

# ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2024. Т. 69, № 4

# ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2024. Т. 69, № 4

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

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,  
свидетельство о регистрации № 395 от 18 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 Беларусі по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь
- В. Г. Колосовская** (ведущий редактор журнала)
- З. М. Алещенкова** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларусі, 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 Беларусі,  
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. Ламан** – 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](mailto:biolvesti@mail.ru)  
Сайт: [vestibio.belnauka.by](http://vestibio.belnauka.by)

---

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2024. Т. 69, № 4.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

---

Редактор *В. Г. Колосовская*

Компьютерная верстка *С. Н. Костюк*

Подписано в печать 10.10.2024. Выход в свет 30.10.2024. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 78 экз. Заказ 200.

Цена номера: индивидуальная подписка – 14,01 руб., ведомственная подписка – 32,74 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220084, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».

Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2024

# PROCEEDINGS

## OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

---

BIOLOGICAL SERIES. 2024, vol. 69, no. 4

---

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

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

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

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

### 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

**Michail 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

**Nadezhda I. Dubovets** – 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  
**Vasily E. Gayduk** – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus  
**Nikolay A. Kolchanov** – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation  
**Vladimir V. Kuznetsov** – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation  
**Wanda Olech-Piasecka** – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Republic of Poland  
**Oleg N. Pugachev** – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation  
**Alexander I. Rapoport** – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvian Republic  
**Igor A. Tikhonovich** – All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russian Federation

#### *Address of the Editorial Office:*

*1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.  
Phone: +375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru  
Website: vestibio.belnauka.by*

---

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series, 2024, vol. 69, no. 4.

*Printed in Russian, Belarusian and English languages*

---

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

Sent for press 10.10.2024. Output 30.10.2024. Format 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Offset paper.  
Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher’s signatures 11.3. Circulation 78 copies. Order 200.  
Number price: individual subscription – 14.01 byn., departmental subscription – 32.74 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise “Publishing House “Belaruskaya Navuka”.  
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer,  
distributor of printing editions no. 1/18 dated of August 2, 2013. License for press no. 02330/455 dated of December 30, 2013.  
Address: F. Skorina Str., 40, 220084, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE “Publishing House “Belaruskaya Navuka”,  
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2024



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

### ЗМЕСТ

<b>Молчан В. О., Куликова Е. А., Хейдорова Е. Э., Демянчик В. В., Корзун Е. В., Никифоров М. Е.</b> Верификация видовой принадлежности беззубой ящерицы рода <i>Anguis</i> , обитающей на территории Беларуси.....	271
<b>Сверчкова Н. В., Проскурнина И. А., Литвинова В. С., Рябая Н. Е., Саханчук А. И., Коломиец Э. И.</b> Влияние пробиотиков на микробиом рубца лактирующих коров .....	280
<b>Кулеш В. Ф., Гигиняк Ю. Г.</b> Размножение сибирского шримса <i>Echopalaemon modestus</i> (Heller) из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан): репродуктивная производительность и плодовитость.....	289
<b>Шишлова-Соколовская А. М., Урбанович О. Ю.</b> CRISPR/Cas9-опосредованный направленный мутагенез гена <i>PDS Nicotiana tabacum</i> L. ....	298
<b>Рупасова Ж. А., Яковлев А. П., Коломиец Э. И., Алещенкова З. М., Булавко Г. И., Зимич С. П., Добрянская К. А.</b> Влияние минеральных и биологических удобрений на формирование микробиоты корнеобитаемой зоны выработанного торфяника верхового типа под посадками растений клюквы крупноплодной в условиях Беларуси.....	309
<b>Танкевич Е. А., Никитин А. Н., Симончик Ю. К.</b> Влияние основных физиологических групп микроорганизмов на биодоступность <sup>137</sup> Cs и его поступление из торфянисто-глеевой почвы в биомассу <i>Avena sativa</i> L. ....	321
<b>Мялик А. Н., Гудная Н. В., Кулагина Т. Г., Дубарь Д. А., Титок В. В.</b> Природоохранное значение генетической структуры регрессивных популяций <i>Lobelia dortmanna</i> L. в Беларуси.....	329
<b>Байчоров В. М., Гигиняк Ю. Г., Мороз М. Д., Куликова Е. А., Корзун Е. В., Мустафаева З. А., Лебедева Н. И., Титова Н. О., Мирзаев У. Т.</b> Экологическое качество воды речных экосистем особо охраняемых природных территорий Беларуси и Узбекистана.....	340

**CONTENTS**

<b>Molchan V. O., Kulikova A. A., Kheidorova E. E., Demianchyk V. V., Korzun Y. V., Nikiforov M. E.</b> Verification of species assignment of the legless lizard of the genus <i>Anguis</i> living in the territory of Belarus.....	271
<b>Sverchkova N. V., Proskurnina I. A., Litvinova V. S., Ryabaya N. E., Sachanchuk A. I., Kolomiets E. I.</b> Effect of probiotics on the rumen microbiome of lactating cows .....	280
<b>Kulesh V. F., Hihiniak Yu. G.</b> Reproduction of Siberian shrimp <i>Exopalaemon modestus</i> (Heller) from the Kapchagai reservoir (Republic of Kazakhstan): reproductive performance and fecundity.....	289
<b>Shishlova-Sokolovskaya A. M., Urbanovich O. Yu.</b> CRISPR/Cas9-mediated site-directed mutagenesis of the <i>PDS</i> gene of <i>Nicotiana tabacum</i> L. ....	298
<b>Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P., Kolomiets E. I., Aleshchenkova Z. M., Bulavko G. I., Zimich S. P., Dobryanskaya K. A.</b> Effect of mineral and biological fertilizers on the formation of the microbiota of the root zone of the developed top-type peat bog under the planting of large-fruited cranberry plants in the conditions of Belarus.....	309
<b>Tankevich E. A., Nikitin A. N., Simonchyk Yu. K.</b> Influence of the main physiological groups of microorganisms on the bioavailability of <sup>137</sup> Cs and its entry from peaty-gley soil into the biomass of <i>Avena sativa</i> L.....	321
<b>Mialik A. M., Hudnaya N. U., Kulahina T. G., Dubar D. A., Titok V. V.</b> Conservation significance of the genetic structure of regressive populations of <i>Lobelia dortmanna</i> L. in Belarus.....	329
<b>Baitchorov V. M., Hihiniak Yu. G., Moroz M. D., Kulikova A. A., Korzun Ya. V., Mustafayeva Z. A., Lebedeva N. I., Titova N. O., Mirzaev U. T.</b> Ecological quality of water of river ecosystems of specially protected natural territories of Belarus and Uzbekistan.....	340

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 597/599; 591.9; 57.063.7; 575.86

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-271-279>

Поступила в редакцию 17.07.2024

Received 17.07.2024

В. О. Молчан<sup>1</sup>, Е. А. Куликова<sup>1</sup>, Е. Э. Хейдорова<sup>1</sup>, В. В. Демянчик<sup>2</sup>,  
Е. В. Корзун<sup>1</sup>, М. Е. Никифоров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси, Брест, Республика Беларусь

## ВЕРИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БЕЗНОГОЙ ЯЩЕРИЦЫ РОДА *ANGUIS*, ОБИТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

**Аннотация.** В работе представлены обзор данных о распространении веретеницы на территории Беларуси и результаты молекулярно-генетической видовой идентификации по данным региона *COI* мтДНК 19 представителей рода *Anguis*, собранных в 13 административных районах 5 областей Беларуси (кроме Могилевской области) в период с 2018 по 2023 г. Установлено, что на территории Беларуси обитает только один вид безногих ящериц – колхидская веретеница (*Anguis colchica* Nordmann, 1840). Показано, что белорусская популяция вида характеризуется низкими значениями нуклеотидного ( $\pi = 0,00090$ ) и гаплотипического ( $Hd \pm SD = 0,351 \pm 0,111$ ) разнообразия и представлена двумя ранее не известными гаплотипами, отстоящими от гаплотипов других видов на генетическую дистанцию от 0,05740–0,05995 (*A. graeca*) до 0,09439–0,09694 (другие виды рода *Anguis*).

**Ключевые слова:** Squamata, Anguinae, митохондриальная ДНК, ДНК-баркодинг, *COI*, *Anguis colchica*, *Anguis fragilis*, Беларусь

**Для цитирования:** Верификация видовой принадлежности безногой ящерицы рода *Anguis*, обитающей на территории Беларуси / В. О. Молчан [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 271–279. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-271-279>

Vladislav O. Molchan<sup>1</sup>, Alena A. Kulikova<sup>1</sup>, Ekaterina E. Kheidorova<sup>1</sup>, Victor V. Demianchuk<sup>2</sup>,  
Yahor V. Korzun<sup>1</sup>, Michail E. Nikiforov<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Brest, Republic of Belarus

## VERIFICATION OF SPECIES ASSIGNMENT OF THE LEGLESS LIZARD OF THE GENUS *ANGUIS* LIVING IN THE TERRITORY OF BELARUS

**Abstract.** The article presents an overview of the data on the distribution of the slowworm in Belarus and the results of molecular genetic species identification according to the mtDNA *COI* region of 19 representatives of the genus *Anguis* collected in 13 administrative districts of 5 regions of Belarus (except the Mogilev region) in the period 2018–2023. It has been established that only one species of legless lizards lives in the territory of Belarus – the Eastern Slowworm (*Anguis colchica* Nordmann, 1840). It was revealed that the Belarusian population of the species is characterized by low values of nucleotide ( $\pi = 0.00090$ ) and haplotypic ( $Hd \pm SD = 0.351 \pm 0.111$ ) diversity and is represented by two previously unknown haplotypes that are separated from haplotypes of other species by a genetic distance from 0.05740–0.05995 (*A. graeca*) to 0.09439–0.09694 (other species genus *Anguis*).

