth and development of amphibian larvae in nature. *Voprosy gerpetologii: avtoreferaty dokladov, dolozhennykh ili predstavlenykh na Chetvertuyu Vsesoyuznuyu gerpetologicheskuyu konferentsiyu, Leningrad, 1–3 fevralya 1977 goda* [Herpetology issues: abstracts of reports reported or presented at the Fourth All-Union herpetological conference, Leningrad, February 1–3, 1977]. Leningrad, 1977, p. 169–170. (in Russian).
21. Astradamov V. I., Alysheva G. I. On the ecology and behavior of tailless amphibians. *Ekologo-faunisticheskie issledovaniya v Nechernozemnoi zone RSFSR: mezhvuzovskii sbornik nauchnykh trudov* [Ecological and faunal research in the non-chernozem zone of the RSFSR: interuniversity collection of scientific papers]. Saransk, 1979, pp. 64–76 (in Russian).
22. Ishchenko V. G., Shchupak E. L. Intrapopulation variability in the rate of growth and development of moor frog larvae (*Rana arvalis* Nilss.). *Populyatsionnye mekhanizmy dinamiki chislennosti zhivotnykh: sbornik statei. Vypusk 126* [Population mechanisms of animal population dynamics: collection of articles. Issue 126]. Sverdlovsk, 1979, pp. 49–60 (in Russian).
23. Ishchenko V. G. Chronographic variability of the spatial structure of the moor frog (*Rana arvalis* Nilss.) population and its possible ecological consequences. *Dinamika populyatsionnoi struktury mlekopitayushchikh i amfibi: sbornik statei* [Dynamics of the population structure of mammals and amphibians: a collection of articles]. Sverdlovsk, 1982, pp. 23–49 (in Russian).
24. Schwartz S. S., Pyastolova O. A. Regulators of growth and development of amphibian larvae. 1. Specificity of action. *Ekologiya* [Ecology], 1970, no. 1, pp. 77–82 (in Russian).
25. Pikulik M. M. *Amphibians of Belarus*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1985. 189 p. (in Russian).
26. Drobenkov S. V., Novitskii R. V., Pikulik M. M., Kosova L. V., Ryzhevich K. K. *Amphibians of Belarus: distribution, ecology and conservation*. Minsk, Belorusskaya nauka Publ., 2006. 215 p. (in Russian).
27. Kuz'min S. L. *Amphibians of the former USSR*. Moscow, Partnership of scientific publications KMK, 2012. 369 p. (in Russian).
28. Mak Daiermid R. V., Kheiek L. E., Kramp M. L., Donnelly M. A. *Measurement and monitoring of biological diversity: standard methods for amphibians*. Moscow, Partnership of scientific publications KMK, 2003. 380 p. (in Russian).
29. Bachmann K. Temperature adaptation of *Amphibia* embryos. *American Naturalist*, 1969, vol. 103, no. 930, pp. 115–130.
30. Kuz'min S. L. *Trophology of tailed amphibians: ecological and evolutionary aspects*. Moscow, Nauka Publ., 1992. 168 p. (in Russian).
31. Korzikov V. A., Glushchenko A. M., Ruchin A. B. Trophology of five species of tailless amphibian larvae from different habitats of the north-west of the Upper Poochye. *Sovremennaya gerpetologiya* [Modern herpetology], 2014, vol. 14, no. 3–4, pp. 119–125 (in Russian).
32. Surova G. S. Effect of predators on the larvae of moor frog (*Rana arvalis*) under natural conditions. *Zoologicheskii zhurnal* [Zoological journal], 1990, vol. 69, iss. 10, pp. 86–97 (in Russian).

### Информация об авторах

Корзун Егор Викторович – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natrrix109@gmail.com

Куликова Елена Александровна – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Elen.Kulikova@gmail.com

### Information about the authors

Jahor V. Korzun – Senior 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: natrrix109@gmail.com

Alena A. Kulikova – Senior 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: Elen.Kulikova@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 634.11:575.174.015.3:577.21

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-57-67>

Поступила в редакцию 05.05.2023

Received 05.05.2023

**Е. А. Фомина<sup>1</sup>, А. Н. Заинчковская<sup>1</sup>, П. В. Кузмицкая<sup>1</sup>, О. Ю. Урбанович<sup>1</sup>,  
П. А. Пашкевич<sup>2</sup>, Л. С. Сидор<sup>2</sup>, Б. Ю. Аношенко<sup>2</sup>, Л. В. Гончарова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДЕРЕВЬЕВ ЯБЛОНИ СТАРОГО ПЛОДОВОГО САДА ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

**Аннотация.** На основе секвенированной последовательности генома яблоки сорта Golden Delicious, нуклеотидная последовательность которого находится в базе данных GenBank, *in silico* был проведен дизайн молекулярных маркеров SSR типа, которые ограничивают область тетра- и гексануклеотидных повторов. Отобраны наиболее информативные из них, которые показали четкие пики на капиллярном электрофорезе и позволили выявить высокий уровень полиморфизма отдельных областей генома яблоки. Разработанные SSR-маркеры можно эффективно использовать для оценки генетического разнообразия и ДНК-идентификации сортов яблоки, установления сортового соответствия. Данные маркеры были применены для анализа генетического разнообразия деревьев яблоки старого плодового сада Центрального ботанического сада (ЦБС) НАН Беларуси, посадка деревьев в котором осуществлялась с 1932 по 1940 г. Показано, что растущие в саду деревья генетически близки как к старинным местным сортам, так и к отдельным иностранным. Установлено, что среди деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси представлены такие сорта, как Антоновка обыкновенная, Минское, Папировка, Уэлси, Мельба, Богатырь. Полученные результаты будут использованы для сохранения генетических ресурсов ценной для страны плодовой культуры, которой является яблока, а также для разработки дизайн-проекта новой коллекции-экспозиции плодовых растений при реконструкции участка старых насаждений.

**Ключевые слова:** яблока, SSR-маркеры, ДНК-идентификация, аллель, генетическое разнообразие

**Для цитирования:** Генетическое разнообразие деревьев яблоки старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси / Е. А. Фомина [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 57–67. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-57-67>

**Alena A. Famina<sup>1</sup>, Anna N. Zainchkovskaya<sup>1</sup>, Polina V. Kuzmitskaya<sup>1</sup>, Oksana Yu. Urbanovich<sup>1</sup>,  
Pavel A. Pashkevich<sup>2</sup>, Larisa S. Sidor<sup>2</sup>, Boris Yu. Anoshenko<sup>2</sup>, Lyudmila V. Goncharova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## GENETIC DIVERSITY OF APPLE TREES IN THE OLD ORCHARD OF THE CENTRAL BOTANICAL GARDEN OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

**Abstract.** Based on the sequence of the Golden Delicious apple genome, whose nucleotide sequence is located in the GenBank database, the design of molecular markers of SSR type that limit the area of tetra- and hexanucleotide repeats was carried out *in silico*. The most informative of them were selected, which showed clear peaks on capillary electrophoresis and made it possible to reveal a high level of polymorphism in certain apple genome regions. The developed SSR markers can be effectively used for the genetic diversity assessment and DNA identification of apple varieties, establishment of the varietal correspondence. These markers were used to analyze the genetic diversity of apple trees in the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (CBG) where trees were planted from 1932 to 1940. It is shown that the trees growing in the garden are genetically close to old local varieties, as well as to individual foreign ones. It is established that among the trees of the CBG old orchard there are such varieties as Antonovka obyknovennaya, Minskoe, Papirovka. Wealthy, Melba, Bogatyr'. The obtained results will be used to save the genetic resources of the fruit crop valuable for the country, which is an apple tree, as well as to develop a design project of a new fruit plants collection-exposition when reconstructing the area of old plantings.

**Keywords:** apple tree, SSR markers, DNA identification, allele, genetic diversity

**For citation:** Famina A. A., Zainchkovskaya A. N., Kuzmitskaya P. V., Urbanovich O. Yu., Pashkevich P. A., Sidor L. S., Anoshenko B. Yu., Goncharova L. V. Genetic diversity of apple trees in the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 57–67 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-57-67>

**Введение.** Яблоня (*Malus × domestica* Borkh.) возделывается человеком более 4 тыс. лет и является одной из важнейших плодовых культур в странах с умеренным климатом. За это время создано более 10 тыс. сортов этой ценной культуры, различающихся по происхождению, морфологическим признакам, хозяйственным и биологическим свойствам. Необходимым элементом селекции яблони является идентификация сортов. Она проводится главным образом по морфологическим признакам и биохимическому составу плодов. Развитие технологии молекулярных маркеров позволяет дополнить традиционные методы идентификации сортов новыми молекулярными методами, которые имеют ряд существенных преимуществ [1].

В настоящее время для идентификации сортов яблони в большинстве случаев используются SSR-маркеры, созданные на основе динуклеотидных повторов [2–6]. Однако использование таких маркеров имеет определенные недостатки, в частности трудности при визуализации продуктов амплификации на секвенаторе. Определенную помощь в усовершенствовании SSR-анализа может оказать создание маркеров, ограничивающих повторы с более сложной организацией повторяющегося мотива. Они обладают большей точностью и надежностью, лучше подходят для практического использования [7].

Цель данного исследования – разработка EST-SSR-маркеров, ограничивающих простые повторы с тетра- и гекса-повторяющимися мотивами в геноме яблони. Такие маркеры более удобны для ДНК-идентификации и позволяют более точно определять длины аллелей SSR-локусов. С их помощью проведена оценка генетического разнообразия деревьев яблони, произрастающих на территории старого плодового сада Центрального ботанического сада (ЦБС) НАН Беларуси.

**Материалы и методы исследования.** На основе нуклеотидной последовательности генома яблони сорта Golden Delicious, находящейся в базе данных GenBank, был проведен дизайн 32 пар праймеров, подобранных к отдельным регионам 1–17-й хромосомы. Поиск повторов выполняли с помощью программы Unipro UGENE [8]. Разработанные праймеры ограничивали область генома, включающую простой повтор с длиной повторяющейся единицы не меньше 4 нуклеотидов.

Для проведения исследования была создана коллекция, включающая ДНК 25 сортов яблони домашней разного генетического происхождения и 101 образец деревьев старого плодового сада, растущих на территории ЦБС НАН Беларуси. Препараты ДНК были получены из почек отдельного растения. Для выделения ДНК использовали Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, ЕС), руководствуясь рекомендованным протоколом.

Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл имела следующий состав: 67 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 16 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 мМ dNTP; 250 нМ прямого и обратного праймеров, 50 мкг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: 94 °С – 4 мин; 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин; 1 цикл: 72 °С – 7 мин. Продукты амплификации разделяли на секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 («Синтол», Россия). Форвард праймер каждого маркера был мечен одним из флуоресцентных красителей (FAM, R6G, TAMRA, ROX), что позволило проводить анализ продуктов амплификации, полученных в результате реакции мультиплекса.

Для оценки уровня полиморфизма и информативности маркеров использовали несколько параметров, которые были рассчитаны для каждого локуса микросателлитных последовательностей отдельно. Так, частоту встречаемости аллелей рассчитывали как отношение доли каждого аллеля к общему их количеству; долю уникальных генотипов – как отношение количества генотипов, обладающих уникальным составом SSR-аллелей, к общему их количеству.

Уровень наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) рассчитывали для каждого локуса отдельно как отношение числа гетерозигот к общему количеству исследованных образцов, а уровень ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) для каждого локуса – как  $H_e = 1 - \sum(p_i)^2$ , где  $p_i$  – частота встречаемости  $i$ -го аллеля.

Эффективное число аллелей ( $N_e$ ) рассчитывали по формуле  $N_e = 1/(1 - H_e)$  [9].

Для расчета индекса Райта ( $F$ ) использовали значения аллельных частот, а также показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности:  $F = 1 - H_o/H_e$ .

Величину информационного полиморфизма маркеров (*PIC*) вычисляли по формуле

$$PIC = 1 - \sum(p_i)^2,$$

где  $p_i$  – частота *i*-го аллеля [10].

Дискриминационную силу маркера (*PD*) рассчитывали по формуле

$$PD = 1 - \sum(g_i)^2,$$

где  $g_i$  – частота встречаемости *i*-го генотипа [11].

Количественный неиерархический кластерный анализ осуществляли методом Байеса с использованием программы Structure 2.3.4 [12]. В данной программе путем байесовского анализа методом марковских цепей Монте-Карло на основании расчета частот аллелей в каждой из генетически обособленных групп оценивали вероятность разбиения выборки на *K* популяций. Для анализа использовали модель генетического смешения (*admixture*). Для определения количества генетически однородных групп и вычисления  $\Delta K/K$  использовали ресурс Structure Harvester [13], на котором реализован метод Evanno [14]. В проведенном нами анализе число предполагаемых кластеров (*K*) варьировалось от 1 до 10, длина *burn-in* периода была равна 3, количество Марковских цепей Монте-Карло – 1 000, для *K* была сделана 1 итерация.

**Результаты и их обсуждение.** На основании анализа сиквенса генома яблони, представленного в базе данных GenBank, был проведен дизайн праймеров, ограничивающих микросателлитные повторы с длиной повторяющегося мотива больше четырех нуклеотидов. При проведении анализа информативности разработанных SSR-маркеров установлено, что не все маркеры удовлетворяют необходимым требованиям (в частности, не позволяют выявлять полиморфные аллели в исследуемых локусах микросателлитных последовательностей, показывают нечеткие фрагменты при разделении на секвенаторе, не дают возможности оценить данные в мультиплексной ПЦР-реакции). Праймеры, не отвечающие необходимым требованиям, были исключены из дальнейшего исследования (данные не представлены). По результатам анализа было отобрано 8 пар молекулярных маркеров-кандидатов, расположенных на разных хромосомах генома яблони: MC11L02, MC03L1, MC06L2, MC17L01, MC10L1, MC08L01, MC04L1, MC09L04 (табл. 1). Шесть разработанных маркеров содержат тетра-нуклеотидный повторяющийся мотив, два маркера ограничивают гексануклеотидные повторы. Данные маркеры показали четкие пики после разделения продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза на секвенаторе

Т а б л и ц а 1. EST-SSR-маркеры, ограничивающие простые повторы с тетра- и гекса-повторяющимся мотивом в геноме яблони, и места их локализации на хромосомах

Table 1. EST-SSR markers limiting simple repeats with tetra- and hexa-repeated motif in the apple genome and their localization on chromosomes

Маркер	Хромосома	Последовательность праймеров 5'- 3'	Повторяющийся мотив
MC11L02	11	F: TACTCTCTCCGCCTGCTTT R: CGTCAACATCATCATCATATCTTTC	TTCT
MC03L1	3	F: TCAGGAAAATGCCAGTCCTC R: CCACTCGGGGTATTTGACTG	CCTGCA
MC06L2	6	F: TCCTCCGTCGTCTTGAGTCT R: GGTGCGGTGCTTGAAAGA	CTGCCT
MC17L01	17	F: CAGAGTTCCTAACCCACCA R: CCAACAAGCCACTGTGAAAA	TCCA
MC10L1	10	F: CGTAATTCGGAAAATGTTAATGTTG R: GATGATCACCATGCTGCACT	AAAC
MC08L01	8	F: TGGATATGCCATAATGAAATCTG R: AGTTTGAAGTGGGGCGTTAC	TGTA
MC04L1	4	F: ACTCAGGACCGGCTCAACTA R: ATGCACATTACGCTGTCTGC	TACA
MC09L04	9	F: GAGACGTACCCCAAGGACAA R: GGGACAATTCCGCTCTTTTCA	CATA

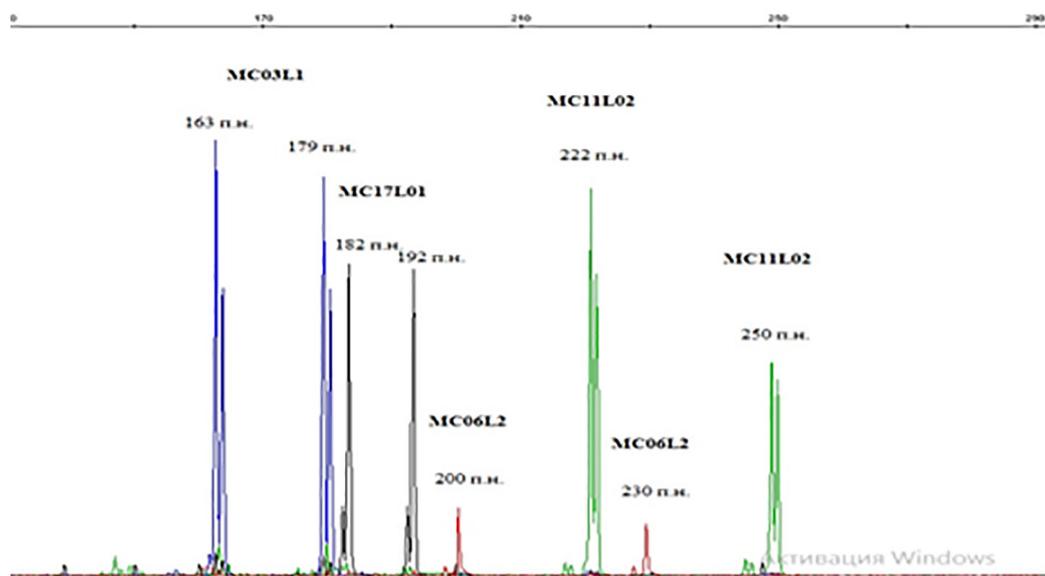


Рис. 1. Аллели индивидуального дерева № 86 старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси, выявленные с помощью маркеров MC011L02 (метка R6G), MC06L2 (метка ROX), MC03L1 (метка FAM) и MC17L04 (метка TAMRA) после разделения фрагментов амплификации методом капиллярного электрофореза. Цифрами над пиками обозначена длина аллелей, п. н.