**Keywords:** Squamata, Anguinae, mitochondrial DNA, DNA barcoding, *COI*, *Anguis colchica*, *Anguis fragilis*, Belarus

**For citation:** Molchan V. O., Kulikova A. A., Kheidorova E. E., Demianchuk V. V., Korzun Y. V., Nikiforov M. E. Verification of species assignment of the legless lizard of the genus *Anguis* living in the territory 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. 4, pp. 271–279 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-271-279>

**Введение.** До сравнительно недавнего времени считалось, что веретеницы (лат. *Anguis*), род ящериц из семейства веретеницевых (Anguinae), представлен только одним видом – *Anguis fragilis* L., 1758, распространенным в пределах Западной Палеарктики.

Системных исследований этого рода в Беларуси не проводилось, поэтому по многим районам страны данные о частоте встречаемости веретеницы отсутствуют или фрагментарны. Известно, что на территории республики веретеница распространена мозаично и предпочитает смешанные, березовые, ольховые и сосновые леса, обитая преимущественно на полянах, опушках, вырубках,

просеках, по обочинам дорог. По данным Пикулика [1], в 1988 г. плотность населения веретеницы составляла в сосняках 0,02 (0–1) экз/га, в березняках – 2,5 (0–44,4), в ольшаниках – 0,4 (0–9,6), на обочинах дорог – 1,5 (0–50), на пойменных лугах озер – 1,7 (0–8,4) экз/га. По данным С. М. Дробенкова за 2018 г. [2], веретеница встречается в 3,5 % обследованных биоценозов с плотностью  $14,5 \pm 1,6$  экз/га. На территории Минска веретеницы зарегистрированы в парках и лесопарках, расположенных чаще всего в периферической зоне города, где ее плотность составляет 11,1–33,6 экз/га [3]. В Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике, по данным В. Н. Лукашевича за 2008–2009 гг. [4], плотность веретеницы в березняках достигала 8,3 экз/га, в ольшаниках – 4,2, по берегам мелиоративных каналов – 2,1 экз/га.

Наиболее полная информация о веретенице в Беларуси представлена в монографии «Пресмыкающиеся Белоруссии» [1], где приведены морфометрические характеристики 12 самцов и 48 самок: длина тела, длина хвоста, длина головы, количество чешуй вокруг середины туловища, число брюшных щитков, вид слухового отверстия (открытое/закрытое). Проанализирован показатель изменчивости положения предлобных щитков, на основании которого в то время выделяли подвиды. В работе также перечислены варианты сочетания чешуй в теменной области, представлена изменчивость рисунка в дорсальной части тела.

На основании морфологических характеристик считалось, что единственным представителем безногих ящериц рода *Anguis* в Беларуси является вид ломкая веретеница (*Anguis fragilis*), который на подвиды не разделяется [5]. Советские герпетологи придерживались мнения, что на территории СССР обитает номинативный подвид *A. fragilis fragilis* L., а реальность существования подвида *A. fragilis colchica* (Normann, 1840) ставили под сомнение [6, 7]. Н. Н. Щербак и М. И. Щербань на основе детального анализа объемного материала из 226 экз. веретениц с территории Закарпатья (44 экз.), Прикарпатья (24 экз.), Молдавии (35 экз.), Украины (30 экз.), Беларуси и РСФСР (21 экз.), Предкавказья (60 экз.), Кавказа и Закавказья (12 экз.) пришли к выводу, что для выделения западных и восточных популяций в качестве отдельных подвидов нет оснований [6].

Однако широкое использование молекулярно-генетического анализа способствовало как возведению некоторых внутривидовых форм рептилий, уже известных своими популяционными различиями, в ранг полноценных видов даже в хорошо исследованных регионах, таких как Европа [8], так и дальнейшему изучению распространения отдельных видов, входящих в видовые комплексы, несмотря на трудности их однозначной морфологической идентификации [9]. Так, в результате недавних филогеографических исследований на основе как митохондриальных, так и ядерных локусов установлено, что род *Anguis* на территории Западной Палеарктики представлен пятью самостоятельными видами: *A. cephalonica* (Werner, 1894) – Пелопоннес, *A. fragilis* (Linnaeus, 1758) – Западная Европа, *A. colchica* (Nordmann, 1840) – восточная часть Европы и Западная Азия, *A. graeca* (Bedriaga, 1881) – Балканский полуостров и *A. veronensis* (Pollini, 1818) – от Апеннинского полуострова до юго-восточной Франции [10, 11]. При этом, согласно последним опубликованным данным [12], на основе анализа фенотипических признаков 326 веретениц из Центральной Европы установлено, что виды *A. fragilis* (веретеница ломкая) и *A. colchica* (веретеница колхидская) морфологически дифференцированы. Веретеница ломкая, по сравнению с колхидской, имеет менее крепкую голову, меньшее количество покровных чешуй, часто менее выраженные ушные отверстия и разделения предлобных щитков, при этом окраска тела взрослых ящериц больше похожа на окраску ювенильных особей. Следует отметить, что ни один из проанализированных признаков в отдельности не являлся диагностическим, но более 90 % всех особей могут быть успешно отнесены к тому или другому виду по количеству покровных чешуй. В зоне контакта двух видов веретеницы характеризуются промежуточной морфологией, но проявляют больше сходства с *A. fragilis*, чем с *A. colchica*.

Ввиду географического расположения Беларусь может включать зону интерградации ареалов двух видов веретениц – ломкой и колхидской, тем более что по данным ДНК-анализа веретеница колхидская отмечена в 12 км от границы с Беларусью (Vecsikeli; 55.892 N, 26.846 E) на территории Латвии и в 10 км (Marcinkonys; 54.04 N, 24.44 E) и 25 км (Paluše; 55.33 N, 26.10 E) от границы с Беларусью на территории Литвы [13]. В России на основной территории обитает веретени-

ца колхидская, в Калининградской области – ломкая [13]. В Польше наличие гаплотипов *A. colchica* было окончательно подтверждено с помощью молекулярного анализа, проведенного Gvoždík с соавт. [10, 11], которые выявили распространение этих видов на Малопольской возвышенности и Восточно-Европейской равнине юго-восточной и восточной Польши [14]. Это вызвало дискуссии о дифференциации обоих видов и зоне их контакта [15, 16]. Таким образом, современные генетические и хорологические данные свидетельствуют о вероятности ошибки в определении вида в прошлом, а также о возможности обитания в Беларуси обоих видов – *A. fragilis* и *A. colchica*. Первая отечественная работа, в которой отмечено, что на территории Беларуси обитает веретеница колхидская, а не ломкая, – это обзор герпетофауны Полесского государственного радиационно-экологического заповедника, сделанный В. А. Лукашевичем [4]. Автор ссылается на подтвержденные молекулярно-генетическими методами данные о видовой принадлежности особи веретеницы из Беларуси (аг. Доброволя, Свислочский район, Гродненская область; 52.884 N, 23.996 E) [14].

Цель исследования – провести ДНК-диагностику видовой принадлежности веретениц из разных точек Беларуси и оценить их генетическое разнообразие по митохондриальному маркеру *COI*. Несмотря на то что основные генетические исследования рода *Anguis* в Европе проводили по участку ND2 мтДНК [10, 11, 13, 14], нами выбран ген *COI*, так как данный регион мтДНК является наиболее консервативным и позволяет наблюдать эволюционное расхождение видов на большем временном отрезке, чем быстро меняющиеся гены субъединиц НАДН-дегидрогеназного комплекса.

**Материалы и методы исследования.** Всего проанализировано 19 образцов фрагментов мышечной ткани веретениц, полученных из 13 административных районов Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской и Минской областей Беларуси (рис. 1) в период с 2018 по 2023 г. Таким образом, репрезентативно охвачена территория, наиболее приближенная к предполагаемой границе соприкосновения ареалов видов *A. fragilis* и *A. colchica*.

Выделение ДНК проводили при помощи коммерческого набора Jena Bioscience (Animal and Fungi DNA Preparation Kit, Германия), согласно протоколу производителя. Качественные и количественные показатели выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer P 330UV/Vis (IMPLEN, Германия). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоящей из 2,5 мкл 10xTaq-буфера («Праймтех», Беларусь), 2,5 мкл 10xdNTPs («Праймтех», Беларусь), 1,5 мкл 50 mM MgCl<sub>2</sub> («Праймтех», Беларусь), 2 мкл прямого и 2 мкл обратного праймеров, 0,1 мкл ДНК-полимеразы («АртБиоТех», Беларусь), 13,4 мкл dH<sub>2</sub>O и 1 мкл ДНК, в амплификаторе модели BIO-RAD C1000 Touch Thermal Cycler с использованием следующего протокола: первичная денатурация – 94 °C, 4 мин; 35 циклов денатурации (94 °C, 35 с), отжига (42 °C, 45 с), элонгации (72 °C, 1 мин); финальная элонгация – 72 °C, 7 мин. Участок гена митохондриальной ДНК *COI* амплифицировали с помощью универсальных праймеров LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3')

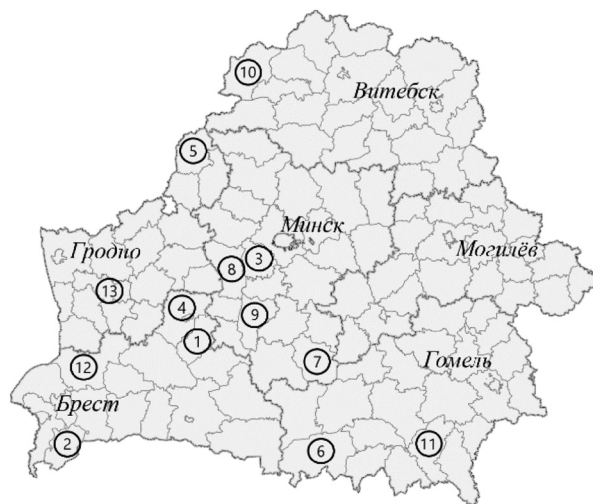


Рис. 1. Места сбора образцов биоматериала веретениц: Брестская обл.: 1 – Ляховичский р-н (Re6), 2 – Малоритский р-н (Re7, Re13), 4 – Барановичский р-н (Re18), 12 – Пружанский р-н (Re38, Re39); Витебская обл.: 10 – Браславский р-н (Re35, Re36); Гомельская обл.: 6 – Лельчицкий р-н (Re28, Re29), 11 – Хойникский р-н (Re23, Re37); Гродненская обл.: 5 – Островецкий р-н (Re19), 13 – Мостовский р-н (Re40, Re41); Минская обл.: 3 – Дзержинский р-н (Re17), 7 – Любанский р-н (Re32), 8 – Столбцовский р-н (Re33), 9 – Копыльский р-н (Re34)

Fig. 1. Collection sites of slow moth biomaterial samples: Brest region: 1 – Lyakhovichi district (Re6), 2 – Malorita district (Re7, Re13), 4 – Baranovichi district (Re18), 12 – Pruzhany district (Re38, Re39); Vitebsk region: 10 – Braslav district (Re35, Re36); Gomel region: 6 – Lelchitsy district (Re28, Re29), 11 – Khoyniki district (Re23, Re37); Grodno region: 5 – Ostrovets district (Re19), 13 – Mosty district (Re40, Re41); Minsk region: 3 – Dzerzhinsky district (Re17), 7 – Lyubansky district (Re32), 8 – Stolbtsy district (Re33), 9 – Kopylsky district (Re34)



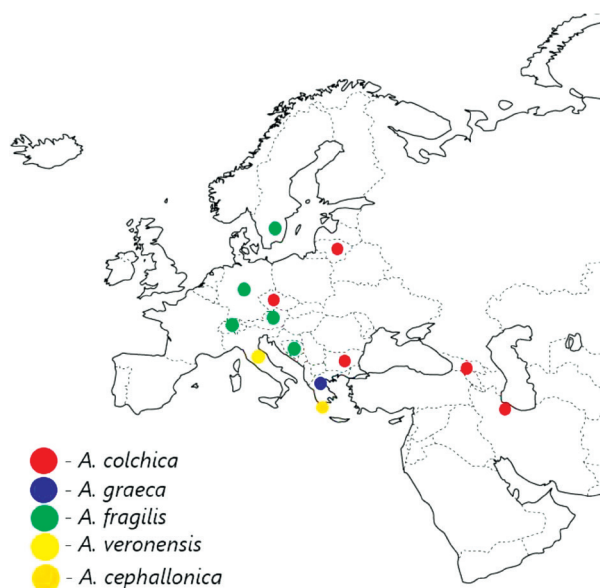


Рис. 2. Карта мест регистрации использованных для сравнительного анализа депонированных в NCBI нуклеотидных последовательностей *COI* мтДНК веретениц

Fig. 2. Registration maps of spindle moths used for a comparative analysis of the locations of the NCBI deposited nucleotide sequences of *COI* mtDNA

Германия; MW478002 – Швейцария; МК294755 – Босния и Герцеговина; КJ128664 – Швеция), 6 – *A. colchica* (OP493520 – Чехия; KX236330, OP493521 – Литва; OP493529 – Грузия; OP493522 – Иран; OP493523 – Болгария), 2 – *A. cephalonica* (KU052866, OP493528 – Пелопоннесский полуостров, Греция), 2 – *A. graeca* (KX236331, OP493517 – Греция), 2 – *A. veronensis* (KX236332, OP493530 – Италия) (рис. 2).

Байесовское филогенетическое дерево генетических различий построено при помощи программы MrBayes v3.2.7 [19] с использованием рассчитанной в программе MEGA X двухпараметрической модели Кимуры с учетом инвариантных сайтов. В качестве сторонних групп выбраны нуклеотидные последовательности участка *COI* прыткой ящерицы *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758), размещенные в NCBI под кодами доступа MN993138, KP697866. Полученное дерево визуализировали с помощью FigTree v1.4.4 [20]. Для группировки образцов по гаплотипической принадлежности использовали программное онлайн-обеспечение FaBox 1.61 [21]. Показатели попарных и средних генетических дистанций между гаплотипами как внутри одного вида, так и между разными видами веретениц рассчитывали в MEGA X, применяя *neighbor-joining tree bootstrap* метод при 1 000 псевдорепликаций по двухпараметрической модели Кимуры с учетом замен по типу транзиций и трансверсий.

Параметры генетического разнообразия (число полиморфных сайтов, количество мутаций, среднее число нуклеотидных различий, число гаплотипов, гаплотипическое разнообразие, нуклеотидное разнообразие, а также попарные и средние генетические дистанции ( $D_{xy}$ )) рассчитывали в программе DnaSP 6.12.01 [22].

**Результаты и их обсуждение.** Всего проанализировано 19 нуклеотидных последовательностей мтДНК белорусских веретениц длиной 392 п. н., представляющих фрагмент гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*) с 5421-го по 5812-й сайт. Консервативность исследованного участка составила 99,7 %. При помощи программы BLAST (URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, по состоянию на 15.05.24) установлено статистически значимое соответствие в диапазоне 96,17–100,00 % полученных сиквенсов с аналогичными последовательностями вида *Anguis colchica*, имеющимися в базе Genbank, что подтверждает ошибочность определения белорусских веретениц как вида *A. fragilis* в прошлом.

и HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA-3') [17]. Для визуализации результатов ПЦР применяли метод электрофореза в 1,4%-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия, используя горизонтальную камеру Biorad MiniGel. Секвенирование полученных ампликонов осуществляли на генетическом анализаторе ABI313 в Институте биоорганической химии НАН Беларуси.

Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей по алгоритму ClustalW осуществляли в MEGA X [18], степень их подобия с расположенными в международной базе GenBank устанавливали при помощи программы BLAST. Для сравнения нуклеотидных последовательностей участка *COI* мтДНК представителей данного рода из различных регионов использованы также 19 образцов от всех известных видов безногих ящериц, обитающих на территории Западной Палеарктики. Образцы были взяты из базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI: 7 нуклеотидных последовательностей *A. fragilis* (MN993078, MN993085 – Австрия; KP697879, KP697909 –



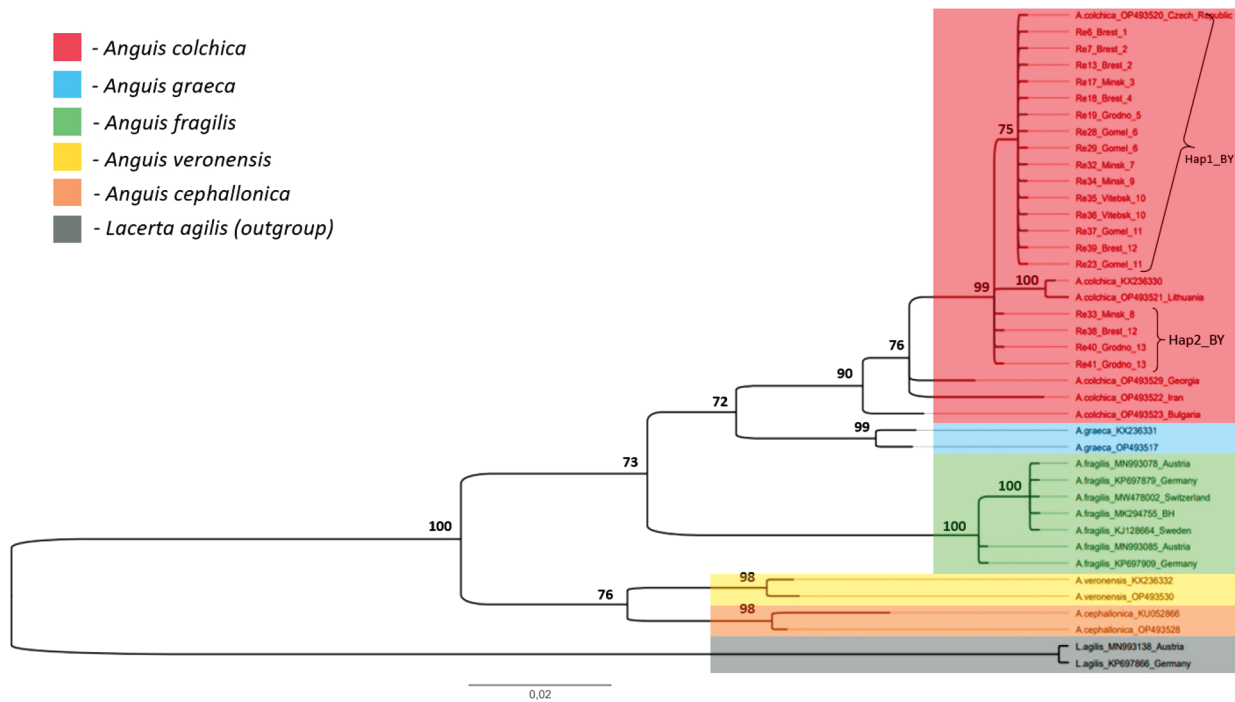


Рис. 3. Байесовское филогенетическое дерево различий между исследуемыми последовательностями *COI* мтДНК *A. colchica* из Беларуси и другими видами *Anguis*