Fig. 1. Alleles of individual tree No. 86 of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, identified using markers MC011L02 (R6G label), MC06L2 (ROX label), MC03L1 (FAM label) and MC17L04 (TAMRA label) after capillary electrophoresis separation of amplification fragments. The numbers above the peaks indicate the length of alleles, bp

(рис. 1). Они не демонстрируют «лестницу пиков», характерную для динуклеотидных повторов, в том числе у яблони [15].

Эффективность применения молекулярных маркеров для генетического исследования по ДНК-идентификации сортов определяется несколькими параметрами. Один из них – количество выявляемых аллелей. Чем более разнообразен состав аллелей, выявляемый с помощью молекулярного маркера в популяции исследуемых генотипов, тем выше его эффективность для оценки генетического разнообразия. С помощью 8 разработанных SSR-маркеров у индивидуальных деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси выявлено в общей сложности 78 аллелей, в среднем 9,75 аллеля на локус (рис. 2, табл. 2). Наибольшее количество аллелей представлено в локусах MC06L2 и MC04L1 – 16 и 14 соответственно. Данный показатель различается для каждого вида растений в зависимости от уровня генетического разнообразия вида, объема проанализированной выборки и ряда других параметров [1, 16, 17]. У представителей как современных, так и старинных сортов яблони он может различаться [15]. Так, например, среди 292 генотипов старых яблонь, отобранных в садах на территории Литвы, с помощью 7 SSR-маркеров был выявлен 81 полиморфный аллель [5].

$H_e$  в среднем составил 0,243,  $H_o$  – 0,713,  $N_e$  – 1,430. В среднем значение  $F$  составило 2,493, что указывает на избыток гетерозигот среди исследуемых генотипов. Поддержанию высокого уровня гетерозиготности способствует перекрестное опыление яблони, а механизмы самонесовместимости препятствуют самоопылению. Сорта яблонь в основном получают в результате перекрестного опыления. Ряд сортов является межвидовыми гибридами. Дискриминационная сила маркера варьировалась от 0,629 для маркера MC17L01 до 0,948 для маркера MC04L1 и в среднем составила 0,847. Поскольку маркер MC08L01 является полилокусным, расчет для него значений  $H_o$ ,  $H_e$ ,  $N_e$ ,  $F$ , а также  $PD$  не представлялся возможным. В целом показатели, отражающие информативность разработанных молекулярных маркеров, достаточно высокие по сравнению с другими маркерами, используемыми для генетической характеристики генотипов яблони различного генетического происхождения [2, 7, 18, 19].

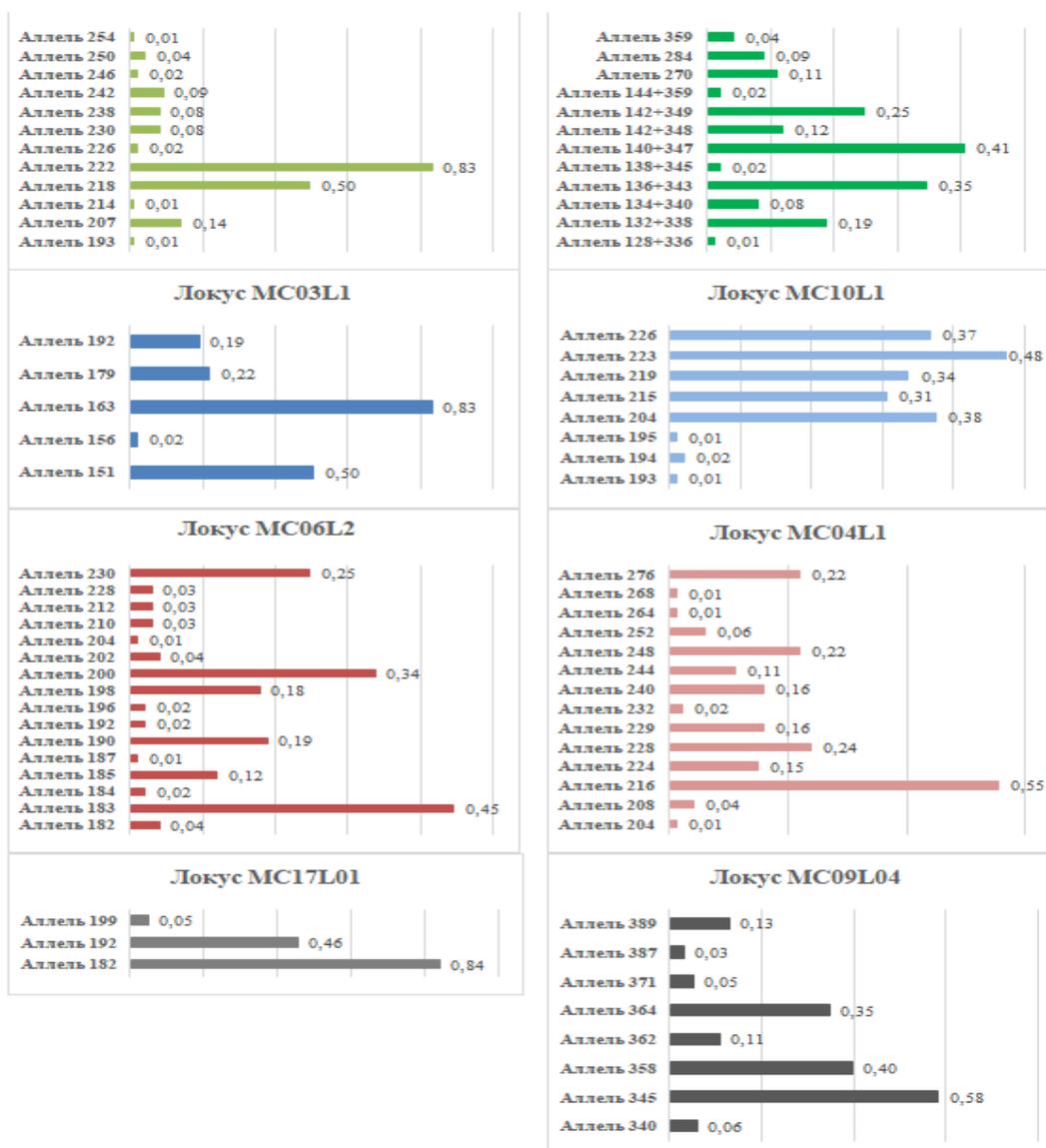


Рис. 2. Частота встречаемости SSR-аллелей в образцах деревьев яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси

Fig. 2. Occurrence frequency of SSR alleles in the samples of the apple trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

Таблица 2. Аллели микросателлитных локусов, количество уникальных генотипов, уровни ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности, эффективное число аллелей ( $N_e$ ), индекс Райта ( $F$ ), дискриминационная сила маркера ( $PD$ ) индивидуальных деревьев яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси

Table 2. Alleles of microsatellite loci, number of unique genotypes, levels of expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity, effective number of alleles ( $N_e$ ), Wright index ( $F$ ), marker discrimination power ( $PD$ ) of individual apple trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

SSR-маркер	Варьирование размера фрагментов амплификации, п. н.	Кол-во аллелей	Кол-во уникальных генотипов	$H_o$	$H_e$	$N_e$	$F$	$PD$
MC11L02	193–254	12	19	0,772	0,021	1,021	-35,986	0,833
MC03L1	151–192	5	8	0,743	-0,030	0,971	25,836	0,774
MC06L2	182–230	16	32	0,713	0,538	2,167	-0,324	0,931
MC17L01	182–199	3	6	0,337	0,082	1,089	-3,113	0,629
MC10L1	193–226	8	17	0,842	0,290	1,409	-1,899	0,917
MC08L01	128–359	12	29	-	-	-	-	-
MC04L1	204–276	14	32	0,901	0,451	1,823	-0,996	0,948
MC09L04	340–389	8	18	0,683	0,347	1,530	-0,971	0,900
Среднее значение		9,75	20,13	0,713	0,243	1,430	-2,493	0,847

Разработанные SSR-маркеры были применены для оценки генетического разнообразия деревьев старого плодового сада, растущих на территории ЦБС НАН Беларуси. Коллекция представлена 101 деревом, сортовая принадлежность которых неизвестна. Результаты SSR-анализа показали, что 30 деревьев имели уникальные генотипы, не встречающиеся у других деревьев (рис. 3). Генотипы 71 дерева могли встречаться в повторностях у двух и более деревьев, в связи с чем число уникальных генотипов среди них составило 25. Так, например, идентичными оказались деревья № 25–29 (выделены на рис. 3 одним цветом) и деревья № 51, 52, 53, 79, 83. Сравнение схемы посадки с данными генетического анализа показывает, что часть деревьев в саду была высажена в повторностях в рядах по три штуки. Но эта тенденция не распространяется на весь сад. По всей видимости, за продолжительное время выращивания сада часть деревьев погибла и могла быть заменена другими сортами или гибридным материалом.

Ряд	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1	12	13	27		38	39	50	51	62	63	75	76	87			95	
2	2	11	14	26	28	37	40	49	52	61	64	74	77	86	88			
3	3		15	25	29	36	41	48	53	60	65	73	78	85	89	94	96	101
4	4		16	24	30			47	54		66	72	79	84	90		97	100
5	5	10	17	23	31			46	55	59	67	71	80	83				
6	6	9	18	22	32	35	42	45	56	58		70		82		93		99
7	7	8	19	21	33	34	43	44	57		68	69		81	92	92		98

Рис. 3. Схема расположения деревьев старого плодового сада НАН Беларуси. Цифры на схеме соответствуют номеру дерева. Номера деревьев, отнесенные к одному генотипу, выделены одним цветом. Не выделены цветом номера деревьев, генотип которых встречается один раз. Пустые квадраты означают отсутствие насаждений

Fig. 3. Tree location scheme in the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. The numbers on the scheme correspond to the tree number. Tree numbers assigned to the same genotype are highlighted in one color. The numbers of trees, whose genotype occurs once, are not highlighted in color. Empty squares mean no plantings

Для оценки генетического разнообразия деревьев яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси данные SSR-анализа оценивали с помощью программы Structure. Результаты представлены на рис. 4. С использованием алгоритма программы Structure было выявлено, что подвергшиеся анализу деревья яблони отличаются высоким уровнем генетического разнообразия, при этом отдельные группы деревьев имеют общее происхождение. Так, при  $K = 8$  в кластер, обозначенный красным цветом, вошли деревья, относящиеся к сорту Мельба. Кластер с аллелями, обозначенными преимущественно зеленым цветом, включает крэбы (Crab apples). Синим цветом обозначен кластер, в который вошли старинный сорт США Уэлси и сорт белорусской селекции Минское, полученный в результате свободного опыления сорта Уэлси. Происхождение Уэлси неизвестно. Предполагается, что он мог произойти в результате свободного опыления сорта Боровинка. Результаты, представленные на рис. 4, говорят в пользу этого предположения. Старинным сортам, таким как Штрейфлинг, Чулановка, Макинтош, близки по составу аллелей 24 дерева старого плодового сада (желтый цвет на рис. 4). В то же время состав аллелей таких старинных сортов, как Пепин литовский и Черное дерево, указывает на их большую отдаленность от этого кластера. Аллели, свойственные им, а также генетически близким к ним деревьям, выделены розовым цветом.

Результаты показывают, что часть деревьев плодового сада генетически близка к старинному русскому сорту Антоновка обыкновенная (голубой цвет на рис. 4). По всей видимости, этот сорт, повсеместно выращиваемый ранее в стране и характеризующийся высокой зимостойкостью

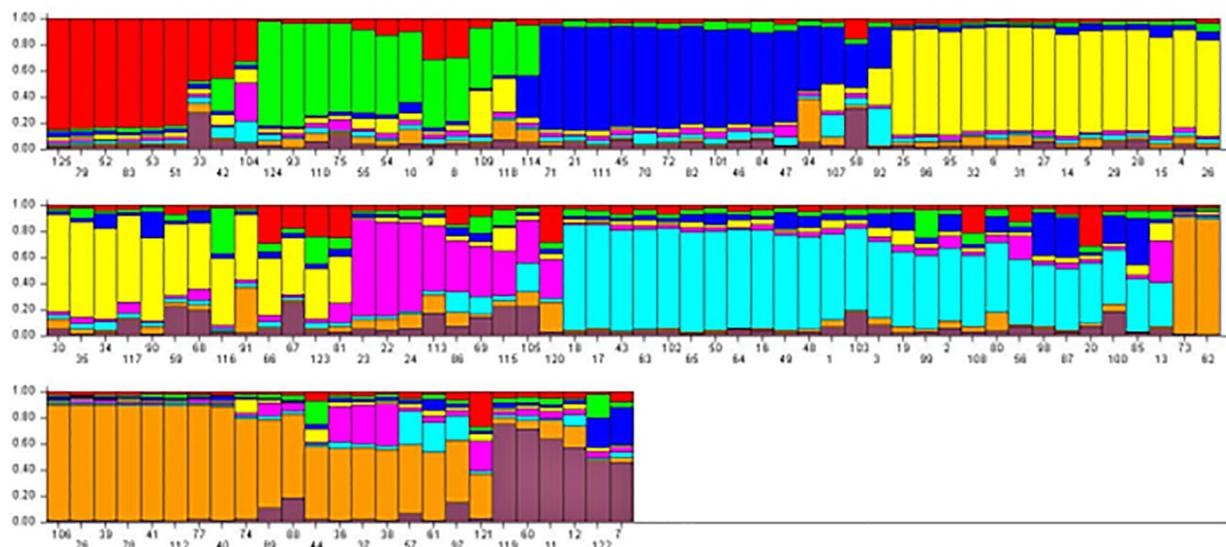


Рис. 4. Результаты кластеризации деревьев яблони, полученные с помощью программы Structure v. 2.3.4 (K = 8): 1–101 – номера деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси; референсные сорта: 102 – Антоновка обыкновенная, 103 – Антоновка белая, 104 – Банановое, 105 – Белорусский синап, 106 – Белый налив, 107 – Боровинка, 108 – Коробовка крупноплодная, 109 – Коштеля, 110 – Креб, 111 – Минское, 112 – Папировка, 113 – Пепин литовский, 114 – Серуэл, 115 – Черное дерево, 116 – Чулановка, 117 – Штрейфлинг, 118 – Discovery, 119 – Empire, 120 – Golden Delicious, 121 – Gravenstein, 122 – Idared, 123 – McIntosh, 124 – Red Silver, 125 – Мельба

Fig. 4. Results of apple tree clustering obtained using the program Structure v. 2.3.4 (K = 8): 1–101 – numbers of the trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus; reference varieties: 102 – Antonovka obyknovennaja, 103 – Antonovka belaja, 104 – Bananovoe, 105 – Belorusskij sinap, 106 – Belyj naliv, 107 – Borovinka, 108 – Korobovka krupnoplodnaja, 109 – Koshtelja, 110 – Kreb, 111 – Minskoe, 112 – Papirovka, 113 – Pepin litovskij, 114 – Serujel, 115 – Chernoe derevo, 116 – Chulanovka, 117 – Shtrejfling, 118 – Discovery, 119 – Empire, 120 – Golden Delicious, 121 – Gravenstein, 122 – Idared, 123 – McIntosh, 124 – Red Silver, 125 – Melba

и устойчивостью к болезням, мог встречаться в родословной деревьев, входящих в данный кластер. Антоновка обыкновенная встречается в родословной многих современных сортов (<https://vniispk.ru/>). Данный сорт широко использовался в селекционных программах России и Беларуси [17]. В другой обширный кластер (оранжевый цвет на рис. 4) вошли старинные сорта Папировка и Белый налив. Результаты анализа показывают, что часть деревьев плодового сада генетически близка к этим распространенным в нашей стране сортам.

На основании полученных данных о составе SSR-аллелей в геноме индивидуальных деревьев составлены молекулярно-генетические паспорта деревьев яблони, растущих в старом плодном саду ЦБС НАН Беларуси (см. табл. 3). Их сравнение с молекулярно-генетическими формулами старых сортов, представленных в коллекции ДНК Института генетики и цитологии НАН Беларуси, позволило определить, что дерево № 7 относится к сорту Богатырь, деревья № 45, 46, 47 – к сорту Уэлси, № 43 – к сорту Антоновка обыкновенная, № 51, 52, 53, 79, 83 – к сорту Мельба, № 70, 71, 72 – к сорту Минское, № 73, 76, 77, 78 – к сорту Папировка.

Определение сортовой принадлежности деревьев в старинных садах имеет важное значение для сохранения генетических ресурсов и развития селекционных программ [20, 21]. Так, в старинных плодовых садах Литвы при анализе 292 деревьев удалось определить 12 сортов. Ими оказались распространенные в этом регионе старинные сорта, включая сорт Коробовка [5]. Однако точная идентификация сортовой принадлежности генотипов старых деревьев, особенно в локальных популяциях, далеко не всегда возможна [5]. Этому препятствует отсутствие референсных генотипов, относительно которых можно провести сравнение, так как часть старых сортов или образцов могла не сохраниться до настоящего времени либо не попала в поле зрения исследователей. Кроме того, некоторые деревья могут являться не сортами, а неизвестными гибридами, возникновение которых уже невозможно проследить.