Fig. 3. Bayesian phylogenetic tree of differences between the studied mtDNA *COI* sequences of *A. colchica* from Belarus and other *Anguis* species

На основе построенного байесовского филогенетического дерева можно выделить две основные клады (рис. 3). В первую кладу вошли все 19 образцов из Беларуси и 6 образцов *Anguis colchica* из GenBank (OP493520, KX236330, OP493521, OP493529, OP493522, OP493523), а также 2 образца *Anguis graeca* (GenBank: OP493517, KX236331) и 7 образцов *Anguis fragilis* (GenBank: MN993085, MN993078, KP697909, KP697879, MW478002, MK294755, KJ128664). Вторая клада сформирована образцами *Anguis veronensis* (KX236332, OP493530) и *Anguis cephalonica* (KU052866, OP493528) из GenBank. Все образцы кластеризовались в соответствии с видовой принадлежностью. Образцы из Беларуси сформировали общую группу с другими образцами *Anguis colchica*. Различия между видовыми кластерами характеризовались достоверными индексами псевдореplikаций (>90).

В проанализированных 19 нуклеотидных последовательностях белорусской популяции веретениц обнаружен 1 переменный сайт в 480-й позиции от начала гена. Таким образом, всего для образцов веретениц из Беларуси обнаружено два гаплотипа. Наиболее распространенным оказался гаплотип 1 (Hap1\_BY), к которому относилось 15 образцов из Беларуси и 1 образец колхидской веретеницы из Чехии (OP493520). Другие 4 образца (Re33, Re38, Re40, Re41) относились к гаплотипу 2 (Hap2\_BY). Сравнительный анализ полученных нами и депонированных в базе NCBI нуклеотидных последовательностей гена *COI* мтДНК разных видов веретениц показал высокий уровень внутривидовой дифференциации гаплотипов. Следует подчеркнуть, что выявленные на территории Беларуси гаплотипы колхидской веретеницы ранее не были известны. Соотнесение выделенных гаплотипов с использованными в работе образцами веретениц представлено в табл. 1.

При анализе различий нуклеотидного состава между исследованными гаплотипами колхидских и ломких веретениц выделено 54 переменных (V) и 40 парсимониально информативных (Pi) сайтов при длине анализируемого участка гена *COI* мтДНК в 392 нуклеотида. Данные по нуклеотидному составу и различиям проанализированных гаплотипов двух видов веретениц (*A. colchica* и *A. fragilis*) приведены в табл. 2.

Анализ показателей генетических дистанций ( $D_{xy}$ ) внутри вида *Anguis colchica* продемонстрировал, что наименьшие значения были между обоими гаплотипами веретениц из Беларуси

Т а б л и ц а 1. Соотнесение выделенных гаплотипов с использованными в работе образцами веретениц

Table 1. Correlation of the isolated haplotypes with the samples of spindle moths used in the work

Гаплотип	Число сиквенсов	Сиквенсы, относящиеся к гаплотипу
Col1	1	<i>A. colchica</i> KX236330
Col2	1	<i>A. colchica</i> OP493529, Georgia
Col3	1	<i>A. colchica</i> OP493523, Bulgaria
Col4	1	<i>A. colchica</i> OP493522, Iran
Col5	1	<i>A. colchica</i> OP493521, Lithuania
Нap1_BY	16	<i>A. colchica</i> OP493520, Czech Republic; Re6, Re7, Re13, Re17, Re18, Re19, Re28, Re29, Re32, Re34, Re35, Re36, Re37, Re39, Re23
Нap2_BY	4	Re33, Re38, Re40, Re41
Fra6	2	<i>A. fragilis</i> MN993085, Austria; <i>A. fragilis</i> KP697909, Germany
Fra7	5	<i>A. fragilis</i> MN993078, Austria; <i>A. fragilis</i> KP697879, Germany; <i>A. fragilis</i> MW478002, Switzerland; <i>A. fragilis</i> MK294755 BH; <i>A. fragilis</i> KJ128664, Sweden
Ver8	1	<i>A. veronensis</i> KX236332
Ver9	1	<i>A. veronensis</i> OP493530
Сep10	1	<i>A. cephalonica</i> KU052866
Сep11	1	<i>A. cephalonica</i> OP493528
Gra12	1	<i>A. graeca</i> KX236331
Gra13	1	<i>A. graeca</i> OP493517

Т а б л и ц а 2. Сведения о нуклеотидном составе проанализированных гаплотипов участка гена *COI* мтДНК *A. colchica* и *A. fragilis* и различиях между нимиTable 2. Information on the nucleotide composition of the analyzed haplotypes of the *COI* gene region of mtDNA of *A. colchica* and *A. fragilis* and their differences

Haplotype	Сегрегирующий сайт*																										
	120	121	123	135	138	147	150	177	186	189	192	204	207	210	213	216	223	261	270	282	288	294	312	324	337	366	375
Col1	G	C	A	A	C	C	T	C	T	C	T	C	G	T	A	C	G	C	T	T	G	T	C	C	T	G	G
Col2	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	C	.	A	.	.	.	.	A	A	
Col3	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	G	.	A	T	C	.	A	.	.	.	.	.	A	
Col4	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	A	T	.	.	A	.	.	T	.	.	A	
Col5	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Нap1_BY	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	
Нap2_BY	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	
Fra6	.	T	.	.	.	A	C	T	.	T	.	T	.	A	.	T	A	T	C	C	A	C	T	.	C	.	A
Fra7	.	T	.	.	.	A	C	T	.	T	C	T	.	A	.	T	A	T	C	C	A	C	T	.	C	.	A
Haplotype	Сегрегирующий сайт*																										
	378	384	390	399	402	405	408	414	417	420	429	432	438	441	444	450	454	456	459	462	465	471	477	480	489	489	501
Col1	A	T	T	C	T	T	G	C	T	G	T	T	C	C	C	C	G	T	A	C	A	A	G	T	C	T	
Col2	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Col3	G	.	C	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Col4	.	C	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	
Col5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Нap1_BY	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	
Нap2_BY	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Fra6	G	C	C	T	C	C	A	.	C	A	.	C	T	T	T	T	.	A	C	G	.	T	G	.	C	T	C
Fra7	G	C	C	T	C	C	A	.	C	A	C	C	T	T	T	T	.	C	C	G	.	T	G	.	C	T	C

П р и м е ч а н и е. \* – от начала гена *COI*; полужирным выделены парсимониально информативные сайты (Pi); гаплотипы, относящиеся к виду *A. colchica*, – Col1, Col2, Col3, Col4, Col5, Нap1\_BY, Нap2\_BY; гаплотипы, относящиеся к виду *A. fragilis*, – Fra8, Fra9.

и гаплотипом Col5, к которому относился образец из Литвы, и Col1 (образец неизвестного происхождения). Наибольшие же значения по данному показателю установлены для гаплотипа Col4 из Ирана и Col3 из Болгарии (табл. 3).

Анализ Dxy между использованными в работе и сгруппированными по видовой принадлежности образцами видов рода *Anguis* показал, что наименьшие значения были между двумя гаплотипами *A. colchica* из Беларуси и видом *A. graeca*, обитающим на территории Балканского полуострова Греции (табл. 4). В целом же генетическая дистанция по маркеру *COI* между *A. colchica* и другими видами веретениц находилась на уровне 0,09439–0,09694.

Таблица 4. Показатели генетических дистанций между использованными в работе образцами видов рода *Anguis* и образцами из Беларуси

Table 4. Genetic distance indicators between the samples of species of the genus *Anguis* used in the work with samples from Belarus

Гаплотип	<i>A. fragilis</i>	<i>A. veronensis</i>	<i>A. graeca</i>	<i>A. cephalonica</i>
Нар1_BY	0,09694	0,09694	0,05995	0,09694
Нар2_BY	0,09439	0,09439	0,05740	0,09439

Рассчитанные показатели генетического полиморфизма для 19 образцов колхидской веретеницы из Беларуси характеризовались низкими значениями нуклеотидного и гаплотипического разнообразия (табл. 5).