Т а б л и ц а 3. Молекулярно-генетические формулы 101 индивидуального дерева яблони старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси, полученные с помощью 8 SSR-маркеров

T a b l e 3. Molecular genetic formulas of 101 individual apple trees of the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus obtained using 8 SSR markers

№ дерева	Формула сорта
1, 2, 3	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>190, 230</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>215, 226</sub> E <sub>142, 348</sub> Ж <sub>216, 276</sub> З <sub>340, 358</sub>
4, 5, 6	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>185, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204</sub> E <sub>140, 284, 347</sub> Ж <sub>244, 276</sub> З <sub>345</sub>
7	A <sub>218, 226</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>183, 204</sub> Г <sub>182, 199</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>136, 142, 343, 349</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>364, 389</sub>
8, 9	A <sub>218, 238</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>228</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>136, 270, 343</sub> Ж <sub>208</sub> З <sub>345, 358</sub>
10	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>136, 138, 140, 343, 345, 347</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 364</sub>
11, 12	A <sub>222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>185, 198</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>228, 248</sub> З <sub>345</sub>
13	A <sub>222, 230</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>190, 230</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>204, 226</sub> E <sub>132, 338, 359</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>345, 358</sub>
14, 15	A <sub>230, 242, 250</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>200, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 219, 226</sub> E <sub>140, 347, 359</sub> Ж <sub>216, 240, 244</sub> З <sub>364</sub>
16, 17, 18	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>132, 134, 338, 340</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>364</sub>
19	A <sub>218, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>132, 140, 338, 347</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>362, 364</sub>
20	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 226</sub> E <sub>132, 338</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>364</sub>
21	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>200, 212</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 348</sub> Ж <sub>224, 240</sub> З <sub>345, 389</sub>
22, 23, 24	A <sub>222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>198, 230</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>229, 276</sub> З <sub>345, 358</sub>
25, 26, 27, 28, 29	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 226</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>216, 240</sub> З <sub>345, 389</sub>
30, 31, 32	A <sub>222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>134, 140, 340, 347</sub> Ж <sub>216, 244</sub> З <sub>358, 371</sub>
33	A <sub>222, 254</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183, 228</sub> Г <sub>182, 199</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>136, 142, 343, 348</sub> Ж <sub>229, 240</sub> З <sub>364</sub>
34	A <sub>218, 222, 250</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>140, 347, 359</sub> Ж <sub>216, 268</sub> З <sub>345, 362, 389</sub>
35	A <sub>218</sub> B <sub>163</sub> B <sub>182, 200</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>219, 226</sub> E <sub>134, 140, 340, 347</sub> Ж <sub>232, 240</sub> З <sub>364, 389</sub>
36, 37, 38	A <sub>207, 222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>198, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 219</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>228, 276</sub> З <sub>340, 358</sub>
39, 40, 41, 62	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>228</sub> З <sub>345, 358</sub>
42	A <sub>222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 202</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>142, 348</sub> Ж <sub>208, 240</sub> З <sub>364</sub>
43	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>132, 142, 338, 348</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>358, 364</sub>
44	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>208, 248</sub> З <sub>364</sub>
45, 46, 47	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>200</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 349</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>345</sub>
48, 49, 50	A <sub>222, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>132, 142, 338, 349</sub> Ж <sub>216, 276</sub> З <sub>358, 362</sub>
51, 52, 53, 79, 83	A <sub>222, 238</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 226</sub> E <sub>136, 142, 343, 349</sub> Ж <sub>229, 248</sub> З <sub>345, 364</sub>
54, 55	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>202</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>364</sub>
56	A <sub>214, 218</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>132, 338</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>358</sub>
57, 61	A <sub>222, 246</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>140, 142, 347, 349</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 358</sub>
58	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>190, 198</sub> Г <sub>182, 199</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>142, 144, 348, 359</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>364, 371</sub>
59	A <sub>222, 230</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 226</sub> E <sub>284</sub> Ж <sub>228, 248</sub> З <sub>345</sub>
60	A <sub>222, 226</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>183, 198</sub> Г <sub>192, 199</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>144, 359</sub> Ж <sub>228, 229</sub> З <sub>358, 389</sub>
63, 64, 65	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 219</sub> E <sub>132, 142, 338, 349</sub> Ж <sub>216, 252</sub> З <sub>345, 387</sub>
66, 67	A <sub>222, 230</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>226</sub> E <sub>136, 284, 343</sub> Ж <sub>248</sub> З <sub>345, 362</sub>
68	A <sub>222</sub> B <sub>151</sub> B <sub>185, 190</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>228, 276</sub> З <sub>345, 389</sub>
69	A <sub>218</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>132, 136, 338, 343</sub> Ж <sub>229, 248</sub> З <sub>358</sub>
70, 71, 72	A <sub>218</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>190, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>142, 349</sub> Ж <sub>224, 248</sub> З <sub>345, 364</sub>
73, 76, 77, 78	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>200, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>140, 347</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>358</sub>
74	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215, 223, 226</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>228, 244, 264</sub> З <sub>345, 358</sub>
75	A <sub>193, 218, 222, 238</sub> B <sub>151, 156, 179, 192</sub> B <sub>183, 185, 187, 196</sub> Г <sub>182, 192, 199</sub> Д <sub>194, 195, 204, 223</sub> E <sub>136, 138, 140, 343, 345, 347</sub> Ж <sub>204, 240, 276</sub> З <sub>362, 364</sub>
80, 100	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>192, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>132, 142, 338, 349</sub> Ж <sub>216, 240</sub> З <sub>345, 358</sub>
81	A <sub>218, 230</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>200, 202</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>216, 229</sub> З <sub>364</sub>
82, 84	A <sub>218, 222</sub> B <sub>151, 179</sub> B <sub>183, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 348</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>345, 389</sub>
85, 87	A <sub>218, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204</sub> E <sub>142, 349</sub> Ж <sub>252, 276</sub> З <sub>362, 364</sub>

№ дерева	Формула сорта
86	A <sub>222, 250</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>200, 230</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 219</sub> E <sub>132, 136, 338, 343</sub> Ж <sub>229, 240</sub> З <sub>345, 364</sub>
88, 89	A <sub>222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 230</sub> Г <sub>182, 192</sub> Д <sub>204, 223</sub> E <sub>136, 140, 343, 347</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 358</sub>
90	A <sub>222, 230</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>183, 210, 230</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>223, 226</sub> E <sub>134, 140, 270, 340, 347</sub> Ж <sub>216, 224, 244</sub> З <sub>364, 371</sub>
91	A <sub>222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>184, 200</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>140, 284, 347</sub> Ж <sub>232, 244</sub> З <sub>345, 358, 364</sub>
92	A <sub>218, 242</sub> B <sub>151, 163</sub> B <sub>182, 184</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 219</sub> E <sub>142, 349</sub> Ж <sub>252, 276</sub> З <sub>362, 364</sub>
93	A <sub>222</sub> B <sub>156, 163</sub> B <sub>196</sub> Г <sub>196</sub> Д <sub>193, 194</sub> E <sub>128, 140, 336, 347</sub> Ж <sub>216</sub> З <sub>345</sub>
94	A <sub>207, 222</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>200, 210, 212</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>215, 219</sub> E <sub>142, 348</sub> Ж <sub>216, 240</sub> З <sub>358</sub>
95, 96	A <sub>222</sub> B <sub>163, 192</sub> B <sub>182</sub> Г <sub>182</sub> Д <sub>204, 226</sub> E <sub>140, 284, 347</sub> Ж <sub>248, 276</sub> З <sub>345</sub>
97	A <sub>222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>198, 200</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>204, 215</sub> E <sub>136, 343</sub> Ж <sub>216, 248</sub> З <sub>345, 358</sub>
98	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163, 179</sub> B <sub>190, 200</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>215, 223</sub> E <sub>132, 270, 338</sub> Ж <sub>216, 224</sub> З <sub>345, 364</sub>
99	A <sub>218, 222</sub> B <sub>163</sub> B <sub>183, 185</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>223</sub> E <sub>132, 338</sub> Ж <sub>216, 228</sub> З <sub>345, 364</sub>
101	A <sub>218</sub> B <sub>151</sub> B <sub>200, 210, 212</sub> Г <sub>192</sub> Д <sub>219, 223</sub> E <sub>142, 270, 348</sub> Ж <sub>216</sub> З <sub>345</sub>

Тем не менее, сохранение богатства имеющихся генетических ресурсов имеет важное значение для продовольственной безопасности страны, получения сортов с высоким уровнем адаптации, способных успешно произрастать в условиях, к которым они были адаптированы. Известно, что тенденции в селекции яблони приводят к сужению генетического разнообразия успешных коммерческих сортов. Генетическое разнообразие культивируемых в настоящее время сортов яблони составляет лишь малую часть всего генетического разнообразия этого вида [22].

**Заключение.** Таким образом, созданные нами *in silico* молекулярные маркеры, ограничивающие тетра- и гексануклеотидные повторы, по всем рассчитанным показателям не уступают широко используемым маркерам для ДНК-идентификации и имеют высокую диагностическую ценность. Данные маркеры расположены на разных хромосомах яблони. Их можно применять в реакции мультиплексной ПЦР. Они являются эффективным инструментом для оценки генетического разнообразия и идентификации генотипов яблони. С их помощью показано, что среди деревьев старого плодового сада ЦБС НАН Беларуси представлены такие сорта, как Антоновка обыкновенная, Минское, Папировка, Уэлси, Мельба и Богатырь. Часть индивидуальных генотипов представлена несколькими деревьями. В целом исследованные деревья яблони характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия. Они генетически близки как к местным старинным сортам, так и к отдельным иностранным. Полученные результаты могут быть использованы для сохранения генетических ресурсов ценной для страны плодовой культуры, которой является яблоня.

#### Список использованных источников

1. Урбанович, О. Ю. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши / О. Ю. Урбанович. – Минск: Право и экономика, 2013. – 208 с.
2. Genetic identity and diversity of apple accessions within a candidate collection for the Norwegian National Clonal Germplasm Repository / M. Meland [et al.] // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8, N 7. – P. 630. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070630>
3. Урбанович, О. Ю. Паспортизация сортов яблони на основе SSR-маркеров / О. Ю. Урбанович, З. А. Козловская, Н. А. Картель // Докл. НАН Беларуси. – 2008. – Т. 52, № 5. – С. 93–99.
4. Урбанович, О. Ю. Методические рекомендации по идентификации и паспортизации сортов яблони и груши на основе ДНК-маркеров / О. Ю. Урбанович, З. А. Козловская, Н. А. Картель. – Минск: Право и экономика, 2011. – 31 с.
5. SSR analysis based on molecular characterisation of apple germplasm in Lithuania / I. B. Mažeikienė [et al.] // Zemdirbyste = Agriculture. – 2019. – Vol. 106, N 2. – P. 159–166. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.021>
6. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / R. Liebhard [et al.] // Mol. Breed. – 2002. – Vol. 10, N 4. – P. 217–241. <https://doi.org/10.1023/A:1020525906332>
7. Development of SSR databases available for both NGS and capillary electrophoresis in apple, pear and tea / S. Nishio [et al.] // Plants. – 2021. – Vol. 10, N 12. – P. 2796. <https://doi.org/10.3390/plants10122796>
8. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov [et al.] // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, N 8. – P. 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

9. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W. H. Li // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76, N 10. – P. 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
10. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // Evolution. – 1965. – Vol. 19, N 3. – P. 395–420. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x>
11. Kloosterman, A. D. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis / A. D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // Int. J. Leg. Med. – 1993. – Vol. 105, N 5. – P. 257–264. <https://doi.org/10.1007/BF01370382>
12. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. – 2000. – Vol. 155, N 2. – P. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
13. Earl, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. A. Earl, B. M. Vonholdt // Cons. Genet. Res. – 2011. – Vol. 4, N 2. – P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
14. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // Mol. Ecol. – 2005. – Vol. 14, N 8. – P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
15. Characterization of microsatellite loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars / S. Sikorskaite [et al.] // Žemdirbystė = Agriculture. – 2012. – Vol. 99, N 2. – P. 131–138.
16. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple / C. M. Richards [et al.] // Tree Genet. and Genom. – 2009. – Vol. 6, N 2. – P. 339–347. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0190-9>
17. Urbanovich, O. Y. Identification of apple tree cultivars growing in Belarus using SSR-markers / O. Y. Urbanovich, Z. A. Kazlovskaya // Acta Hort. – 2009. – Vol. 839. – P. 479–486. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.65>
18. Genetic characterization of the apple germplasm collection in Central Italy: the value of local varieties / G. Marconi [et al.] // Front Plant Sci. – 2018. – Vol. 9. – Art. 1460. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01460>
19. A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) / J. Cmejlova [et al.] // Plant Sci. – 2021. – Vol. 303. – P. 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>
20. Identification of unknown apple (*Malus × domestica*) cultivars demonstrates the impact of local breeding program on cultivar diversity / B. L. Gross [et al.] // Genet. Resour. Crop Evol. – 2018. – Vol. 65, N 5. – P. 1317–1327. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0625-6>
21. Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level / J. Urrestarazu [et al.] // BMC Plant Biol. – 2016. – Vol. 16, N 1. – Art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0818-0>
22. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers / J. Urrestarazu [et al.] // Tree Genet. Genom. – 2012. – Vol. 8, N 6. – P. 1163–1180. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0502-y>

## References

1. Urbanovich O. Yu. *Molecular methods of identification and genotyping of apple and pear*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2013. 208 p. (in Russian).
2. Meland M., Aksic M. F., Frøynes O., Konjic A., Lasic L., Pojskic N., Gasi F. Genetic identity and diversity of apple accessions within a candidate collection for the Norwegian National Clonal Germplasm Repository. *Horticulturae*, 2022. vol. 8, no. 7, p. 630. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070630>
3. Urbanovich O. Yu., Kozlovskaya Z. A., Kartel' N. A. Passportization of apple varieties based on SSR markers. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Reports of the National Academy of Sciences of Belarus], 2008, vol. 52, no. 5, pp. 93–99 (in Russian).
4. Urbanovich O. Yu., Kozlovskaya Z. A., Kartel' N. A. *Guidelines for the identification and certification of apple and pear varieties based on DNA markers*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2011. 31 p. (in Russian).
5. Mažeikienė I., Šikšnienienė J. B., Baniulis D., Gelvonauskienė D., Frercks B., Starkus A., Žebrauskienė A., Stanys V. SSR analysis based on molecular characterisation of apple germplasm in Lithuania. *Zemdirbystė = Agriculture*, 2019, vol. 106, no. 2, pp. 159–166. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.021>
6. Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C. D., Tarchini R., Van De Weg E., Gessler C. *Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (Malus × domestica Borkh.)*. *Molecular Breeding*, 2002, vol. 10, no. 4, pp. 217–241. <https://doi.org/10.1023/A:1020525906332>
7. Nishio S., Kunihisa M., Taniguchi F., Kajiya-Kanegae H., Moriya S., Takeuchi Y., Sawamura Y. Development of SSR databases available for both NGS and capillary electrophoresis in apple, pear and tea. *Plants*, 2021, vol. 10, no. 12, p. 2796. <https://doi.org/10.3390/plants10122796>
8. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
9. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, vol. 76, no. 10, pp. 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
10. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 1965, vol. 19, no. 3, pp. 395–420. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x>
11. Kloosterman A. D., Budowle B., Daselaar P. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 1993, vol. 105, no. 5, pp. 257–264. <https://doi.org/10.1007/BF01370382>

12. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 2, pp. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
13. Earl D. A., Vonholdt B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 2011, vol. 4, no. 2, pp. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
14. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, vol. 14, no. 8, pp. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
15. Sikorskaite S., Gelvonauskiene D., Stanys V., Baniulis D. Characterization of microsatellite loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Žemdirbystė=Agriculture*, 2012, vol. 99, no. 2, pp. 131–138.
16. Richards C. M., Volk G. M., Reilley A. A., Henk A. D., Lockwood D. R., Reeves P. A., Forsline P. L. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genetics & Genomes*, 2009, vol. 6, no. 2, pp. 339–347. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0190-9>
17. Urbanovich O. Y., Kazlovskaia Z. A. Identification of apple tree cultivars growing in Belarus using SSR-markers. *Acta Horticulturae*, 2009, vol. 839, pp. 479–486. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.65>
18. Marconi G., Ferradini N., Russi L., Concezzi L., Veronesi F., Albertini E. Genetic characterization of the apple germplasm collection in Central Italy: the value of local varieties. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, art. 1460. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01460>
19. Cmejlova J., Rejlova M., Paprstein F., Cmejla R. A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Science*, 2021, vol. 303, p. 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>
20. Gross B. L., Wedger M. J., Martinez M., Volk G. M., Hale C. Identification of unknown apple (*Malus × domestica*) cultivars demonstrates the impact of local breeding program on cultivar diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2018, vol. 65, no. 5, pp. 1317–1327. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0625-6>
21. Urrestarazu J., Denancé C., Ravon E., Guyader A., Guisnel R., Feuguey L. [et al.]. Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level. *BMC Plant Biology*, 2016, vol. 16, no. 1, art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0818-0>
22. Urrestarazu J., Miranda C., Santesteban L. G., Royo J. B. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, vol. 8, no. 6, pp. 1163–1180. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0502-y>

### Информация об авторах

Фомина Елена Анатольевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Fomina@igc.by

Зайчкова Анна Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: A.Zainchkovskaya@igc.by

Кузмицкая Полина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: P.Kuzmitskaya@igc.by

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Пашкевич Павел Андреевич – канд. с.-х. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: P.Pashkevich@cbg.org.by

Сидор Лариса Сергеевна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: L.Sidor@cbg.org.by

Аношенко Борис Юрьевич – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: B.Anoshenko@cbg.org.by

Гончарова Людмила Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заместитель директора по научной и инновационной работе. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: L.Goncharova@cbg.org.by

### Information about the authors

Alena A. Fomina – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Fomina@igc.by

Anna N. Zainchkovskaya – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A.Zainchkovskaya@igc.by

Polina V. Kuzmitskaya – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: P.Kuzmitskaya@igc.by

Oksana Yu. Urbanovich – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Pavel A. Pashkevich – Ph. D. (Agric.), 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: P.Pashkevich@cbg.org.by

Larisa S. Sidor – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: L.Sidor@cbg.org.by

Boris Yu. Anoshenko – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: B.Anoshenko@cbg.org.by

Ljudmila V. Goncharova – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Deputy Director for Research and Innovation. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: L.Goncharova@cbg.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.882.11.088.7:579.253.4(476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-68-78>

Поступила в редакцию 05.07.2023

Received 05.07.2023

**Л. В. Рубаник, Н. Н. Полещук**

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

## **АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДИКОГО (wtCT), БЕСПЛАЗМИДНОГО (p-CT) И ШВЕДСКОГО (SE-nvCT) ВАРИАНТОВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* В БЕЛАРУСИ**

**Аннотация.** К настоящему времени известно, что популяция *Chlamydia trachomatis* генетически гетерогенна. Наряду с первоначально описанным диким типом (wtCT) в мире обнаружены мутантные варианты (mtCT): бесплазмидный (p-CT), шведский (SE-nvCT), мексиканский (MX-nvCT) и финский (FI-nvCT), обладающие неодинаковой вирулентностью и тропностью к различным органам и тканям. Данные варианты могут ускользать от ПЦР-диагностики ввиду отсутствия целевых мишеней или изменений в них, что делает неэффективным использование ряда диагностических тест-систем для молекулярно-биологической детекции патогена.