**Заключение.** С использованием молекулярно-генетических методов установлена принадлежность 19 экземпляров веретеницы из 13 административных районов Беларуси к виду колхидская веретеница (*Anguis colchica*, Anguinae) и определены характеристики генетического разнообразия популяции по фрагменту *COI* митохондриальной ДНК. Сопоставление данных литературы и результатов собственных исследований позволило установить, что на территории Беларуси обитает только один вид безногих ящериц – колхидская веретеница. Образцов ДНК ломкой веретеницы (*Anguis fragilis*) на исследованной территории пяти областей Беларуси не обнаружено. Установлено, что белорусская популяция колхидской веретеницы характеризуется низкими значениями нуклеотидного ( $\pi = 0,00090$ ) и гаплотипического ( $Hd (\pm SD) = 0,351 \pm 0,111$ ) разнообразия и представлена двумя ранее не известными гаплотипами, отстоящими от гаплотипов других видов на генетическую дистанцию от 0,05740–0,05995 (*A. graeca*) до 0,09439–0,09694 (другие виды рода *Anguis*).

Таблица 3. Показатели генетических дистанций между использованными в работе образцами *Anguis colchica*, сгруппированными по гаплотипам

Table 3. Genetic distances between the *Anguis colchica* samples used in the work grouped by haplotypes

Гаплотип	Нар1_BY	Нар2_BY
Col1	0,01020	0,00765
Col2	0,02551	0,02296
Col3	0,03061	0,02806
Col4	0,03827	0,03571
Col5	0,01276	0,01020

Таблица 5. Показатели генетического разнообразия по митохондриальному гену *COI* для белорусской популяции колхидской веретеницы

Table 5. Genetic diversity indices for the mitochondrial gene *COI* for the Belarusian population of the Colchic slow worm

Показатель	Значение
N	19
H	2
V	1
Eta	1
Hd ( $\pm SD$ )	0,351 $\pm$ 0,111
$\pi$	0,00090
k	0,351

Примечание. N – количество образцов, H – число гаплотипов; V – число переменных сайтов; Eta – количество мутаций; Hd – гаплотипическое разнообразие с учетом стандартного отклонения (SD);  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие; k – среднее число нуклеотидных различий.

### Список использованных источников

1. Пикулик, М. М. Пресмыкающиеся Белоруссии / М. М. Пикулик, В. А. Бахарев, С. В. Косов. – Минск: Наука и техника, 1988. – 166 с.
2. Дробенков, С. М. Современное состояние и возможности практического использования биологических ресурсов герпетофауны Беларуси / С. М. Дробенков // Природ. ресурсы. – 2018. – № 2. – С. 44–53.
3. Species diversity and ecology of amphibians and reptiles in urbanized landscapes of the city of Minsk / S. M. Drobekov [et al.] // Acta Biol. Univ. Daugavp. – 2021. – Vol. 21, N 2. – P. 89–100.

4. Лукашевич, В. Н. Обзор состояния видов класса Пресмыкающиеся (Reptilia) / В. Н. Лукашевич // Биологическое разнообразие животного мира Полесского государственного радиационно-экологического заповедника / под ред. акад. М. Е. Никифорова. – Минск, 2022. – С. 72–80.
5. Гричик, В. В. Животный мир Беларуси. Позвоночные: учеб. пособие / В. В. Гричик, Л. Д. Бурко. – Минск: Изд. центр БГУ, 2013. – 399 с.
6. Щербак, Н. Н. Земноводные и пресмыкающиеся Украинских Карпат / Н. Н. Щербак, М. И. Щербень. – Киев: Наук. думка, 1980. – 266 с.
7. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР / А. Г. Банников [и др.]. – М.: Просвещение, 1977. – 414 с.
8. Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica / J. Speybroeck [et al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2020. – Vol. 41, N 2. – P. 139–189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>
9. The distribution and biogeography of slow worms (*Anguis*, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones / D. Jablonski [et. al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2021. – Vol. 42, N 4. – P. 519–530. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10069>
10. Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguinae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences / V. Gvoždík [et al.] // *Mol. Phylog. Evol.* – 2010. – Vol. 55, N 2. – P. 460–472. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.007>
11. An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguinae), survived in the Italian Peninsula / V. Gvoždík [et al.] // *Mol. Phylog. Evol.* – 2013. – Vol. 69, N 3. – P. 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.004>
12. Phenotypic differentiation of the slow worm lizards (Squamata: *Anguis*) across their contact zone in Central Europe / N. Benkovský [et al.] // *PeerJ*. – 2021. – Vol. 9. – P. 1–37. <https://doi.org/10.7717/peerj.12482>
13. Two species of slow worm (*Anguis fragilis*, *A. colchica*) present in the Baltic region / V. Gvoždík [et al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2021. – Vol. 42, N 3. – P. 383–389. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10055>
14. Phylogeography and postglacial colonization of Central Europe by *Anguis fragilis* and *Anguis colchica* / D. Jablonski [et al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2017. – Vol. 38, N 4. – P. 562–569. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003133>
15. Skórczewski, G. Remarks on the studies and occurrence of the eastern slow worm *Anguis colchica* incerta in Poland / G. Skórczewski // *Chrońmy Przyrodę Ojczyzn*. – 2017. – N 73. – P. 57–63.
16. Skórczewski, G. Morphological differentiation of Anguinae Gray, 1825 in Poland: one or two species? / G. Skórczewski, B. Boreczyk, B. Najbar // *Biologia płazów i gadów – ochrona herpetofauny*. – 2012. – P. 117–120.
17. DNA barcoding amphibians and reptiles / M. Vences [et al.] // *DNA Barcodes: Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup> / ed.: W. J. Kress, D. L. Erickson. – Totowa, NJ, 2012. – Vol. 858. – P. 79–107. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_5)
18. 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>
19. Huelsenbeck, J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J. P. Huelsenbeck, F. Ronquist // *Bioinformatics*. – 2001. – Vol. 17, N 8. – P. 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
20. Rambaut, A. Figtree ver 1.4.4 [Electronic resource] / A. Rambaut. – Edinburgh, 2018. – Mode of access: <https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@FigTree@1.4.4>. – Date of access: 09.09.2024.
21. Villesen, P. FaBox: an online fasta sequence toolbox / P. Villesen // *Mol. Ecol. Notes*. – 2007. – Vol. 7, N 6. – P. 965–968. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x>
22. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets / J. Rozas [et. al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2017. – Vol. 34, N 12. – P. 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

## References

1. Pikulik M. M., Bakharev V. A., Kosov S. V. *Reptiles of Belarus*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1988. 166 p. (in Russian).
2. Drobenkov S. M. Present state and possible use of biological resources of the herpetofauna of Belarus. *Prirodnye resursy* [Natural resources], 2018, no. 2, pp. 44–53 (in Russian).
3. Drobenkov S. M., Korzun E. V., Kulikova A. A., Rizevich K. K. Species diversity and ecology of amphibians and reptiles in urbanized landscapes of the city of Minsk. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, 2021, vol. 21, no. 2, pp. 89–100.
4. Lukashевич V. N. Review of the status of species of the class Reptiles (Reptilia). *Biologicheskoe raznoobrazie zhivotnogo mira Poleskogo gosudarstvennogo radiatsionno-ekologicheskogo zapovednika* [Biological diversity of the fauna of the Polesie State Radiation and Ecological Reserve]. Minsk, 2022, pp. 72–80 (in Russian).
5. Gričik V. V., Burko L. D. *Fauna of Belarus. Vertebrates: tutorial*. Minsk, Publishing center of BSU, 2013. 399 p. (in Russian).
6. Shcherbak N. N., Shcherban M. I. *Amphibians and reptiles of the Ukrainian Carpathians*. Kyiv, Naukova dumka Publ., 1980. 266 p. (in Russian).
7. Bannikov A. G., Darevskii I. S., Ishchenko V. G., Rustamov A. K., Shcherbak N. N. *Key to amphibians and reptiles of the fauna of the USSR*. Moscow, Prosveshchenie Publ., 1977. 414 p. (in Russian).
8. Speybroeck J., Beukema W., Dufresnes C., Fritz U., Jablonski D., Lymberakis P. Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica. *Amphibia-Reptilia*, 2020, vol. 41, no. 2, pp. 139–189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>
9. Jablonski D., Sillero N., Oskyrko O., Bellati A., Čeirāns A., Cheylan M. [et al.]. The distribution and biogeography of slow worms (*Anguis*, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones. *Amphibia-Reptilia*, 2021, vol. 42, no. 4, pp. 519–530. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10069>