Проанализированы изоляты *C. trachomatis*, собранные на территории Республики Беларусь в период с 2013 по 2022 г. от лиц репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. Установлено, что доминирующим геновариантом возбудителя (примерно в 93 % случаев) является дикий тип wtCT. Мутантные штаммы, составляющие около 7 % популяции патогена, представлены p-CT и SE-nvCT геновариантами. Случаев выявления MX-nvCT и FI-nvCT геновариантов в анализируемой выборке изолятов *C. trachomatis* не отмечено.

Необходимы дальнейшая оптимизация тактики молекулярно-биологической идентификации различных геновариантов *C. trachomatis* для эффективного обнаружения возбудителя и изучение патогенеза хламидийной урогенитальной инфекции.

**Ключевые слова:** урогенитальный хламидиоз, диагностика, полимеразная цепная реакция, мутантные варианты, ускользание

**Для цитирования:** Рубаник, Л. В. Анализ проблемы молекулярной идентификации дикого (wtCT), бесплазмидного (p-CT) и шведского (SE-nvCT) вариантов *Chlamydia trachomatis* в Беларуси / Л. В. Рубаник, Н. Н. Полещук // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 68–78. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-68-78>

**Lyudmila V. Rubanik, Nikolay N. Poleshchuk**

*Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus*

## **ANALYSIS OF THE PROBLEM OF MOLECULAR IDENTIFICATION OF WILD (wtCT), PLASMIDLESS (p-CT) AND SWEDISH (SE-nvCT) VARIANTS OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN BELARUS**

**Abstract.** To date, it is known that the population of *Chlamydia trachomatis* is genetically heterogeneous. Along with the originally described wild type (wtCT), mutant variants (mtCT) have been found in the world: plasmidless (p-CT), Swedish (SE-nvCT), Mexican (MX-nvCT), Finnish (FI-nvCT), with different virulence and tropicity to various organs and tissues. These variants may escape PCR diagnostics due to the absence of targets or the occurrence of changes in them, which makes it ineffective to use a number of diagnostic test systems for pathogen detection.

Isolates of *C. trachomatis* collected on the territory of the Republic of Belarus during the period 2013–2022 in reproductive age persons with inflammatory urogenital tract diseases were analyzed. It was found that the dominant pathogen genovariant is the wild type wtCT –, approximately 93 %. Mutant strains that make up about 7 % of the pathogen population are represented by p-CT and SE-nvCT genovariants. There were no cases of identification of MX-nvCT and FI-nvCT genovariants in the analyzed sample of *C. trachomatis* isolates.

It is necessary to further optimize the tactics of molecular biological identification of various *C. trachomatis* genovariants for effective microorganism detection and study of the chlamydial urogenital infection pathogenesis.

**Keywords:** urogenital chlamydia, diagnostics, polymerase chain reaction, mutant variants, escape

**For citation:** Rubanik L. V., Poleshchuk N. N. Analysis of the problem of molecular identification of wild (wtCT), plasmidless (p-CT) and Swedish (SE-nvCT) variants of *Chlamydia trachomatis* in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 68–78 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-68-78>

**Введение.** *Chlamydia trachomatis* – широко распространенный уникальный облигатный внутриклеточный патоген, который вызывает целый ряд локальных и системных заболеваний человека, нанося огромный социально-экономический ущерб.

Согласно официальной статистике ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется около 357 млн случаев заболевания половыми инфекциями среди лиц молодого и трудоспособного возраста (15–49 лет). Из них 131 млн случаев приходится на урогенитальную хламидийную инфекцию (УГХ). Наибольшее их количество регистрируется в возрастных группах 15–24 года (60 %) и 25–34 года (28 %). Недиагностированная УГХ со временем переходит в хроническую форму или обостряется в виде уретрита, цервицита, цистита, проктита, фарингита. Помимо этого, она может быть причиной тяжелых осложнений: бесплодия, эктопической беременности, выкидыша, патологии плода и новорожденного, простатита, реактивного и ревматоидного артрита, когнитивных расстройств [1, 2].

В мировой стратегии развития здравоохранения на 2022–2030 гг. большое значение уделяется ВОЗ мероприятиям по первичной профилактике, скринингу на УГХ, разработке и внедрению высококачественной диагностики и повышению эффективности антибиотикотерапии для предотвращения осложнений и сохранения здоровья населения [2].

Лабораторная диагностика инфекции, вызываемой *C. trachomatis*, основана преимущественно на тестах амплификации нуклеиновых кислот (ТАНК) из-за их превосходных эксплуатационных характеристик и высоких показателей чувствительности и специфичности. В качестве мишеней в диагностических ТАНК для обнаружения с помощью праймеров и зондов выбираются консервативные и специфичные последовательности в геноме микроорганизма. Геном *C. trachomatis* состоит из однокопийной хромосомной ДНК и многокопийной криптической плазмиды. При этом использование многокопийной мишени обеспечивает более высокую чувствительность по сравнению с однокопийной мишенью [3]. Однако, несмотря на все вышеуказанные преимущества, использование ТАНК сопряжено с определенными трудностями. Геномы микроорганизмов, включая *C. trachomatis*, нестабильны и подвержены эволюционным перестройкам посредством точечных мутаций, вставок, делеций и горизонтального переноса генов, которые направлены на приспособление и выживание патогена. Даже однонуклеотидный полиморфизм может серьезно нарушить амплификацию и/или обнаружение нуклеиновых кислот. В настоящее время показано, что внутриклеточная рекомбинация и другие генетические модификации патогена часто происходят *in vitro* и *in vivo* и хламидия эволюционирует быстрее, чем прогнозировалось ранее [4]. Когда эволюционные изменения затрагивают последовательности, с которыми связываются праймеры и/или зонд, эффективность теста может быть снижена и он может стать ненадежным, что создаст проблемы с обнаружением с помощью ТАНК. Это стало реальностью для ряда микроорганизмов [5, 6]. В связи с выявлением в разных регионах мира мутантных вариантов *C. trachomatis*, таких как бесплазмидный (p-CT), шведский (SE-nvCT), мексиканский (MX-nvCT) и финский (FI-nvCT), актуальным стало изучение их вирулентности и клинико-эпидемиологических особенностей. Более того, возникла потребность не только в организации молекулярно-эпидемиологического мониторинга за ними, включая генотипирование, но и в усовершенствовании используемых ПЦР тест-систем [3, 4, 7–11].

Цель работы – провести молекулярно-биологические исследования по выявлению фрагментов хромосомных и плазмидных генов у изолятов *C. trachomatis*, собранных на территории Республики Беларусь, для установления типа геноварианта и определения профиля гетерогенности популяции патогена; проанализировать ситуацию в мире и Республике Беларусь в отношении мутантных геновариантов патогена и проблемы их обнаружения.

**Материалы и методы исследования.** Для идентификации геноварианта (дикий (wtCT) или мутантный (mtCT), включая дифференциацию на бесплазмидный (p-CT), шведский (SE-nvCT), мексиканский (MX-nvCT), финский (FI-nvCT), выполнены молекулярно-биологические исследования по выявлению фрагментов хромосомных локусов (генов, кодирующих 16S рРНК, 23S рРНК и *ompA*), и плазмидных генов (*orf1*, *orf3* и *orf8*) у 175 изолятов *C. trachomatis*, собранных в период с 2018 по 2022 г. на территории Республики Беларусь. Изоляты были получены от лиц обоего пола (54 мужчин и 121 женщины) с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта.

Медианный возраст пациентов составил 25 (18–45) лет. Выборка изолятов, сформированная путем случайного отбора из генеральной совокупности ( $n = 2609$ ), была представлена следующим образом: 44 образца – от людей, проживающих в г. Минске, 23 – из Минской области, 9 – из Гродненской, 39 – из Гомельской, 27 – из Витебской, 5 – из Брестской, 28 – из Могилевской области.

Мазки-соскобы из урогенитального тракта забирали в транспортную среду с муколитиком (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия). Выделение ДНК из биологических проб проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия) согласно инструкции производителя. Контроль за процессом экстракции ДНК и работой реагентов в ходе проведения ПЦР осуществляли путем внесения в каждую анализируемую пробу внутреннего контрольного образца, представляющего собой плазмидную ДНК с клонированной последовательностью репортерного гена – фрагмента гена зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*) [8].

В работе использованы следующие праймеры и зонды: для детекции гена, кодирующего 16S рРНК – 16SCTF – GCGATATTTGGGCATCCGAGTAACG, 16SCTR – TCAAATCCAGCGGGTATTAACCGCCT; 16SCTProbe – TGGCGGCCAATCTCTCAATCCGCCTAGA- ROX/ BHQ2; для детекции гена, кодирующего 23S рРНК, – 23S V2 F-GGCTTACCAACGGAAATCAA, 23S V2 R – GCGATGTCGGTTTTATGCTT (продукт 741 п. н.); для детекции гена *ompA*, – F (P1) ATGAAAAAАСТCTTGAAATCGG, R (OMP2) АСТGТААСТGCGTATTTGTCTG (продукт 1100 п. н.); для детекции плазмидного гена *orf8* – CTF – AACCAAGGTCGATGTGATAG, CTR – TCAGATAATTTGGCGATCTT, CTProbe – CGAACTCATCGGCGATAAGG – ROX/BHQ2; для детекции плазмидного гена *orf1* – swCT F – TCCGGATAGTGAATTATAGAGACTATTTAATC, swCT R – GGTGTTTTGТАCTAGAGGACTTACCTCTTC (продукт 100 п. н.), для детекции плазмидного гена *orf3* – orf3F – TTGCAGATTCATATCCAAGGAC, orf3R – CCCGAGATACGATTTGTCCA (продукт 595 п. н.) [3, 7, 9]. Олигонуклеотиды и все реагенты, использованные для молекулярной диагностики производства ОДО «Праймтех» (Беларусь). Для постановки амплификации использовали ПЦР-амплификатор планшетного типа с детекцией в режиме реального времени QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США). Учет результатов амплификации осуществляли посредством программного обеспечения QuantStudio™ Design & Analysis Software. Для проведения ПЦР с электрофоретической детекцией использовали амплификатор PalmCycler (Corbett Research, Австралия). Анализ продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Размер полученных участков ДНК определяли, ориентируясь на коммерческий маркер с шагом 100 п. н. (маркер длин 100+ bp DNALadder, «Евроген», Россия).

Генотип определяли согласно инструкции по применению «Метод генотипирования *C. trachomatis*» [10].

В таблице приведена схема интерпретации результатов и отнесения к геноварианту патогена.

#### Выявляемые мишени у разных геновариантов *C. trachomatis*

##### Identified targets in different genovariants of *C. trachomatis*

Геновариант <i>C. trachomatis</i>	Детектируемый ген или его фрагмент					
	16S pPHK	<i>orf8</i>	<i>orf1</i>	<i>orf3</i>	23S pPHK	<i>ompA</i>
Дикий (wtCT)	+	+	+	+	+	+
Мутантный (mtCT)						
Бесплазмидный (p-CT)	+	–	–	–	+	+
Шведский (SE-nvCT)	+	+	–	–	+	+
Мексиканский (MX-nvCT)	+	+	–	–	+	+
Финский (FI-nvCT)	+	+	+	+	–	+

П р и м е ч а н и е. Шведский геновариант (SE-nvCT) относится к генотипу E, мексиканский (MX-nvCT) – к генотипу D.

Результаты исследования подвергали статистической обработке общепринятыми методами. Подсчитан процент положительных проб и 95%-ный доверительный интервал (ДИ). Сопоставлены результаты, полученные в 2018–2022 гг., с данными за 2013–2017 гг. Различия между периодами 2013–2017 и 2018–2022 гг. считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенного исследования установлено, что в проанализированной выборке 92,57 % (ДИ 92,28–92,86; 162/175) образцов относились к дикому типу (wtCT) и 7,43 % (ДИ 7,14–7,72; 13/175) – к мутантному (mtCT). Среди мутантных на территории страны выявлено 3,43 % (ДИ 3,14–3,72; 6/175) изолятов *S. trachomatis*, принадлежащих к бесплазмидному (p-CT) геноварианту: Могилевская область – идентификатор (identifier – id) образца id 288 (2018 г.), Витебская область – id 728 (2019 г.), Минская область – id 1200 (2019 г.), г. Минск – id 1904 (2021 г.), Минская область – id 2568, Гомельская область – id 2520 (2022 г.)). С помощью молекулярного типирования по гену *ompA* среди них идентифицировано по одному образцу генотипов J (3 образца), E, D и G. Остальные 4,00 % (ДИ 3,71–4,29; 7/175) мутантных изолятов относились к шведскому (SE-nvCT) геноварианту патогена. Они были получены на трех территориях: Гродненская область – id 296 и 600 (2018 г.), Витебская область – id 632, 920, 992 (2019 г.), г. Минск – id 1600 и 1648 (2020 г.) (рис. 1, указана аббревиатура геноварианта, его идентификатор и год обнаружения). Проведенное генотипирование показало, что все они относились к генотипу E.

Других геновариантов, мексиканского (MX-nvCT) и финского (FI-nvCT), в анализируемой выборке изолятов *S. trachomatis* не обнаружено.

Сопоставление данных с более ранними результатами исследований [7], проведенных нами на выборке из 127 изолятов *S. trachomatis* на территории страны в период с 2013 по 2017 г., представлено на рис. 2.



Рис. 1. Карта распространения мутантных геновариантов *S. trachomatis* (бесплазмидного (p-CT) и шведского (SE-nvCT)) в Республике Беларусь в 2018–2022 гг.

Fig. 1. Distribution map of mutant gene variants of *S. trachomatis* (plasmidless (p-CT) and Swedish (SE-nvCT)) in the Republic of Belarus during the period 2018–2022

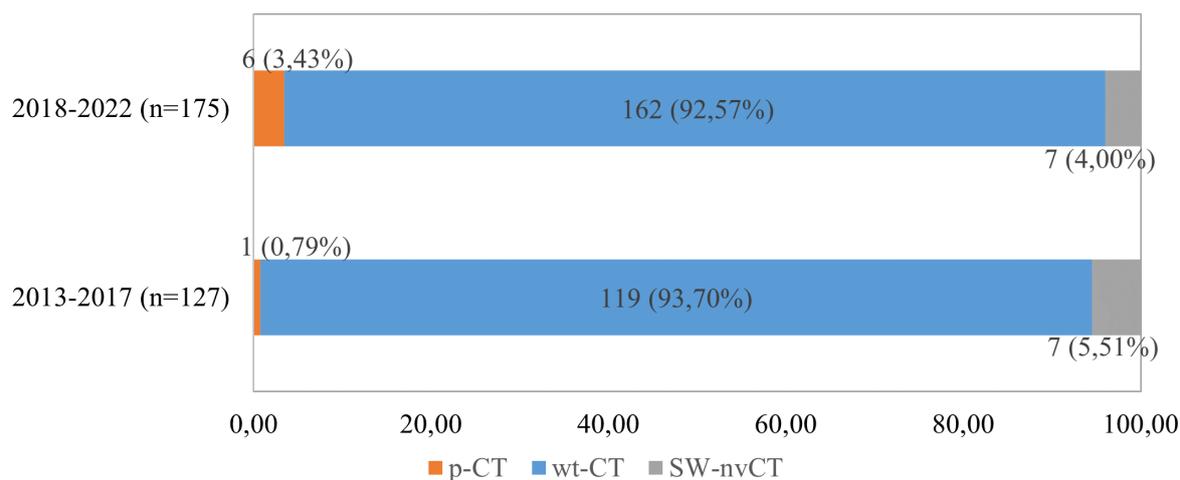


Рис. 2. Структура и динамика популяции *C. trachomatis* в Республике Беларусь в 2013–2022 гг. (2018–2022 гг. –  $n = 175$ , 2013–2017 гг. –  $n = 127$ )

Fig. 2. Structure and dynamics of changes in the population of *C. trachomatis* gene variants circulating in the Republic of Belarus during the period 2013–2022 (2018–2022 –  $n = 175$ , 2013–2017 –  $n = 127$ )

Полученные данные свидетельствуют о преимущественной циркуляции в стране штаммов дикого типа (wtCT) в анализируемые периоды – 93,70 % (119/127) в 2013–2017 гг. против 92,57 % (162/175) в 2018–2022 гг. ( $p = 0,70$ , разница между периодами статистически не значима). При этом не выявлено тенденции к увеличению доли бесплазмидного (p-CT) геноварианта: 0,79 % (1/127) в 2013–2017 гг. против 3,43 % (6/175) в 2018–2022 гг. ( $p = 0,13$ , статистически значимые различия отсутствуют). Отмечена стабильная коциркуляция шведского (SE-nvCT) геноварианта патогена – 5,51 % (7/127) и 4,00 % (7/175) соответственно ( $p = 0,54$ , различия статистически не значимы).

Как известно, генетический материал *C. trachomatis* содержится в геномной ДНК, входящей в состав нуклеоида, и в плаزمидах — внехромосомных генетических элементах. Считается, что геном *C. trachomatis* является высококонсервативным и относительно небольшим по размеру в сравнении со многими другими бактериями и составляет около 1 млн п. о., кодируя приблизительно 900 генов. Криптическая плаزمиды патогена имеет размер около 7,5 тыс. п. о., содержит 8 генов и является мультикопийной (4–10 копий), неконъюгативной и неинтегрирующей. Предполагается, что плазмиды обладают транскрипционной активностью и регулируют экспрессию хламидийных генов, а также, вероятно, несут гены вирулентности *C. trachomatis*. Однако роль плазмиды до конца не выяснена, поэтому этот вопрос требует дальнейшего изучения [3, 7–9, 11].

В то же время наряду с диким вариантом возбудителя (wild type – wtCT), открытым Гальбершtedтером и Провачеком в 1907 г. и имеющим полноценный как хромосомный, так и плазмидный генетический материал, Е. М. Peterson с соавт. (1990) и А. Farencena с соавт. (1997) были выделены мутантные штаммы (mutant type – mtCT) без криптической плазмиды (бесплазмидный геновариант (p-CT)). Это позволяет предположить, что для выживания бактерий она не нужна [11, 12]. Исследования *in vitro* показали, что бесплазмидные штаммы менее инфекционны (ИД50 выше в 400 раз по сравнению с плазмидсодержащими) и не способны накапливать гликоген во включении, который может служить дополнительным источником углерода и является неоспоримым преимуществом для репродукции или персистенции хламидий. При моделировании инфекции на мышах бесплазмидные штаммы вызывали менее тяжелую патологию и более слабый уровень иммунитета. В то же время различий в чувствительности к антибиотикам между штаммами p-CT и wtCT не выявлено [12].

По данным разных исследователей, доля мутантных бесплазмидных штаммов в популяции патогена варьируется в широких пределах – от 2 до 50 % [11–14]. Полученные нами результаты свидетельствуют об относительно низкой циркуляции в Республике Беларусь данного мутант-

ного геноварианта и отсутствии его статистически значимого увеличения в структуре популяции патогена: 0,79 % в 2013–2017 гг. и 3,43 % в 2018–2022 гг. соответственно у лиц с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта.

Изменчивость и формирование гетерогенности среди штаммов *C. trachomatis* могут обуславливать мутации. Так, в 2006 г. T. Ripa и P. A. Nilsson сообщили о выявлении нового мутантного геноварианта, получившего название шведского (SE-nvCT) [13]. Данный геновариант относится к наиболее распространенному во всем мире генотипу E и имеет делецию размером 377 п. о. в регионе *orf1* криптической плазмиды, которая являлась единственной мишенью в коммерческих тест-системах Roche и Abbott Laboratories, применяемых в диагностических лабораториях Швеции. Позднее полногеномное секвенирование показало, что в *orf3* регионе плазмиды данного геноварианта содержится также дупликация размером 44 п. о. При этом M. Unemo с соавт. сообщили, что фенотипические характеристики, такие как кинетика роста, цикл развития, морфология, накопление гликогена, количество копий плазмиды и чувствительность к противомикробным препаратам, не изменились у SE-nvCT по сравнению с wtCT. В то же время важным было обнаружение как *in vitro*, так и *in vivo* возможности коинфицирования клеток штаммами nvCT и wtCT [14].

Проведенные молекулярно-эпидемиологические исследования показали, что этот ускользающий от ПЦР детекции вариант *C. trachomatis* широко распространился в Швеции (от 7 до 64 % от всех положительных случаев). Невыявляемость способствовала его неконтролируемому распространению в популяции, а и при отсутствии лечения – хронизации УГХ и формированию необратимой патологии тканей и органов [14]. Более того, с 2007 г. случаи выявления такого мутантного геноварианта возбудителя начали регистрировать и в других странах: Дании, Норвегии, Франции, Шотландии, Финляндии, Испании, России, Республике Беларусь и т. д. [7, 14–17]. Учитывая масштабность проблемы, в Нидерландах, к примеру, был введен национальный дозорный эпиднадзор для мониторинга распространения SE-nvCT [15]. В то же время SE-nvCT вариант не был обнаружен в США, где тестирование проводится с помощью отдельного ТАНК, не нацеленного на криптическую плазмиду [16].

В 2019 г. в России V. A. Feodorova с соавт. идентифицировали у пациента с бессимптомной инфекцией и бесплодием в анамнезе сходный с SE-nvCT вариант, отличающийся, однако, наличием дополнительной делеции размером 17 п. о. в регионе *orf1* криптической плазмиды [17]. Это еще раз подчеркивает существующую изменчивость плазмидного региона *C. trachomatis*.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о многолетней стабильной детекции шведского (SE-nvCT) геноварианта патогена в Республике Беларусь на уровне 5,51 % в 2013–2017 гг. против 4,00 % в 2018–2022 гг. Недопущение широкого распространения данного геноварианта обусловлено, с одной стороны, системой лабораторной верификации *C. trachomatis*, включая применение в стране альтернативных методов диагностики (выделение на культуре клеток McCoу, метод флуоресцирующих антител, иммуноферментный анализ), а с другой стороны – разработкой и совершенствованием ПЦР тест-систем с учетом циркулирующих штаммов возбудителя [7, 8].

При исследовании архивных образцов *C. trachomatis* 2015 г. в Мексике M. R. Escobedo-Guerra с соавт. был выявлен еще один мутантный вариант, схожий по структурным перестройкам со шведским геновариантом, но относящийся к генотипу D. Его назвали мексиканским геновариантом *C. trachomatis* (MX-nvCT) [18]. Однако данные о его выявлении за пределами Мексики в доступной литературе отсутствуют. В проведенном нами исследовании этот вариант не был детектирован в Республике Беларусь.

В 2019 г. в Финляндии был описан финский (FI-nvCT) геновариант, характеризующийся генетическими изменениями (нуклеотидной заменой C1515T; по номеру гена *Escherichia coli*) в локусе гена 23S рРНК, являвшейся мишенью для ПЦР-набора Aptima Combo 2 (AC2) (Hologic Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), что приводило к получению ложноотрицательных результатов при его применении. При этом данный геновариант выявлялся в случае постановки ПЦР-теста Aptima CT, направленного на другую мишень – ген, кодирующий 16S рРНК [9].

В этом же году этот геновариант (FI-nvCT) был выявлен Т. В. Johansen с соавт. в 5 лабораториях Норвегии, причем в 84 % образцов. При этом нуклеотидные замены в локусе гена, кодирующего 23S рРНК, отличались – C1514T и G1523A [19]. Аналогичная ситуация с высоким распространением (95 %, 76/80) таких мутантных вариантов, не улавливаемых ПЦР-набором Artima Combo 2 (AC2), отмечена в Дании [20].

Совершенно другая картина распространения данного геноварианта в Великобритании и Швеции. В Великобритании в одном исследовании выявлено 0,003 % (1/38519), в другом – 11,1 % (4/36) случаев FI-nvCT, по 2 случая каждого варианта мутаций C1514T и G1523A [21, 22]. В Швеции в течение марта–мая 2019 г. обнаружено 1,3 % (2/158) случаев, отрицательных по тесту Artima Combo 2, но положительных по тесту Artima CT и имеющих характерную мутацию C1515T в участке гена, кодирующего 23S рРНК патогена [23]. В то же время исследования, проведенные в США, не выявили FI-nvCT вариант, при этом были отмечены другие, ранее не детектированные, но диагностически значимые мутации A1518G, G1526A в гене, кодирующем 23S рРНК *C. trachomatis*, что позволяло ускользать от ПЦР-детекции [24]. В проанализированной выборке образцов *C. trachomatis* нами не выявлен FI-nvCT геновариант в Республике Беларусь, что может указывать на его возможные минорные позиции в структуре популяции патогена и на целесообразность дальнейших исследований не только с увеличением выборки, но и с привлечением разного контингента лиц (при костно-суставной патологии, патологии плода и новорожденных) и видов клинического материала (синовиальная жидкость, кровь, плацента, аутопнат, биоптат).

В целом распространенность FI-nvCT в скандинавских странах (Финляндии, Норвегии и Швеции) оценивается на уровне 1–6 % [9, 19, 23]. При этом специалисты считают, что какова бы ни была причина ложноотрицательных результатов теста AC2, обнаружение на 6–10 % большего количества положительных результатов с помощью альтернативного теста указывает на общие принципы тестирования на хламидиоз: ни один тест не выявляет все случаи, и чувствительность конкретного метода варьируется в зависимости от типа образца [25]. Все более широкое использование молекулярных систем и автоматизированных приборов ставит задачу поиска новых стратегий, позволяющих идти в ногу с эволюцией микроорганизмов и обеспечивать постоянное высокое качество молекулярной диагностики. Одним из таких решений является усовершенствование ПЦР тест-систем, позволяющее сдерживать распространение мутантных, ускользающих от детекции геновариантов возбудителя. Мы поддерживаем мнение ряда специалистов, что не следует доверять одной мишени при молекулярной диагностике инфекций [3–6, 9, 14].

Становится также понятным, что традиционные показатели качества тестов на хламидиоз должны включать тщательное наблюдение за процентом положительных результатов. Важно разработать новые алгоритмы для мониторинга событий и тенденций в данных, получаемых при использовании наборов и оборудования ПЦР, например процент находящихся в серой зоне образцов, имеющих пограничные значения порогового цикла. Кроме того, немаловажно повторное тестирование образцов с сомнительными результатами с использованием альтернативных тестов и другие методы управления качеством, являющиеся ключевыми для выявления ложных результатов теста при любом диагностическом анализе. С этой целью целесообразно создание в стране национальной референс-лаборатории по урогенитальному хламидиозу, аналогично имеющимся в мировой практике [1, 14, 15].

В качестве диагностической мишени в ПЦР тест-системах долгое время использовался только один из локусов патогена: хромосомный – фрагмент *ompA*, или ген, кодирующий 16S рРНК, или ген, кодирующий 23S рРНК; плазмидные – *orf1* или *orf3* и другие участки.

Хромосомный ген *C. trachomatis ompA* кодирует белок МОМР (от англ. *major outer membrane protein*), который отвечает за иммуногенность и, как следствие, наиболее изменчив и чаще всего подвержен генетическим вариациям. Изменения могут затрагивать до 30 % от последовательности всего гена. Для диагностики используют преимущественно консервативные фрагменты, однако отмечалось, что и в генах этой области могут происходить различные мутации, имеющие диагностическую значимость для выявления патогена [4, 11, 23].

Благодаря мультикопийности и высокой консервативности плазмидные участки чаще всего используются в качестве мишени для ПЦР. Плазмидный участок *orf3* кодирует наиболее изученный белок Pgp3 размером 28 кДа. Примечательно, что это единственный из хламидийных белков, который секретируется в цитозоль инфицированных клеток хозяина. Известно также, что частота мутации в гене *orf3* в 7 раз выше по сравнению со средним значением для всех других открытых рамок считывания патогена. Участок гена *orf8* кодирует белок Pgp8, который является гомологом интегразы/рекомбиназы [4, 11].

Появление мутантных геновариантов привело к необходимости усовершенствования и разработки мультиплексных тест-систем, включающих одновременную детекцию нескольких генетических локусов *C. trachomatis*, что снижает риск получения ложноотрицательных результатов ПЦР из-за генетических перестроек в мишенях [3, 7, 8].

В настоящее время на территории Республики Беларусь представлена целая линейка зарегистрированных для применения ПЦР тест-систем. В рутинной практике для диагностических целей наиболее часто используют ПЦР-наборы в режиме реального времени следующих российских производителей: «ДНК-технология» (мишенью является ген, кодирующий 16S рРНК), «Литех» и ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора» (мишень – криптическая плазида), «Вектор-Бест» (две мишени – криптическая плазида и ген *guyA*). В последние годы производятся тест-системы белорусских производителей (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и ООО «АртБиоТех»). Обе включают две мишени – хромосомную и плазмидную.

На наш взгляд, при оценке и внедрении диагностических ПЦР-тестов следует принимать во внимание не только известные варианты микроорганизма, но и проводить выборочное параллельное тестирование случайных отрицательных образцов с использованием другого метода. Кроме того, тщательный и постоянный мониторинг долгосрочных тенденций (эпидемиологии урогенитального хламидиоза, частоты положительных/отрицательных результатов и значений сигнала ПЦР-анализа) является важным компонентом подтверждения качества диагностики, стабильности целевых показателей ТАНК на национальном уровне. Важно, чтобы лаборатории были включены в соответствующие международные оценки качества для выявления не поддающихся диагностике новых вариантов *C. trachomatis*. При таком подходе, даже в случае появления новых вариантов патогена, способных избежать обнаружения специфическими ТАНК, их трансмиссия в популяции и неблагоприятные последствия могут быть в значительной степени предотвращены.

Следует отметить, что, несмотря на неоспоримые достоинства ПЦР и с учетом современных знаний о биологии *C. trachomatis*, от клиницистов и лабораторий требуется кооперация для оптимизации диагностики и постоянная бдительность, чтобы распознавать ложноотрицательные тесты при наличии полиморфизма симптомов, сопоставимых с хламидийной инфекцией. Международное информирование, национальные молекулярно-эпидемиологические исследования и совместные действия разных специалистов имеют важное значение для определения распространения уже известных мутантных вариантов *C. trachomatis*, выявления новых и предупреждения их трансмиссии ввиду ускользания от обнаружения методом ПЦР.

Считаем, что роль мутантных вариантов возбудителя в перинатальной патологии, заболеваниях костно-суставной системы и мультиорганных поражениях изучена недостаточно. Актуально дальнейшее исследование молекулярно-биологических свойств разных штаммов, включая определение вирулентности, тропности к различным типам клеток, а также определение их чувствительности к антибиотикам.