10. Gvoždík V., Jandzik D., Lymberakis P., Jablonski D., Moravec J. Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, vol. 55, no. 2, pp. 460–472. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.007>
11. Gvoždík V., Benkovský N., Crottini A., Bellati A., Moravec J., Romano A. An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguidae), survived in the Italian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, vol. 69, no. 3, pp. 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.004>
12. Benkovský N., Moravec J., Gvoždíková Javůrková V., Šifrová H., Gvoždík V., Jandzik D. Phenotypic differentiation of the slow worm lizards (*Squamata: Anguis*) across their contact zone in Central Europe. *PeerJ*, 2021, vol. 9, pp. 1–37. <https://doi.org/10.7717/peerj.12482>
13. Gvoždík V., Harca Z., Hánová A., Jablonski D., Pupins M., Čeirāns A., Paasikunnas T. Two species of slow worm (*Anguis fragilis*, *A. colchica*) present in the Baltic region. *Amphibia-Reptilia*, 2021, vol. 42, no. 3, pp. 383–389. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10055>
14. Jablonski D., Najbar B., Grochowalska R., Gvoždík V., Strzała T. Phylogeography and postglacial colonization of Central Europe by *Anguis fragilis* and *Anguis colchica*. *Amphibia-Reptilia*, 2017, vol. 38, no. 4, pp. 562–569. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003133>
15. Skórzewski G. Remarks on the studies and occurrence of the eastern slow worm *Anguis colchica* incerta in Poland. *Chrońmy Przyrodę Ojczyznę*, 2017, no. 73, pp. 57–63.
16. Skórzewski G., Borczyk B., Najbar B. Morphological differentiation of Anguidae Gray, 1825 in Poland: one or two species? *Biologia Plazów I Gadów – Ochrona Herpetofauny*, 2012, pp. 117–120.
17. Vences M., Nagy Z. T., Sonet G., Verheyen E. DNA barcoding amphibians and reptiles. *DNA Barcodes: Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>. Totowa, NJ, 2012, vol. 858, pp. 79–107. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_5)
18. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz 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>
19. Huelsenbeck J. P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 2001, vol. 17, no. 8, pp. 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
20. Rambaut A. *Figtree ver 1.4.4. Edinburgh, 2018*. Available at: <https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@FigTree@1.4.4> (accessed 09.09.2024).
21. Villesen P. FaBox: an online fasta sequence toolbox. *Molecular Ecology Notes*, 2007, vol. 7, no. 6, pp. 965–968. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x>
22. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E., Sánchez-García A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, vol. 34, no. 12, pp. 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

### Інфармацыя аб аўтарах

*Молчан Владислав Олегович* – м.л. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-1070-1938>. E-mail: [molchan\\_vladislav@mail.ru](mailto:molchan_vladislav@mail.ru)

*Куликова Елена Александровна* – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-0798-9723>. E-mail: [elen.kulikova@gmail.com](mailto:elen.kulikova@gmail.com)

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

*Демянчик Виктор Викторович* – науч. сотрудник. Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси (ул. Советских Пограничников, 41, 220030, г. Брест, Республика Беларусь). E-mail: [koktebel.by@mail.ru](mailto:koktebel.by@mail.ru)

*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](mailto:natrix109@gmail.com)

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

### Information about the authors

*Vladislav O. Molchan* – Junior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-1070-1938>. E-mail: [molchan\\_vladislav@mail.ru](mailto:molchan_vladislav@mail.ru)

*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). <https://orcid.org/0000-0003-0798-9723>. E-mail: [elen.kulikova@gmail.com](mailto:elen.kulikova@gmail.com)

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

*Victor V. Demianchik* – Researcher. Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (41, Sovetskih Pogranichnikov Str., 220030, Brest, Republic of Belarus). E-mail: [koktebel.by@mail.ru](mailto:koktebel.by@mail.ru)

*Yahor 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: [natrix109@gmail.com](mailto:natrix109@gmail.com)

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

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 579.62  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-280-288>

Поступила в редакцию 29.07.2024  
Received 29.07.2024

**Н. В. Сверчкова<sup>1</sup>, И. А. Прокурнина<sup>1</sup>, В. С. Литвинова<sup>2</sup>, Н. Е. Рябая<sup>3</sup>,  
А. И. Саханчук<sup>4</sup>, Э. И. Коломиец<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии»,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>4</sup>Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству, Жодино, Республика Беларусь

## ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА МИКРОБИОМ РУБЦА ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

**Аннотация.** Подобраны методы выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров, позволяющие получить препараты нуклеиновых кислот высокой чистоты без ингибиторов ПЦР. Определены доминирующие таксоны микробиома рубца молочных коров, подобраны праймеры и температурно-временные параметры для их выявления методом ПЦР. Показана целесообразность использования кормовых добавок «Споробакт-К» на основе бактерий рода *Bacillus* и «Румибакт» на основе пропионовокислых бактерий для контроля условно-патогенной микрофлоры, улучшения рубцового пищеварения и снижения риска развития ацидоза у лактирующих коров.

**Ключевые слова:** микробиом рубца, ацидоз, пропионовокислые бактерии, спорообразующие бактерии, пробиотическая кормовая добавка, антагонистическая активность, ферментативная активность

**Для цитирования:** Влияние пробиотиков на микробиом рубца лактирующих коров / Н. В. Сверчкова [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 280–288. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-280-288>

**Natalia V. Sverchkova<sup>1</sup>, Irina A. Proskurnina<sup>1</sup>, Veronika S. Litvinova<sup>2</sup>, Natalia E. Ryabaya<sup>3</sup>,  
Anna I. Sachanchuk<sup>4</sup>, Emiliya I. Kolomiets<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology”, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>N. I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>4</sup>Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Livestock, Zhodino, Republic of Belarus

## EFFECT OF PROBIOTICS ON THE RUMEN MICROBIOME OF LACTATING COWS

**Abstract.** Methods for isolating metagenomic DNA from the rumen fluid of dairy cows have been selected and have made it possible to obtain high-purity nucleic acid preparations without PCR inhibitors. The probiotic potential of feed additives “Sporobact-K” and “Rumibact” based on spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* and the propionic acid bacteria of the genus *Propionibacterium* were assessed. The feasibility of their use to increase resistance to opportunistic microbiota, improve ruminal digestion and control acidosis in cows was shown. The dominant taxa of the rumen microbiome of dairy cows were determined, and the primers and temperature-time parameters were selected for their detection by PCR. The feasibility of using feed additives “Sporobact-K”, based on bacteria of the genus *Bacillus* and “Rumibact”, based on propionic acid bacteria to control opportunistic microbiota, improve scar digestion and reduce the risk of acidosis in lactating cows is shown.

**Keywords:** rumen microbiome, acidosis, propionic acid bacteria, spore-forming bacteria, probiotic feed additive, antagonistic activity, enzymatic activity

**For citation:** Sverchkova N. V., Proskurnina I. A., Litvinova V. S., Ryabaya N. E., Sachanchuk A. I., Kolomiets E. I. Effect of probiotics on the rumen microbiome of lactating cows. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 280–288 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-280-288>

**Введение.** Микроорганизмы рубца определяют состояние здоровья и молочную продуктивность животных, поскольку являются источником ферментов, необходимых для расщепления растительных кормов, синтезируют антимикробные соединения, летучие жирные кислоты и витамины, поддерживают иммунитет, нейтрализуют токсины. В норме микробные популяции рубца действуют слаженно, их соотношение оптимально. При снижении резистентности организма размножение патогенной микрофлоры в рубце становится причиной развития заболева-



ний крупного рогатого скота, снижения его продуктивности, сокращения срока хозяйственного использования, а также ухудшения качества молока.

Эффективным экологически безопасным решением указанных проблем является введение в рацион животных пробиотических кормовых добавок, обеспечивающих восстановление нормобиоты ЖКТ, улучшение ферментной и иммунной систем животных. В отличие от антибиотиков, механизм действия пробиотиков направлен не на уничтожение патогенных микроорганизмов, а на заселение кишечника конкурентоспособными штаммами бактерий, способными осуществлять контроль содержания условно-патогенной микробиоты и сдерживать проявление факторов патогенности у ее представителей [1–4].

В силу того, что значительная часть микроорганизмов рубца представлена видами, нежизнеспособными при культивировании на искусственных питательных средах, однако активными в процессах рубцовой ферментации, для их выявления следует применять методы молекулярно-генетической идентификации. Так, использование ПЦР в реальном времени расширяет возможности изучения микробиоты рубца лактирующих коров и позволяет оценить влияние на ее состав пробиотических кормовых добавок с различным механизмом действия. Это обуславливает ключевую роль указанных молекулярно-генетических методов исследования при разработке стратегий коррекции дисфункций рубца коров.

Цель работы – исследование состава микробиома рубца лактирующих коров до и после применения пробиотических кормовых добавок.

**Объекты и методы исследования.** Для выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров, предоставленных РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству», использовали оптимизированную методику, которая позволяет получать образцы с оптимальной чистотой и концентрацией ДНК [5].

Концентрацию ДНК в выделенных образцах определяли с помощью флуориметра Quantus (Promega, США) и наноспектрофотометра NanoDrop P330 (Implen, Германия). Чистоту выделенной ДНК оценивали по показателям A260/280 и A260/230. Проверку пригодности выделенных образцов ДНК для молекулярно-генетических исследований выполняли с помощью ПЦР с универсальными эубактериальными праймерами 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttacctgttacgactt-3'). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 2× ПЦР Master Mix («Артбиотех», РБ) – 10 мкл, праймер 8f – 1 мкл (4 мМ), праймер 1492r – 1 мкл (4 мМ), ДНК-матрицу – 2 мкл, H<sub>2</sub>O – до 20 мкл. Программа амплификации: 95 °С – 3 мин (1 цикл); 95 °С – 20 с, 55 °С – 20 с, 72 °С – 1 мин 30 с (34 цикла); 72 °С – 5 мин (1 цикл); охлаждение до +4 °С. В качестве положительных контролей использовали ДНК грамположительных (*Clavibacter michiganensis* БИМ В-1593) и грамотрицательных (*Pectobacterium carotovorum* БИМ В-88) бактерий. Отрицательным контролем служил образец, не содержащий ДНК.