**Заключение.** По результатам молекулярно-биологических исследований по выявлению фрагментов хромосомных и плазмидных генов у изолятов *C. trachomatis*, собранных на территории Республики Беларусь в период с 2013 по 2022 г., установлено, что доминирующим геновариантом возбудителя в стране (примерно 93 %) является дикий тип wtCT. Мутантные геноварианты, составляющие около 7 % популяции патогена, представлены бесплазмидным (p-CT) и шведским (SE-nvCT). Случаев идентификации мексиканского (MX-nvCT) и/или финского (FI-nvCT) геновариантов в анализируемой выборке изолятов *C. trachomatis* не обнаружено.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia infection // ECDC. Annual epidemiological report for 2019. Stockholm: ECDC, 2022 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/chlamydia-annual-epidemiological-report-2019.pdf>. – Date of access: 08.06.2023.
2. Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022–2030 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/strategies/global-health-sector-strategies>. – Date of access: 08.06.2023.
3. Sensitivity, specificity, inclusivity and exclusivity of the updated Aptima Combo 2 assay, which provides detection coverage of the new diagnostic-escape *Chlamydia trachomatis* variants / M. Unemo [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2020. – Vol. 20, art. 419. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05148-7>
4. Comprehensive global genome dynamics of *Chlamydia trachomatis* show ancient diversification followed by contemporary mixing and recent lineage expansion / J. Hadfield [et al.] // Genome Res. – 2017. – Vol. 27. – P. 1220–1229. <https://doi.org/10.1101/gr.212647.116>
5. Duh, D. Single mutation in the matrix gene of seasonal influenza A viruses critically affects the performance of diagnostic molecular assay / D. Duh, B. Blažič // J. Virol. Methods. – 2018. – Vol. 251. – P. 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.007>
6. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal porA mutants are spreading internationally / C. A. Ison [et al.] // Sex. Transm. Infect. – 2013. – Vol. 89, N 3. – P. 197–201. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-050829>
7. Выявление безплазмидного и мутантного «шведского» вариантов *Chlamydia trachomatis*, выделенных от лиц с урогенитальным хламидиозом в Республике Беларусь / Л. В. Рубаник [и др.] // Мед. новости. – 2017. – № 12. – С. 49–53.
8. Разработка и определение аналитических характеристик набора реагентов для генодиагностики *Chlamydia trachomatis* «Chlamydia trachomatis-ПЦР/ПВ» / Ю. М. Капустина [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь; РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В. А. Горбунова. – Минск, 2022. – Вып. 14. – С. 86–93.
9. The Finnish New Variant of *Chlamydia trachomatis* with a single nucleotide polymorphism in the 23S rRNA target escapes detection by the Aptima Combo 2 Test / K. Hokyaryn [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, N 8. – Art. 227. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080227>
10. Рубаник, Л. В. Метод генотипирования *C. trachomatis*: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 20.06.2019, рег. № 007-0619 / Л. В. Рубаник, Н. Н. Полещук, Ю. М. Капустина. – Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2019. – 12 с.
11. Nunes, A. Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia* / A. Nunes, J. P. Gomes // Infect., Genet. Evol. – 2014. – Vol. 23. – P. 49–64. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.029>
12. Plasmid deficiency in urogenital isolates of *Chlamydia trachomatis* reduces infectivity and virulence in a mouse model / I. M. Sigar [et al.] // Pathogens Dis. – 2014. – Vol. 70, N 1. – P. 61–69. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12086>
13. Ripa, T. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests / T. Ripa, P. A. Nilsson // Eurosurveillance. – 2006. – Vol. 11, N 45. – P. 9–11. <https://doi.org/10.2807/esw.11.45.03076-en>
14. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization / M. Unemo [et al.] // Microbiology. – 2010. – Vol. 156, N 5. – P. 1394–1404. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036830-0>
15. Monitoring the potential introduction of the Swedish *Chlamydia trachomatis* variant (swCT) in the Netherlands / S. A. Morré [et al.] // Eurosurveillance. – 2007. – Vol. 12, N 10. – P. E9–E10. <https://doi.org/10.2807/esm.12.10.00739-en>
16. Is there evidence of the new variant *Chlamydia trachomatis* in the United States? / H. Won [et al.] // Sex. Transm. Dis. – 2013. – Vol. 40, N 5. – P. 352–353. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3182841786>
17. An asymptomatic patient with fatal infertility carried a Swedish strain of *Chlamydia trachomatis* with additional deletion in the plasmid orf1 that belong to a different MLST sequence type / V. A. Feodorova [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, N 7. – Art. 187. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070187>
18. Identification of a new variant of *Chlamydia trachomatis* in Mexico. Identificación de nueva variante de *Chlamydia trachomatis* en México / M. R. Escobedo-Guerra [et al.] // Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl. ed). – 2019. – Vol. 7, N 2. – P. 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.008>
19. The ‘Finnish new variant of *Chlamydia trachomatis*’ escaping detection in the Aptima Combo 2 assay is widespread across Norway, June to August 2019 / T. B. Johansen [et al.] // Eurosurveillance. – 2019. – Vol. 24, N 42. – Art. 1900592. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.42.1900592>
20. A *Chlamydia trachomatis* 23S rRNA G1523A variant escaping detection in the Aptima Combo 2 assay (Hologic) was widespread across Denmark in July–September 2019 / R. Hadad [et al.] // APMIS. – 2020. – Vol. 128, N 6. – P. 440–444. <https://doi.org/10.1111/apm.13043>
21. Prevalence of new variants of *Chlamydia trachomatis* escaping detection by the Aptima Combo 2 assay, England, June to August 2019 / D. J. Roberts [et al.] // Eurosurveillance. – 2019. – Vol. 24, N 38. – Art. 1900557. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.38.1900557>
22. No widespread dissemination of *Chlamydia trachomatis* diagnostic-escape variants and the impact of *Neisseria gonorrhoeae* positivity on the Aptima Combo 2 assay / M. J. Cole [et al.] // Sex. Transm. Infect. – 2022. – Vol. 98, N 5. – P. 366–370. <http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2021-054988>

23. Finnish new variant of *Chlamydia trachomatis* escaping detection in the Aptima Combo 2 assay also present in Örebro County, Sweden / M. Unemo [et al.] // *Eurosurveillance*. – 2019. – Vol. 24, N 26. – Art. 1900370. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.26.1900370>

24. *Chlamydia trachomatis* variants escaping detection in the Aptima Combo 2® assay in the United States / S. S. Katz [et al.] // *Sex. Transm. Dis.* – 2022. – Vol. 49, N 6. – P. 448–452. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001617>

25. *Chlamydia trachomatis* samples testing falsely negative in the Aptima Combo 2 test in Finland, 2019 / K. Rantakokko-Jalava [et al.] // *Eurosurveillance*. – 2019. – Vol. 24, N 22. – Art. 1900298. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900298>

## References

1. *European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia infection. ECDC. Annual epidemiological report for 2019*. Stockholm: ECDC, 2022. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/chlamydia-annual-epidemiological-report-2019.pdf> (accessed 08.06.2023).

2. *Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022–2030*. Available at: <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/strategies/global-health-sector-strategies>. (accessed 08.06.2023).

3. Unemo M., Hansen M., Hadad R., Puolakkainen M., Westh H., Rantakokko-Jalava K. [et al.]. Sensitivity, specificity, inclusivity and exclusivity of the updated Aptima Combo 2 assay, which provides detection coverage of the new diagnostic-escape *Chlamydia trachomatis* variants. *BMC Infectious Diseases*, 2020, vol. 20, art. 419. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05148-7>

4. Hadfield J., Harris S. R., Seth-Smith H. M. B., Parmar S., Andersson P., Giffard P. M. [et al.]. Comprehensive global genome dynamics of *Chlamydia trachomatis* show ancient diversification followed by contemporary mixing and recent lineage expansion. *Genome Research*, 2017, vol. 27, pp. 1220–1229. <https://doi.org/10.1101/gr.212647.116>

5. Duh D., Blažič B. Single mutation in the matrix gene of seasonal influenza A viruses critically affects the performance of diagnostic molecular assay. *Journal of Virological Methods*, 2018, vol. 251, pp. 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.007>

6. Ison C. A., Golparian D., Saunders P., Chisholm S., Unemo M. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal porA mutants are spreading internationally. *Sexually Transmitted Infections*, 2013, vol. 89, no. 3, pp. 197–201. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-050829>

7. Rubanik L. V., Kapustina Yu. M., Astashonok A. N., Poleshchuk N. N. Detection of mutant “Swedish” and plasmid-free variants of *Chlamydia trachomatis* isolated from persons with urogenital chlamydiosis in the Republic of Belarus. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2017, vol. 12, pp. 49–53 (in Russian).

8. Kapustina Yu. M., Rubanik L. V., Fomina E. G., Grigor’eva E. E. Development and analytical characteristics of “*Chlamydia trachomatis*-PCR/RT” test kit for *Chlamydia trachomatis* genodiagnosics. *Sovremennye problemy infektsionnoi patologii cheloveka. Vypusk 14* [Modern problems of infectious morbidity in humans: a collection of scientific papers. Issue 14]. Minsk, 2022, pp. 86–93 (in Russian).

9. Hokynar K., Rantakokko-Jalava K., Hakanen A., Havana M., Mannonen L., Jokela P., Kurkela S., Lappalainen M., Unemo M., Puolakkainen M. The Finnish new variant of *Chlamydia trachomatis* with a single nucleotide polymorphism in the 23S rRNA target escapes detection by the Aptima Combo 2 Test. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 8, art. 227. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080227>

10. Rubanik L. V., Poleshchuk N. N., Kapustina Yu. M. *Metod genotyping of C. trachomatis. Instruction for use, reg. №007-0619*. Minsk, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, 2019. 12 p. (in Russian).

11. Nunes A., Gomes J. P. Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, vol. 23, pp. 49–64. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.029>

12. Sigar I. M., Schripsema J. H., Wang Y., Clarke I. N., Cutcliffe L. T., Seth-Smith H. M. B. [et al.]. Plasmid deficiency in urogenital isolates of *Chlamydia trachomatis* reduces infectivity and virulence in a mouse model. *Pathogens and Disease*, 2014, vol. 70, no. 1, pp. 61–69. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12086>

13. Ripa T. A., Nilsson P. A. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Eurosurveillance*, 2006, vol. 11, no. 45, pp. 9–11. <https://doi.org/10.2807/esw.11.45.03076-en>

14. Unemo M., Seth-Smith H. M. B., Cutcliffe L. T., Skilton R. J., Barlow D., Goulding D. [et al.]. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. *Microbiology*, 2010, vol. 156, no. 5, pp. 1394–1404. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036830-0>

15. Morré S. A., Catsburg A., Boer M., Spaargaren J., Vries H. J. C., Schirm J., Savelkoul P. H. M., Steenberg J., Swan C. Monitoring the potential introduction of the Swedish *Chlamydia trachomatis* variant (swCT) in the Netherlands. *Eurosurveillance*, 2007, vol. 12, no. 10, pp. E9–E10. <https://doi.org/10.2807/esm.12.10.00739-en>

16. Won H., Ramachandran P., Steece R., Van Der Pol B., Moncada J., Schachter J., Gaydos Ch. Is there evidence of the new variant *Chlamydia trachomatis* in the United States? *Sexually Transmitted Diseases*, 2013, vol. 40, no. 5, pp. 352–353. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3182841786>

17. Feodorova V. A., Zaitsev S. S., Saltykov Y. V., Sultanakhmedov E. S., Bakulev A. L., Ulyanov S. S., Motin V. L. An asymptomatic patient with fatal infertility carried a Swedish strain of *Chlamydia trachomatis* with additional deletion in the plasmid orf1 that belong to a different MLST sequence type. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 7, art. 187. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070187>

18. Escobedo-Guerra M. R., Katoku-Herrera M., Lopez-Hurtado M., Villagrana-Zesati J. R., de Haro-Cruz M. J., Guerra-Infante F. M. Identification of a new variant of *Chlamydia trachomatis* in Mexico. Identificación de nueva variante de *Chlamydia trachomatis* en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, 2019, vol. 7, no. 2, pp. 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.008>
19. Johansen T. B., Kløvstad H., Rykkvin R., Herrfurth-Erichsen E. B., Sorthe J., Njølstad G. [et al.]. The ‘Finnish new variant of *Chlamydia trachomatis*’ escaping detection in the Aptima Combo 2 assay is widespread across Norway, June to August 2019. *Eurosurveillance*, 2019, vol. 24, no. 42, art. 1900592. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.42.1900592>
20. Hadad R., Jensen J. S., Westh H., Grønbaek I., Schwartz L. J., Nielsen L. A. [et al.]. *Chlamydia trachomatis* 23S rRNA G1523A variant escaping detection in the Aptima Combo 2 assay (Hologic) was widespread across Denmark in July–September 2019. *APMIS*, 2020, vol. 128, no. 6, pp. 440–444. <https://doi.org/10.1111/apm.13043>
21. Roberts D. J., Davis G. S., Cole M. J., Naik D., Maru H., Woodford N. [et al.]. Prevalence of new variants of *Chlamydia trachomatis* escaping detection by the Aptima Combo 2 assay, England, June to August 2019. *Eurosurveillance*, 2019, vol. 24, no. 38, art. 1900557. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.38.1900557>
22. Cole M. J., Davis G. S., Fifer H., Saunders J. M., Unemo M., Hadad R. [et al.]. No widespread dissemination of *Chlamydia trachomatis* diagnostic-escape variants and the impact of *Neisseria gonorrhoeae* positivity on the Aptima Combo 2 assay. *Sexually Transmitted Infections*, 2022, vol. 98, no. 5, pp. 366–370. <http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2021-054988>
23. Unemo M., Hansen M., Hadad R., Lindroth Y., Fredlund H., Puolakkainen M., Sundqvist M. Finnish new variant of *Chlamydia trachomatis* escaping detection in the Aptima Combo 2 assay also present in Örebro County, Sweden. *Eurosurveillance*, 2019, vol. 24, no. 26, art. 1900370. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.26.1900370>
24. Katz S. S., Danavall D. C., Morris M. R., Herrod B. P., Dale S. E., Nye M. B., Kersh E. N., Kirkcaldy R. D., Raphael B. H. *Chlamydia trachomatis* variants escaping detection in the Aptima Combo 2® assay in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, 2022, vol. 49, no. 6, pp. 448–452. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001617>
25. Rantakokko-Jalava K., Hokynar K., Hieta N., Keskitalo A., Jokela P., Muotiala A. [et al.]. *Chlamydia trachomatis* samples testing falsely negative in the Aptima Combo 2 test in Finland, 2019. *Eurosurveillance*, 2019, vol. 24, no. 22, art. 1900298. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900298>

### Информация об авторах

Рубаник Людмила Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-7963-0026>. E-mail: rubaniklv@tut.by

Полещук Николай Николаевич – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-1083-6680>. E-mail: pnn@belriem.by

### Information about the authors

Lyudmila V. Rubanik – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-7963-0026>. E-mail: rubaniklv@tut.by

Nikolay N. Poleshchuk – D. Sc. (Med.), Professor, Chief Researcher. Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-1083-6680>. E-mail: pnn@belriem.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 547.913:543.544.32:615.281

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-79-88>

Поступила в редакцию 05.07.2023

Received 05.07.2023

**Н. А. Коваленко, Г. Н. Супиченко, Т. И. Ахрамович, Ю. А. Нечай, В. Н. Леонтьев***Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь***АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ  
И ЭКСТРАКТОВ *THUJA OCCIDENTALIS***

**Аннотация.** Методом гидродистилляции получены образцы эфирного масла интродуцированных в Республике Беларусь культиваров *Thuja occidentalis* с колоновидной и шаровидной формами кроны. Методом газо-жидкостной хроматографии проведены идентификация и количественное определение 26 компонентов. Доминирующими компонентами являлись  $\alpha$ -туион (~55–60 %),  $\beta$ -туион (~10–12 %), фенхон (~8–16 %), сабинен (~1–5 %), камфора (~1–4 %), борнилацетат (~1–3 %). Показаны особенности распределения энантиомеров терпеноидов эфирного масла изученных культиваров и выявлена антимикробная активность эфирного масла *Thuja occidentalis* в отношении тестовых культур грамположительных и грамотрицательных бактерий. Бактериальные культуры оказались более чувствительными к ингибирующему действию эфирного масла из растений с шаровидной формой кроны. Показано влияние оптической активности камфоры на антимикробные свойства эфирного масла туи. Установлено, что по антимикробной активности спиртовые экстракты *Thuja occidentalis* уступают эфирным маслам. Показано влияние формы кроны и окраски хвои на антиоксидантные свойства изученных культиваров.

**Ключевые слова:** *Thuja occidentalis*, эфирные масла, энантиомеры, экстракты, антимикробная активность, антиоксидантная активность

**Для цитирования:** Антимикробная активность эфирных масел и экстрактов *Thuja occidentalis* / Н. А. Коваленко [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 1. – С. 79–88. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-79-88>

**Natalya A. Kovalenko, Galina N. Supichenko, Tatyana I. Ahramovich, Yulia A. Niachai, Victor N. Leontiev***Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus***ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *THUJA OCCIDENTALIS* ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS**

**Abstract.** The steam distillation method was used to obtain samples of essential oil of cultivars with a columnar and spherical shape of the crown *Thuja occidentalis* introduced in the Republic of Belarus. More than 26 components have been identified and determined in the essential oil of *Thuja occidentalis* by gas-liquid chromatography. The dominant components are  $\alpha$ -thujone (~55–60 %),  $\beta$ -thujone (~10–12 %), fenchone (~8–16 %), sabinene (~1–5 %), camphor (~1–4 %), bornylacetate (~1–3 %). Distributions of terpenoid enantiomers in the essential oil of *Thuja occidentalis* cultivars are shown. The antimicrobial activity of *Thuja occidentalis* essential oils was detected in relation to test cultures of gram-positive and gram-negative bacteria. Bacterial cultures were more sensitive to the inhibitory effect of essential oil samples from plants with a spherical crown shape. The influence of the optical activity of camphor on the essential oil antimicrobial properties is shown. It has been established that alcohol extracts of *Thuja occidentalis* are inferior to essential oils in terms of antimicrobial activity. The effect of the crown shape and the color of the studied cultivar needles on their antioxidant properties is shown.

**Keywords:** *Thuja occidentalis*, essential oils, enantiomers, extracts, antimicrobial activity, antioxidant activity

**For citation:** Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Ahramovich T. I., Niachai Yu. A., Leontiev V. N. Antimicrobial activity of *Thuja occidentalis* essential oils and extracts. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 1, pp. 79–88 (in Russian) <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-1-79-88>

**Введение.** В последние десятилетия отмечается рост числа штаммов микроорганизмов, устойчивых к большинству известных антибиотиков, что вызывает затруднения при лечении многих заболеваний [1]. Этим недостатком лишены растительные препараты, обладающие более мягким терапевтическим действием и не вызывающие различных побочных эффектов. По оценкам экспертов, в настоящее время около 25 % лекарственных средств содержат биологически активные соединения растительного происхождения. В этой связи эфирные масла растений и их компоненты представляют интерес для практического использования в качестве альтернативных средств против устойчивых к антибиотикам микроорганизмов. Источником новых перспек-

тивных соединений, проявляющих высокую биологическую активность, могут выступать эфирные масла и экстракты хвойных пород деревьев, в частности туи.