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с использованием 1×трис-ацетатного буфера при напряженности электрического поля 5 В/см. Для визуализации ДНК окрашивали раствором бромистого этидия (0,05 мкг/мл). В качестве стандарта для определения размера продуктов ПЦР использовали маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder 1 Kb Plus (Thermo Scientific, США). Анализ продуктов ПЦР и расчет длин фрагментов ДНК осуществляли с помощью системы документирования гелей и программного обеспечения Bio-Rad ChemiDoc MP (США).

Подбор праймеров для идентификации и количественного определения основных групп микроорганизмов – представителей симбиотической микробиоты рубца жвачных животных – осуществляли на основании данных научной литературы [6–10]. Для проверки специфичности праймеров, их модификации (в случае необходимости), расчета температуры отжига использовали онлайн-ресурсы Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), Primer3 (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

ПЦР-РВ проводили с помощью амплификатора CFX96 Touch (BioRad, США), используя подобранные для каждой пары праймеров температурно-временные параметры. Реакционная смесь содержала 2× ПЦР Master Mix («Артбиотех», РБ), прямой и обратный праймеры (по 4 мМ каждого),

флуоресцентный краситель ZubrGreen («Праймтех», РБ), ДНК-матрицу, деионизированную воду. В качестве отрицательного контроля при проведении ПЦР использовали образец, не содержащий ДНК.

Для контроля ацидозов коров использовали кормовые добавки «Споробакт-К», с. п. на основе спорообразующих бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-497 и *Bacillus velezensis* БИМ В-713, а также «Румибакт», с. п. на основе пропионовых кислотных бактерий *Propionibacterium shermanii* AR16 и *Propionibacterium shermanii* R15.

В качестве тест-объектов для изучения антагонистической активности исследуемых культур использовали штаммы условно-патогенных бактерий *Escherichia coli* 39A, *E. coli* К3, *Staphylococcus aureus* 107B, *Proteus vulgaris* из коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

Антагонистическую активность спорообразующих бактерий определяли методом лунок по диаметру зон задержки и/или отсутствия роста тест-культур патогенов [11].

Определение активности эндо-1,4-β-глюкоканазы (целлюлазы) проводили спектрофотометрически с использованием хромогенного субстрата Azo-СМ-Cellulose согласно протоколу к набору реагентов Megazyme (Ирландия). Единицы активности рассчитывали по формуле

$$A = (412,5B - 6,0) \cdot 6,6/1\ 000,$$

где  $A$  – активность, ед. акт/мл (микромоль глюкозидных связей субстрата, гидролизуемых за 1 мин, в расчете на 1 мл жидкого препарата);  $B$  – оптическая плотность при 590 нм.

Определение активности эндо-1,4-β-ксилазы проводили спектрофотометрически с использованием хромогенного субстрата 4-О-Метил-D-глюкоуроно-D-ксилана, согласно методике Sigma-Aldrich (Германия). Единицы активности рассчитывали по приведенной выше формуле.

Уровень α-амилазы определяли спектрофотометрически с использованием хромогенного субстрата Red-Starch согласно методике, предложенной Megazyme (Ирландия). Единицы активности рассчитывали по формуле

$$A = (203B + 5) \cdot 2/1\ 000,$$

где  $A$  – активность, ед. акт/мл (микромоль гликозидных связей субстрата, гидролизуемых за 1 мин, в расчете на 1 мл жидкого препарата);  $B$  – оптическая плотность при 510 нм.

Активность ферментов α-галактозидазы, β-галактозидазы и β-глюкозидазы оценивали колориметрически по количеству освобожденного о-нитрофенола из о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида, 4-нитрофенил-α-D-галактопиранозида и 2-нитрофенил-β-D-глюкопиранозида. Единицы активности ферментов рассчитывали по следующей формуле:

$$A = 1\ 000OD/VT,$$

где  $OD$  – измеренные значения оптической плотности для реакционной смеси (при 420 нм для β-галактозидазы и 405 нм для α-галактозидазы и β-глюкозидазы);  $T$  – время реакции, мин;  $V$  – объем пробы культуры, взятой для определения, мл.

Для выделения целевых групп бактерий из рубца асептически отбирали 1,0 мл рубцовой жидкости, делали ряд 10-кратных разведений в физиологическом растворе (0,8 % NaCl), по 100 мкл из  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  разведения высевали на питательные среды для культивирования факультативно и облигатно анаэробных бактерий: тиогликолевую среду (Condalab, Испания), колумбийский агар (Condalab, Испания), среду для выделения бактерий рода *Clostridium* (Condalab, Испания). Посевы инкубировали при 37 °С в течение 48–72 ч. После этого отбирали морфологически отличающиеся колонии и пересевали их до получения монокультур.

**Результаты и их обсуждение.** Одним из важнейших этапов исследования структуры микробиома рубца является выделение метагеномной ДНК. Варьируя параметры экстракции нуклеиновых кислот, можно получить различные результаты, работая даже с одним образцом биоматериала. Это связано с различной эффективностью лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также с присутствием в рубцовой жидкости большого количества ингибиторов ферментативных реакций. В связи с изложенным выше проводилась оптимизация

метода выделения ДНК из рубцовой жидкости для последующего определения состава микробиома рубца методом ПЦР в реальном времени. Оптимизацию метода выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров проводили путем сравнительного анализа пяти протоколов, различающихся стадией разрушения бактериальных клеток (использование стеклянных шариков, детергентов) и подходом к выделению ДНК (методы ЦТАБ/ДСН, модифицированный фено-хлороформный метод, коммерческий набор «Нуклеосорб С»).

Установлено, что максимальная концентрация ДНК детектировалась в образцах, выделенных с помощью методики [5], предусматривающей предварительное осаждение бактериальных клеток из рубцовой жидкости центрифугированием, их разрушение с помощью стерильных стеклянных шариков и последующую экстракцию ДНК фенол-хлороформным методом. Применение этой же методики позволило получить «чистые» препараты ДНК по показателям соотношений 260/280 и 260/230 нм, что в совокупности определило ее выбор для дальнейших исследований.

На основании литературных данных [6–10, 12–15] определены таксоны микроорганизмов, доминирующие в рубце лактирующих коров – бактерии отделов *Bacteroidota* (син. *Bacteroidetes*), *Bacillota* (*Firmicutes*), *Pseudomonadota* (классы *Betaproteobacteria* и *Gamma**proteobacteria*), *Spirochaetota* (*Spirochaetes*), *Actinomycetota* (*Actinobacteria*), *Fusobacteriota* (*Fusobacteria*), *Verrucomicrobiota* (*Verrucomicrobia*), а также археи отдела *Methanobacteriota* (*Euryarchaeota*). Проведен подбор праймеров (табл. 1) к основным таксонам рубца жвачных животных, осуществлена проверка их специфичности с помощью тестирования *in silico*, а также определены температурно-временные параметры ПЦР в режиме реального времени для анализа доминирующей микробиоты рубца коров.

Т а б л и ц а 1. Перечень праймеров для выявления и количественного анализа основных таксонов микроорганизмов в рубце лактирующих коров

Table 1. List of primers for identification and quantitative analysis of the main taxa of microorganisms in the rumen of lactating cows

Целевой таксон	Генетический locus	Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Источник
Отдел <i>Bacteroidota</i> ( <i>Bacteroidetes</i> )	16S pPHK	Bac960F	gtttaattcgatgatacgcgag	Yang с соавт., 2015
		Bac1100R	ftaagccgacacctcacgg	
Отдел <i>Bacillota</i> ( <i>Firmicutes</i> )	16S pPHK	928F-Firm	tgaactcaaaaggaattgacg	Bacchetti De Gregoris с соавт., 2011
		1040Firm-r	accatgcaccacctgtc	
Отдел <i>Pseudomonadota</i> (Beta- и Gamma- <i>Proteobacteria</i> )	23S pPHK	PhylProt-F	gtataatgggtcagcgac	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylProt-R	cagcattcgcacttctga	
	16S pPHK	Beta979F	aacgcgaaaaaccttacctacc	Yang с соавт., 2015
		Beta1130R	fgcccttcgtagcaactagtg	
Отдел <i>Spirochaetota</i> ( <i>Spirochaetes</i> )	16S pPHK	PhylSpir-F	gtcttaagcatgcaagtc	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylSpir-R	fgctgctcccgtaggag	
Отдел <i>Actinomycetota</i> ( <i>Actinobacteria</i> )	16S pPHK	ACT235f	cgcgccctatcagctgttg	Stach с соавт., 2003
		ACT878r	ccgtactccccaggcgggg	
Отдел <i>Fusobacteriota</i> ( <i>Fusobacteria</i> )	16S pPHK	PhylFus-F	gatccagcaattctgtgtgc	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylFus-R	cgaattcacctctacactgt	
Отдел <i>Verrucomicrobiota</i> ( <i>Verrucomicrobia</i> )	16S pPHK	PhylVer-F	gaattctcgggttagca	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylVer-R	ggcattgtagtacgtgtgca	
Отдел <i>Methanobacteriota</i> ( <i>Euryarchaeota</i> )	16S pPHK	gMethano-brevibac-F	cgctaaggatgggtctgcg	Kurina с соавт., 2020
		gMethano-brevibac-R	ctgcccagctcttattccaaagc	

В качестве референсных штаммов для тестирования специфичности праймеров выбраны штаммы бактерий *Flavobacterium* sp. БИМ В-1313, *Chryseobacterium oncorhynchi* БИМ В-1307 Г – представители отдела *Bacteroidota*; *Bifidobacterium longum* БИМ В-390, *Micrococcus luteus* БИМ В-1096 Г, *Rhodococcus ruber* БИМ В-1181 Г (отдел *Actinomycetota*); *Acinetobacter calcoaceticus* БИМ В-1683, *Escherichia coli* БИМ В-379, *Klebsiella oxytoca* БИМ В-812 Г, *Pseudomonas aeruginosa* БИМ В-807 Г (отдел *Pseudomonadota*) из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, а также бактерии *Lactobacillus paracasei* CL4, *Pediococcus acidilactici* CL2.2, *Bacillus licheniformis* CL2.1, *Staphylococcus epidermidis* K2-2 (отдел *Bacillota*), выделенные из рубца коров.