Род *Thuja* относится к семейству Cupressaceae. Различают следующие виды *Thuja*: *Thuja occidentalis* (туя западная), *Thuja plicata* (туя складчатая, или гигантская), *Thuja koraiensis* (туя корейская), *Thuja sutchuenensis* (туя сычуаньская, или китайская), *Thuja standishii* (туя Стендиша, или японская).

В Европе наибольшее распространение получила туя западная, которую часто называют «деревом жизни» благодаря высокой биологической активности ее вторичных метаболитов [2–4]. В настоящее время интерес к вторичным метаболитам *Thuja occidentalis* возрастает. Препараты туи западной широко применяются в народной медицине при кишечных и маточных кровотечениях, бронхиальной астме, ревматизме, остеохондрозе, цистите, простатите, аденоме простаты. Эфирное масло туи западной применяется в дерматологии и косметологии. В гомеопатии тую используют при лечении ревматизма, невралгии, кожных и простудных заболеваний<sup>1</sup>. Препараты туи проявляют противовоспалительное, фунгицидное, антибактериальное, противовирусное, глистогонное, противоаллергическое действие [5]. За счет активных антибластомных веществ класса трополонов препараты туи обладают цитостатическим действием, что делает перспективным ее применение в онкологии [6, 7]. Исследования последних лет показали, что эфирное масло туи ввиду наличия в нем таких веществ, как  $\alpha$ -цедрол,  $\alpha$ -туйон, обладает высокой противогрибковой и антигельминтной активностью, а кроме того, проявляет противовирусное и противомикробное действие [8–10].

Для создания препаратов туи с заданными профилактическими и лекарственными свойствами необходимо установить влияние компонентного состава вторичных метаболитов растений на их антимикробные свойства.

Анализ литературных данных показывает, что на качественный и количественный состав эфирных масел *T. occidentalis* оказывают влияние географические и климатические условия произрастания деревьев, а также способы заготовки растительного сырья [11–15]. Так, в составе образцов эфирного масла *T. occidentalis*, культивируемой в Польше, идентифицировано и количественно определено примерно 30 соединений, основными из которых являются  $\alpha$ - и  $\beta$ -туйоны, сабинен, фенхон, биерен и римуен [12, 13]. Однако даже в пределах одного вида у разных сортов туи западной зафиксированы некоторые различия компонентного состава эфирных масел. Так, эфирное масло туи западной сорта ‘Brabant’, в отличие от культивара ‘Smaragd’, обогащено  $\alpha$ -туйоном. Отличия наблюдались также в концентрациях других компонентов, например дитерпенов и сабинена [13]. По данным [9], в эфирном масле культивара ‘Globosa’ отмечено высокое содержание камфоры и более низкое содержание сабинена, чем в образцах, описанных в работе [13]. Близкие результаты по компонентному составу эфирного масла туи западной получены при ее выращивании в северных районах Китая [14].

Вместе с тем авторы [4, 15] приводят данные о других главных компонентах эфирного масла туи западной. Так, сообщается о преобладающем содержании  $\alpha$ -пинена (до 35 %) в образцах масла *T. occidentalis* из Румынии, Египта и Туниса.

В научной литературе имеются немногочисленные сведения о компонентном составе эфирного масла различных видов туи, интродуцированных в Республике Беларусь. Так, авторами [16, 17] установлено, что основными компонентами исследованных образцов эфирного масла туи являются фенхон,  $\alpha$ - и  $\beta$ -туйоны. Отмечена зависимость степени накопления терпеновых соединений и компонентного состава эфирных масел от сорта и вида туи.

Известно, что основной вклад в антимикробные свойства эфирных масел и экстрактов хвойных растений вносят соединения терпенового ряда, проявляющие активность против широкого спектра микроорганизмов, включая грамположительные, грамотрицательные бактерии, вирусы, грибы [1–5]. Имеющиеся в доступной литературе работы по антимикробной активности касают-

<sup>1</sup> Селиванчикова И. Б. Анализ и стандартизация гомеопатических настоек туи и ледум: дис. ... канд. фарм. наук: 15.00. М., 2003. – 149 с.

ся хвойных эфирных масел и экстрактов растений различного географического происхождения [6, 9, 13, 15], однако отсутствуют данные об антимикробной активности эфирных масел и экстрактов культиваров туи, интродуцированных в Беларусь.

Цель данной работы – установление особенностей компонентного и энантиомерного состава эфирных масел и экстрактов туи западной различных культиваров в условиях интродукции в Республике Беларусь и исследование антимикробных свойств их вторичных метаболитов.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования являлись образцы эфирного масла, выделенные из охвоенных концов ветвей длиной 15–20 см следующих культиваров *T. occidentalis*: ‘Golden Aurea’ (образец 1), ‘Brabant’ (образец 2), ‘Globosa Nana’ (образец 3), ‘Globosa Alba’ (образец 4). Растения ‘Golden Aurea’ и ‘Brabant’ имеют колоновидную форму кроны, а также золотистый и зеленый цвет хвои соответственно. Культивары ‘Globosa Nana’ и ‘Globosa Alba’ с шаровидной формой кроны также различаются по цвету хвои: у ‘Globosa Nana’ она зеленая, а у ‘Globosa Alba’ кончики зеленых побегов окрашены в белый цвет.

Образцы растительного сырья были собраны в осенний период 2021 г. Эфирные масла получали из свежесобранного и измельченного сырья, используя метод гидродистилляции.

Для получения спиртовых экстрактов навеску измельченных побегов туи длиной 15–20 см (~1 г) помещали в круглодонную колбу с обратным холодильником, добавляли 30 мл 70%-ного этанола и на кипящей водяной бане нагревали содержимое в течение 30 мин. Экстракцию проводили дважды. После отделения нерастворимого остатка путем фильтрования полученный экстракт помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, охлаждали и 70%-ным этанолом доводили объем до метки.

Для установления компонентного и энантиомерного составов образцов эфирного масла туи использовали газовый хроматографа «Хроматэк-Кристалл», оснащенный пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Cyclosil B (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм). Разделение осуществляли в следующем температурном режиме: изотерма при 50 °С в течение 5 мин, подъем температуры со скоростью 2°/мин до 170 °С, изотерма в течение 40 мин в токе газа-носителя. Газ-носитель – азот (линейная скорость 13,6 см/с). Объем вводимой пробы цельного эфирного масла составлял 0,1 мкл. Временем удерживания несорбирующегося газа считали время выхода пика метана.

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

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

где  $t'_{R(x)}$ ,  $t'_{R(n)}$ ,  $t'_{R(n+1)}$  – приведенное время удерживания анализируемого компонента,  $n$ -алкана ( $C_nH_{2n+2}$ ) и следующего  $n$ -алкана ( $C_{n+1}H_{2n+4}$ ) соответственно, причем  $t'_{R(n)} < t'_{R(x)} < t'_{R(n+1)}$ .

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

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

Содержание компонентов по методу внутренней нормализации рассчитывали по формуле

$$\omega_i = S_i \cdot 100 / \sum S_i,$$

где  $\omega_i$  – содержание  $i$ -го компонента в смеси, %;  $S_i$  – площадь пика  $i$ -го компонента.

Все измерения проводили в четырехкратной повторности. Для статистической обработки результатов и создания рисунков использовали программу Excel 2016.

Антимикробную активность определяли методом диффузии этанольных растворов эфирного масла в агар (метод бумажных дисков). В качестве тест-культур использовали санитарно-показательные микроорганизмы: *Salmonella alony*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium* sp., *Escherichia coli* Hfr H, *Pseudomonas aeruginosa*. Суточную культуру микроорганизмов (0,1 мл) распределяли

шпателем по поверхности подсохшей плотной питательной среды в чашке Петри. На поверхности засеянных сред на расстоянии 1,5–2,0 см от края чашки на равном удалении друг от друга раскладывали стерильные бумажные диски диаметром 0,5 см. На диски наносили по 10 мкл растворов эфирных масел в 95%-ном этаноле, выдерживали посеы при 4 °С в течение 4 ч, а затем инкубировали в термостате при 30 °С в течение 24 ч. В ходе изучения определяли диаметр зон ингибирования.

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

Антиоксидантную активность экстрактов оценивали фотометрическим методом по содержанию полифенольных соединений. Для количественного определения полифенольных соединений в качестве фотометрического реагента использовали 18-молибдендифосфатный гетерокомплекс структуры Доусона (18-МФК). Сумму полифенольных соединений определяли методом градуировочного графика в расчете на стандартное вещество – рутин. Для построения градуировочного графика использовали стандартные растворы рутина в интервале концентраций  $2,5 \cdot 10^{-6}$ – $5,0 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

Уравнение градуировочного графика имеет вид:  $y = 0,0385x - 0,029$ .

Значение коэффициента корреляции, равное 0,9993, свидетельствует о наличии линейной зависимости оптической плотности от концентрации рутина.

Для измерения антиоксидантной активности аликвоту анализируемого раствора экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, вносили 0,8 мл раствора 18-МФК с концентрацией  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л, 5 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,4) и дистиллированной водой доводили объем до метки. Через 15 мин измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ при 820 нм в стеклянной кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения, содержащего все компоненты, кроме анализируемого.

**Результаты и их обсуждение.** Наибольший выход эфирного масла отмечен для культиваров ‘Globosa’ (табл. 1). Накопление эфирного масла в хвое ‘Brabant’ оказалось почти в 2 раза ниже, чем у других культиваров.

Т а б л и ц а 1. Выход эфирного масла из растительного сырья *T. occidentalis*

Table 1. Yield of essential oils from *T. occidentalis* raw material

Образец	Выход эфирного масла, %	
	в расчете на свежее сырье	в расчете на сухое сырье
1	0,94	2,13
2	0,42	0,99
3	1,05	2,29
4	1,02	2,28

Исследованные образцы эфирных масел близки по качественному составу, однако различаются по количественному содержанию основных компонентов (табл. 2).

На хроматограммах всех образцов зафиксировано 26 соединений, идентифицированных в аналитически значимых количествах. Их суммарная массовая доля составляет  $\approx 95$ – $97$  %.

Главными компонентами во всех изученных образцах являлись туйоны, причем преобладающим соединением являлся  $\alpha$ -туйон. Его вклад в суммарную концентрацию изомеров туйона колеблется в пределах  $\approx 82$ – $83$  % (культивары ‘Brabant’, ‘Globosa Nana’ и ‘Globosa Alba’) и достигает  $\approx 85$  % в масле из хвои ‘Aurea Golden’. В последнем образце зафиксирована более высокая концентрация изомеров туйона ( $\approx 71$  %) по сравнению с другими маслами ( $\approx 67$ – $68$  %).

Т а б л и ц а 2. Идентифицированные компоненты эфирных масел *T. occidentalis*T a b l e 2. Identified components of the essential oils of *T. occidentalis*

Соединение	Массовая доля компонента в образцах, %			
	1	2	3	4
$\alpha$ -Гуйен	0,09	0,22	0,03	0,05
$\alpha$ -Пинен	0,31	0,53	0,15	0,16
Камфен	0,51	0,59	0,25	0,34
Сабинен	1,78	5,10	0,96	1,31
Мирцен	1,07	1,57	0,62	0,51
$\alpha$ -Терпинен	0,25	0,24	0,18	0,23
Лимонен	0,78	0,93	0,52	0,57
<i>p</i> -Цимен	0,22	0,67	0,19	0,26
$\gamma$ -Терпинен	0,43	0,48	0,33	0,40
Терпинолен	0,16	0,12	0,11	0,13
Транс-сабиненгидрат	0,06	0,12	0,04	0,05
Фенхон	13,12	8,57	15,03	15,46
$\alpha$ -Гуйон	60,93	55,26	56,78	55,41
$\beta$ -Гуйон	10,45	11,83	11,52	11,40
Камфора	0,76	0,47	3,57	3,57
Терпинен-4-ол	1,65	2,84	1,85	1,93
Борнилацетат	1,71	2,50	0,85	1,03
Сабинилацетат	0,01	0,28	0,12	0,11
Борнеол	0,58	0,40	0,37	0,39
$\alpha$ -Терпинеол	0,28	0,34	0,26	0,28
Карвон	0,13	0,19	0,25	0,22
Терпинилацетат	0,47	0,72	0,54	0,52
Транс-кариофиллен	0,12	0,28	0,15	0,09
Карвакрол	0,10	0,11	0,21	0,18
Транс-кариофиллен-оксид	0,10	0,35	0,24	0,26
Биерен	0,59	1,15	0,80	1,09
Всего	96,66	96,05	96,17	96,57

В исследованных образцах в достаточно больших количествах присутствовал фенхон, причем степень его накопления в эфирном масле сорта 'Brabant' была почти в 2 раза ниже, чем в маслах других культиваров.

Монотерпеновые соединения представлены преимущественно мирценом и сабинином, наибольшие концентрации которых зафиксированы для эфирного масла 'Brabant'. Содержание других монотерпенов составляет менее 1 %, что близко к данным, полученным в работах [13, 16, 17].

Образцы сортов 'Brabant' и 'Aurea Golden' отличаются от масел культиваров 'Globosa' более низкой (в 5–7 раз) концентрацией камфоры и более высоким содержанием борнилацетата.

Концентрации идентифицированных спиртов составляли  $\approx 3$ –3,5 %, причем наибольшее содержание этих соединений характерно для эфирного масла культивара 'Brabant'. В этом же образце отмечена высокая степень накопления терпеновых эфиров по сравнению с другими маслами. Так, содержание в нем борнилацетата, сабинилацетата и терпинилацетата почти в 2 раза превышает концентрацию этих соединений в других образцах. Во всех изученных маслах содержание сесквитерпеновых соединений и дитерпенов не превышает 1 %.

В целом исследованные эфирные масла туи отличались интенсивным биосинтезом кислородсодержащих терпеновых соединений, суммарное количество которых изменялось от  $\approx 83$  % у сорта 'Brabant' до  $\approx 90$ –91 % у остальных образцов.

По характеру распределения энантиомеров исследованные эфирные масла можно разделить на две группы (табл. 3). Первая группа включает образцы 1, 2, извлеченные из колоновидных сортов туи, во вторую группу входят масла, полученные из хвои деревьев с шаровидной формой кроны (образцы 3, 4). Внутри каждой группы культивары отличаются окраской хвои.

Т а б л и ц а 3. Распределение энантиомеров терпеноидов в эфирных маслах *T. occidentalis*T a b l e 3. Enantiomeric distribution of terpenoids in the essential oils of *T. occidentalis*

Соединение	Распределение энантиомеров (-/+ в образцах, %			
	1	2	3	4
$\alpha$ -Пинен	20:80	20:80	40:60	40:60
Камфен	50:50	50:50	50:50	50:50
Лимонен	30:70	30:70	45:55	45:55
Камфора	15:85	40:60	5:95	5:95
Терпинен-4-ол	45:55	45:55	45:55	45:55
Борнеол	70:30	70:30	60:40	60:40
$\alpha$ -Терпинеол	30:70	30:70	20:80	20:80

Преобладающими энантиомерами  $\alpha$ -пинена, лимонена и  $\alpha$ -терпинеола являются (+)-формы, причем количественное соотношение энантиомеров этих соединений является характерным для каждой из выделенных групп. Для масел из колоновидных сортов вклад (-)-форм существенно выше, чем в маслах из культиваров с шаровидной формой кроны. Распределение энантиомеров камфоры также зависит от формы кроны культивара. Эфирные масла из шаровидных форм являются практически оптически чистыми по (+)-камфоре.

Независимо от сорта туи энантиомеры камфена и терпинен-4-ола представлены в эфирных маслах в равных количествах.

Особенности компонентного состава и характер распределения энантиомеров эфирных масел *T. occidentalis* определяют их антимикробную активность. В табл. 4 приведены диаметры зон ингибирования тест-культур микроорганизмов этанольными растворами исследованных образцов.

Таблица 4. Диаметры зон ингибирования роста тест-культур растворами эфирного масла *T. occidentalis*T a b l e 4. Diameters of growth inhibition zones of test cultures by solutions of *T. occidentalis* essential oil

Тест-культура бактерий	Диаметр зоны ингибирования роста (образцы 1–4) в зависимости от концентрации эфирного масла, мм											
	5,0 %				0,5 %				0,05 %			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Salmonella alony</i>	20	22	24	26	13	16	18	19	10	13	15	16
<i>Bacillus subtilis</i>	21	23	24	26	14	15	17	18	11	13	15	15
<i>Clostridium</i> sp.	22	23	25	27	15	17	17	19	12	14	14	16
<i>Escherichia coli</i> Hfr H	21	21	26	26	16	17	18	19	13	15	15	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	20	25	25	14	16	18	18	11	12	15	15

Все изученные образцы в интервале концентраций эфирного масла от 0,05 до 5,0 % подавляли рост бактерий, однако уменьшение концентрации эфирного масла приводило к снижению эффективности его действия в отношении всех микроорганизмов.

Уровень чувствительности тест-культур к эфирным маслам зависит от вида микроорганизма. Растворы всех образцов активнее всего действовали на микроорганизмы *Clostridium* sp. Несколько слабее проявлялось их ингибирующее влияние в отношении *Salmonella alony* и *Escherichia coli*. Согласно литературным данным [18], механизм антимикробного действия эфирных масел заключается в нарушении проницаемости цитоплазматических мембран, снижении интенсивности метаболизма и активности аэробного дыхания микроорганизмов. По активности ингибирования роста тест-культур эфирные масла из колоновидных форм уступали образцам, извлеченным из культиваров с шаровидной формой кроны.

Для установления взаимосвязи компонентного состава и антибактериальных свойств исследованных образцов эфирных масел были протестированы спиртовые растворы их некоторых компонентов (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Диаметры зоны інгібавання росту тест-культур у прысутстві 20%-ных этанольных раствораў стандартных рэчываў

T a b l e 5. Diameters of growth inhibition zones of test cultures by 20% ethanol solutions of standard samples

Тест-культура бактерый	Раствор стандарта			
	α- и β-туйоны	фенхон	(+)-камфора	(-)-камфора
<i>Salmonella alony</i>	21	26	23	21
<i>Bacillus subtilis</i>	21	23	20	19
<i>Clostridium</i> sp.	26	22	21	19
<i>Escherichia coli</i> Hfr H	25	24	21	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	24	22	21

Наиболее активно подавлял рост всех тест-культур спиртовой раствор фенхона, причем рост грамотрицательных бактерий подавлялся в большей степени, чем грамположительных микроорганизмов, что, вероятно, связано с особенностями строения их клеточной стенки. Этиловые растворы изомеров туйона сильнее всего действовали на микроорганизмы *Clostridium* sp. и *Escherichia coli*. В целом эфирные масла колоновидных форм содержали более низкие концентрации камфоры, карвакрола, фенхона по сравнению с образцами второй группы с шаровидной кроной, что согласуется с их более низкой антимикробной активностью.

Важную роль в проявлении биологической активности вторичных метаболитов растений играет оптическая изомерия их основных компонентов. Различная стереоспецифичность действия (связь между пространственной структурой и биологической активностью) отмечена для ряда соединений терпенового ряда. Так, (-)-α-пинен и (+)-камфен обладают более высокой антимикробной активностью по сравнению с их оптическими изомерами [19, 20]. Влияние оптической активности карвона на проявление седативных свойств исследовано в работе [21]. Присутствие α-туйона и Δ<sup>3</sup>-карена в (-)-форме, по мнению авторов [14, 22], определяет антигрибковые свойства цельных эфирных масел.

Поскольку в образцах обеих групп эфирного масла характер распределения энантиомеров камфоры различается, были изучены антимикробные свойства этих соединений в зависимости от их оптической активности (табл. 5). Ингибирование роста тест-культур растворами энантиомеров камфоры в целом выражено сильнее для (+)-формы. В образцах из колоновидных форм туйи концентрация (+)-формы камфоры существенно ниже, что коррелирует с их менее выраженными антимикробными свойствами.

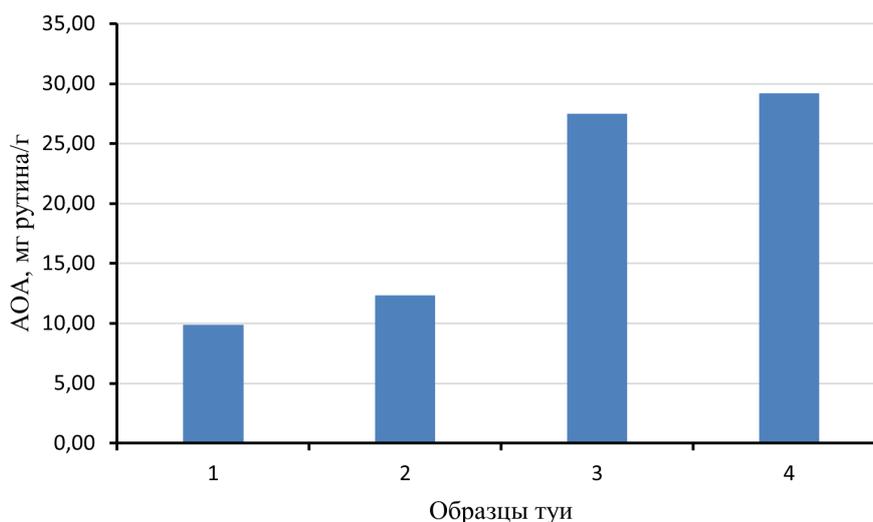
Изучена также антимикробная активность спиртовых экстрактов *T. occidentalis*. Их антимикробные свойства оказались менее выражены, чем в растворах эфирных масел (табл. 6).

Таблица 6. Диаметры зон ингибирования роста тест-культур 5%-ными растворами экстрактов *T. occidentalis*T a b l e 6. Diameters of growth inhibition of zones of test cultures by 5% ethanol solutions of the extracts of *T. occidentalis*

Тест-культура бактерый	Диаметр зоны ингибирования в образцах, мм			
	1	2	3	4
<i>Salmonella alony</i>	16	17	16	18
<i>Bacillus subtilis</i>	15	16	17	17
<i>Clostridium</i> sp.	14	18	17	17
<i>Escherichia coli</i> Hfr H	16	18	17	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	16	16	17

Диаметры зон ингибирования роста тест-культур экстрактами изученных культиваров различаются незначительно. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) спиртовых экстрактов по отношению к бактериям *Escherichia coli* Hfr H для всех образцов составляет 1,0 %.

Форма кроны и окраска хвои культиваров туйи также оказывают влияние на проявление антиоксидантной активности спиртовых экстрактов (см. рисунок).



Содержание полифенольных соединений в экстрактах *T. occidentalis*  
Content of polyphenolic compounds in the ethanol solutions of the extracts of *T. occidentalis*

Суммарное содержание полифенольных соединений, характеризующее антиоксидантную активность, в экстрактах туи с шаровидной формой кроны (образцы 3, 4) более чем в 2 раза превышает содержание в экстрактах из хвой колоновидных растений (образцы 1, 2) (см. рисунок).

**Заключение.** Полученные экспериментальные результаты исследования компонентного состава, характера распределения энантиомеров и антимикробной активности эфирных масел и спиртовых экстрактов интродуцированных культиваров туи западной позволяют сделать вывод о перспективности их использования при разработке антимикробных средств с заданными профилактическими и лекарственными свойствами.

#### Список использованных источников

1. Pons, M. J. Current trends in epidemiology and antimicrobial resistance in intensive care units / M. J. Pons, J. Ruiz // J. Emerg. Crit. Care. Med. – 2019. – Vol. 3. – Art. 5. <https://doi.org/10.21037/jeccm.2019.01.05>
2. *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae): Review of botanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects / L. D. S. Alves [et al.] // Int. J. Pharm. Sci. Res. – 2014. – Vol. 5, N 4. – P. 1163–1177. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(4\).1163-77](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1163-77)
3. *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae): Ethnobotany, Phytochemistry and Biological activity / S. Caruntu [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, N 22. – Art. 5416–5431. <https://doi.org/10.3390/molecules25225416>
4. Study of volatile compounds and antimicrobial activity of *Thuja* essential oils / E. Dumitrescu [et al.] // Medicamentul Veterinary/Veterinary Drug. – 2021. – Vol. 15, N 2. – P. 63–75.
5. Chemical composition and antifungal activity against *Botrytis sinerea* of the essential oils from the leaves of three conifer species / S. H. Yong [et al.] // Forest Sci. Technol. – 2021. – Vol. 17, N 4. – P. 169–179. <https://doi.org/10.1080/21580103.2021.1976683>
6. Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult t-cell leukemia/lymphoma (VII): active principles from *Thuja occidentalis* L. / D. Nakano [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, N 24. – Art. 7619. <https://doi.org/10.3390/molecules26247619>
7. Therapeutic potential of monoterpene  $\alpha$ -thujone, the main compound of *Thuja occidentalis* L. essential oil, against malignant glioblastoma multiforme cells *in vitro* / M. Pudełek [et al.] // Fitoterapia. – 2019. – Vol. 134. – P. 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.020>
8. Gupta, M. A review of phyto-chemical constituent and pharmacological activity of *Thuja* species / M. Gupta, K. Sharma // Int. J. Pharm. Res. Appl. – 2021. – Vol. 6, N 1. – P. 85–95. <https://doi.org/10.35629/7781-06018595>
9. Rajendra, C. S. A review of phytochemical constituents and pharmacological activity of thuja species / C. S. Rajendra, S. Mayuri, K. Suvarna // Int. J. Pharm. Res. Applications. – 2023. – Vol. 8, N 1. – P. 1583–1590. <https://doi.org/10.35629/7781-080115831590>
10. Sah, S. N. Antibacterial effects of *Thuja* leaves extract / S. N. Sah, S. Regmi, M. K. Tamang // Int. J. Appl. Sci. Biotechnol. – 2017. – Vol. 5, N 2. – P. 256–260. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i2.17617>
11. Изучение антимикробных свойств экстрактивных веществ хвойных / В. А. Сенашова [и др.] // Сибир. лес. журн. – 2019. – № 3. – С. 71–77.

12. Chemosystematic value of the essential oil composition of *Thuja* species cultivated in Poland—antimicrobial activity / D. Tsiri [et al.] // *Molecules*. – 2009. – Vol. 14, N 11. – P. 4707–4715. <https://doi.org/10.3390/molecules14114707>
13. Lis, A. Comparison of chemical composition of the essential oils from different parts of *Thuja occidentalis* L. ‘Brabant’ and *Thuja occidentalis* L. ‘Smaragd’ / A. Lis, R. Liszkiewicz, A. Krajewska // *Herba Polonica*. – 2016. – Vol. 62, N 3. – P. 20–27. <https://doi.org/10.1515/herbo-2016-0014>
14. Defensive functions of volatile organic compounds and essential oils from northern white-cedar in China / L. P. Bai [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2020. – Vol. 20. – Art. 500. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02716-6>
15. The influence of organs on biochemical properties of Tunisian *Thuja occidentalis* essential oils / S. Bellili [et al.] // *Symmetry*. – 2018. – Vol. 10, N 11. – Art. 649. <https://doi.org/10.3390/sym10110649>
16. Состав эфирных масел некоторых представителей рода *Thuja*, интродуцированных в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси / А. Г. Шутова [и др.] // Тр. БГУ. – 2009. – Т. 4. – Ч. 2. – С. 237–242.
17. Химический состав эфирных масел *Cupressus sempervirens* L. и *Thuja occidentalis* L. и их активность в отношении фитопатогенных грибов / И. М. Фицев [и др.] // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 3. – С. 392–407.
18. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli* / J. Xu [et al.] // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2008. – Vol. 47, N 3. – P. 174–179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>
19. Антимикробные свойства эфирного масла *Pseudotsuga menziesii* / Н. А. Коваленко [и др.] // Вест. НАН Беларуси. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 431–439.
20. Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene / A. C. Rivas de Silva [et al.] // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17, N 6. – P. 6305–6316. <https://doi.org/10.3390/molecules17066305>
21. Influence of the chirality of (R)-(-) and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study / D. P. de Sousa [et al.] // *Chirality*. – 2007. – Vol. 19, N 4. – P. 284–268. <https://doi.org/10.1002/chir.20379>
22. Chemical composition, enantiomeric distribution, and antifungal activity of the oleoresin essential oil of protium amazonicum from Ecuador / P. Satyal [et al.] // *Medicines*. – 2017. – Vol. 4, N 4. – Art. 70. <https://doi.org/10.3390/medicines4040070>

## References

1. Pons M. J., Ruiz J. Current trends in epidemiology and antimicrobial resistance in intensive care units. *Journal of Emergency and Critical Care Medicine*, 2019, vol. 3, art. 5. <https://doi.org/10.21037/jeccm.2019.01.05>
2. Alves L. D. S., Figueiredo C. B. M., Silva C. C. A. R., Marques G. S., Ferreira P. A. *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae): Review of botanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2014, vol. 5, no. 4, pp. 1163–1177. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(4\).1163-77](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1163-77)
3. Caruntu S., Ciceu A., Kinga Olah N., Don I. *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae): Ethnobotany, Phytochemistry and Biological activity. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 22, art. 5416. <https://doi.org/10.3390/molecules25225416>
4. Dumitrescu E., Kraunovic M. C., Orășan-Alic A. S., Moruzi R. F., Mohamed A. E., Doma A. O., Muselin F., Cristina R. T. Study of volatile compounds and antimicrobial activity of *Thuja* essential oils. *Medicamentul Veterinar/Veterinary Drug*, 2021, vol. 15, pp. 63–75.
5. Yong S. H., Song H. J., Park D. J., Kim D. H. Chemical composition and antifungal activity against *Botrytis sinerea* of the essential oils from the leaves of three conifer species. *Forest Science and Technology*, 2021, vol. 17, no. 4, pp. 169–179. <https://doi.org/10.1080/21580103.2021.1976683>
6. Nakano D., Ishitsuka K., Ishihara M., Tsuchihashi R., Okawa M., Tamura K., Kinjo J. Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (VII): active principles from *Thuja occidentalis* L. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 24, art. 7619. <https://doi.org/10.3390/molecules26247619>
7. Pudełek M., Catapano J., Kochanowski P., Mrowiec K., Janik-Olchawa N., Czyż J., Ryszawy D. Therapeutic potential of monoterpene  $\alpha$ -thujone, the main compound of *Thuja occidentalis* L. essential oil, against malignant glioblastoma multi-forme cells *in vitro*. *Fitoterapia*, 2019, vol. 134, pp. 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.020>
8. Gupta M., Sharma K. A review of phyto-chemical constituent and pharmacological activity of *Thuja* species. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 85–95. <https://doi.org/10.35629/7781-06018595>
9. Rajendra C. S., Mayuri S., Suvarna K. A review of phytochemical constituents and pharmacological activity of *Thuja* species. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 2023, vol. 8, no. 1, pp. 1583–1590. <https://doi.org/10.35629/7781-080115831590>
10. Sah S. N., Regmi S., Tamang M. K. Antibacterial effects of *Thuja* leaves extract. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 2017, vol. 5, no. 2, pp. 256–260. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i2.17617>
11. Senashova V. A., Permyakova G. V., Grodnitskaya I. D., Pashenova N. V., Loskutov S. R. The study of anti-microbial properties of extractive substances of conifers. *Sibirskii lesnoi zurnal* [Siberian forest journal], 2019, no. 3, pp. 71–77 (in Russian).
12. Tsiri D., Graikou K., Pobłocka-Olech L., Krauze-Baranowska M., Spyropoulos C., Chinou I. Chemosystematic value of the essential oil composition of *Thuja* species cultivated in Poland—antimicrobial activity. *Molecules*, 2009, vol. 14, no. 11, pp. 4707–4715. <https://doi.org/10.3390/molecules14114707>
13. Lis A., Liszkiewicz R., Krajewska A. Comparison of chemical composition of the essential oils from different parts of *Thuja occidentalis* L. ‘Brabant’ and *Thuja occidentalis* L. ‘Smaragd’. *Herba Polonica*, 2016, vol. 62, no. 3, pp. 20–27. <https://doi.org/10.1515/herbo-2016-0014>

14. Bai L., Wang W., Hua J., Guo Z., Luo S. Defensive functions of volatile organic compounds and essential oils from northern white-cedar in China. *BMC Plant Biology*, 2020, vol. 20, art. 500. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02716-6>
15. Bellili S., Aouadhi C., Dhifi W., Ghazghazi H., Jlassi C., Sadaka C., Beyrouthy M. E., Maaroufi A., Cherif A., Mnif W. The influence of organs on biochemical properties of Tunisian *Thuja occidentalis* essential oils. *Symmetry*, 2018, vol. 10, no. 11, art. 649. <https://doi.org/10.3390/sym10110649>
16. Shutova H. G., Spiridovich E. V., Garanovich I. M., Nevero A. S., Rizevskii S. V., Kurchenko V. P., Ivanova A. V. Essential oil composition of some *Thuja* species and cultivars introduced in CBG of the NAS of Belarus. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta* [Proceedings of the Belarusian State University], 2009, vol. 4, pt. 2, pp. 237–242 (in Russian).
17. Fitsev I. M., Nikitin E. N., Rakhmaeva A. M., Terenzhev D. A., Sakhno T. M., Nasybullina Zh. R. Chemical composition of *Cupressus sempervirens* L. and *Thuja occidentalis* L. essential oils and their activity against phytopathogenic fungi. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki* [Scientific notes of Kazan University. Natural sciences series], 2022, vol. 164, no. 3, pp. 392–407 (in Russian).
18. Xu J., Zhou F., Ji B.-P., Pei R.-S., Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, vol. 47, no. 3, pp. 174–179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>
19. Kovalenko N. A., Supichenko G. N., Akhramovich T. I., Fes'kova A., Leont'ev V. N., Shutova H. G. Anti-microbial properties of *Pseudotsuga menziesii* essential oil. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 431–439 (in Russian).
20. da Silva A. C., Lopes P. M., Barros de Azevedo M. M., Costa D. C. M., Alviano C. S., Alviano D. S. Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 6, pp. 6305–6316. <https://doi.org/10.3390/molecules17066305>
21. de Sousa D. P., de Farias Nóbrega F. F., de Almeida R. N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. *Chirality*, 2007, vol. 19, no. 4, pp. 284–268. <https://doi.org/10.1002/chir.20379>
22. Satyal P., Powers C. N., Parducci R., McFeeters R. L., Setzer W. N. Chemical composition, enantiomeric distribution and antifungal activity of the oleoresin essential oil of *Protium amazonicum* from Ecuador. *Medicines*, 2017, vol. 4, no. 4, art. 70. <https://doi.org/10.3390/medicines4040070>

### Информация об авторах

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

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

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

Нечай Юлия Андреевна – студент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Jnechai22@gmail.com

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

### Information about the authors

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

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

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

Yulia A. Nychai – 4<sup>th</sup> year student of the Faculty of Technology of Organic Substances. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Jnechai22@gmail.com

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