С целью идентификации основных видов физиологически значимых групп микроорганизмов, колонизирующих рубец молочных коров, и получения референсных штаммов для последующих молекулярно-генетических исследований методом накопительного культивирования на селективных средах выделено 9 штаммов бактерий лактатутилизирующих и целлюлолитических бактерий. Изучены их морфологические и культуральные свойства, методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа белковых профилей определена видовая принадлежность. На основании полученных данных три штамма отнесено к виду *Bacillus licheniformis*, остальные – к видам *Pediococcus acidilactici*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus kefir*, *Streptococcus equinus*, *Escherichia coli* (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Видовая принадлежность микроорганизмов – представителей физиологически значимых групп микробиоты рубца молочных коров

Table 2. Species belonging of microorganisms – representatives of physiologically significant groups of microbiota of the rumen of dairy cows

Изолят	Предполагаемая физиологически значимая группа	Морфология колоний и клеток	Результат MALDI-TOF MC анализа
CL1.1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Ослизненные колонии с неровным краем, грамположительные спорообразующие палочки	<i>Bacillus licheniformis</i>
C2.1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Рыхлые с неровным краем колонии розового цвета, грамположительные спорообразующие палочки	<i>Bacillus licheniformis</i>
T3.1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Ослизненные с неровным краем колонии белого цвета	<i>Bacillus licheniformis</i>
CL3	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Молочно-белые колонии с ровным краем, грамположительные мелкие кокки	<i>Pediococcus acidilactici</i>
C2.2	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Полупрозрачные мелкие колонии с ровным краем, грамположительные кокки	<i>Pediococcus acidilactici</i>
CL4	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Молочно-белые колонии с ровным краем, грамположительные палочки	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
T1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Белые колонии с ровным краем, грамположительные палочки	<i>Lentilactobacillus kefir</i>
T2	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Вогнутые колонии матово-белого цвета, грамположительные кокки	<i>Streptococcus equinus</i>
6.4	Целлюлолитические микроорганизмы	Колонии молочно-белого цвета, блестящие, округлой формы, грамотрицательные прямые палочки	<i>Escherichia coli</i> (2.361)

Согласно данным литературы, бактерии *P. acidilactici*, наряду с *Streptococcus bovis*, рассматриваются как маркеры ацидоза у крупного рогатого скота [15] и могут использоваться в дальнейших исследованиях для оценки эффективности пробиотических кормовых добавок в профилактике данного заболевания.

Известно, что одним из способов регуляции состава микробиома рубца жвачных животных для улучшения рубцового пищеварения и повышения продуктивности молочного скота является применение пробиотических кормовых добавок. Нами в рационах лактирующих коров испытаны пробиотические кормовые добавки с различным механизмом действия. Кормовая добавка «Споробакт-К», с. п. предназначена для повышения биологической доступности кормов, иммунорекции и активизации процессов метаболизма при выращивании крупного рогатого скота. Основой кормовой добавки «Споробакт-К», с. п. являются клетки, споры и продукты метаболизма бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-497 и *Bacillus velezensis* БИМ В-713 (соотношение 1 : 1), адсорбированных на носителе. Титр жизнеспособных бактериальных клеток составляет не менее  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/г, диаметр зоны подавления роста патогенной микробиоты рубца крупного рогатого скота варьируется в диапазоне: для *E. coli* – 25,0–28,0 мм, для *S. aureus* – 32,0–35,0, для *P. vulgaris* – 17,0–19,0 мм. Количественная оценка ферментативной активности кормовой добавки показала, что протеазная, целлюлазная и ксиланазная активность составляет  $19,3 \pm 0,13$ ;  $2,1 \pm 0,083$  и  $5,2 \pm 0,02$  ед/мл соответственно.

Выживаемость бактериального консорциума, являющегося основой Споробакта-К, с. п., спустя 12 ч в искусственном желудочном соке (рН 2.0, пепсин) составляет более 80 %, под действием



желчи (2–10 %) – 100 %. Последовательное воздействие на консорциум бактерий кислой среды в присутствии пепсина в течение 4 ч и последующее помещение в 10%-й желчный раствор (рН 8,0) на 12 ч приводит к незначительной (на 15 %) потере жизнеспособности клеток. Комплексная ферментативная активность и устойчивость бактерий-антагонистов *B. velezensis* БИМ В-497 Д и *B. velezensis* БИМ В-713 Д к низкой кислотности среды и желчи позволяет рассматривать «Споробакт-К», с. п. как перспективную кормовую добавку для контроля ацидозных состояний крупного рогатого скота.

Кормовая добавка «Румибакт», с. п. для профилактики и лечения ацидозов жвачных животных разработана на основе пропионовокислых бактерий (титр не менее  $2,0 \cdot 10^{10}$  КОЕ/г), которые являются природными компонентами рубца травоядных животных и способны утилизировать лактат. «Румибакт», с. п. обеспечивает нормализацию рубцового пищеварения, препятствует развитию ацидозов у продуктивных коров за счет конверсии молочной кислоты в пропионовую. Использование добавки «Румибакт», с. п. позволяет оптимизировать рН содержимого рубца, снизить риск заболевания животных ламинитами, повысить активность рубцовой микробиоты, улучшить суточную продуктивность животных.

Пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii* AR16 и *Propionibacterium shermanii* R15, составляющие основу кормовой добавки «Румибакт», с. п., характеризуются высокой колониеобразующей активностью при культивировании на различных питательных средах. Для штамма *Pr. shermanii* AR16 характерным является активный рост в условиях повышенной кислотности на среде с молочной кислотой, что позволяет прогнозировать его высокую конкурентоспособность в микробоценозе рубца (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Жизнеспособность бактерий *P. shermanii* AR16 и *P. shermanii* R15 на различных питательных средах

Table 3. Viability of bacteria *P. shermanii* AR16 and *P. shermanii* R15 on different nutrient media

Среда культивирования	рН	Штамм	Титр, КОЕ/мл
MRS, глюкоза	7,2	<i>P. shermanii</i> AR16	$1,5 \cdot 10^9$
		<i>P. shermanii</i> R15	$1,0 \cdot 10^{10}$
ПКБ, глюкоза	7,2	<i>P. shermanii</i> AR16	$1,0 \cdot 10^9$
		<i>P. shermanii</i> R15	$2,1 \cdot 10^9$
ПКБ, глюкоза + молочная кислота	5,5	<i>P. shermanii</i> AR16	$2,0 \cdot 10^8$
		<i>P. shermanii</i> R15	$1,0 \cdot 10^5$

Кроме лактатутилизирующей способности, штаммы пропионовокислых бактерий *Pr. shermanii* AR16 и *Pr. shermanii* R15 способны продуцировать пропионовую кислоту, витамины группы В, обладают  $\alpha$ -галактозидазной (16–166 ед/мл),  $\beta$ -галактозидазной (42–166 ед/мл),  $\beta$ -глюкозидазной (54–433 ед/мл) активностью.

Таким образом, пробиотическая кормовая добавка «Румибакт», с. п., способная утилизировать избыток молочной кислоты в рубце и превращать ее в пропионовую, представляет несомненный интерес для коррекции дисфункций рубца коров и может использоваться совместно с кормовой добавкой «Споробакт-К», с. п. в качестве средства для профилактики лактатного ацидоза.

С помощью ПЦР в режиме реального времени в предоставленных сотрудниками РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» образцах рубцовой жидкости лактирующих коров исследована динамика содержания функционально значимых групп микроорганизмов после введения в рацион комбинации пробиотических кормовых добавок «Споробакт-К», с. п. и «Румибакт», с. п. в количестве 1,0 и 0,02 г соответственно на 1 кг комбикорма.

Проанализировано количественное содержание функционально значимых групп микроорганизмов – грамотрицательных бактерий отдела *Bacteroidota* и грамположительных бактерий отдела *Bacillota*; условно-патогенных бактерий *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*; целлюлолитических бактерий *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*; амилолитических бактерий *Lactobacillus* sp., *Prevotella albensis*, лактатутилизирующих бактерий *Selenomonas ruminantium*, изменение численности которых, согласно литературным данным [12–15], может влиять на развитие лактатного

ацидоза. Показано, что на протяжении периода исследования в структуре микробных сообществ рубцов опытных животных не выявлялись изменения, связанные с развитием лактатного ацидоза. Применение пробиотических добавок на основе бактерий *Bacillus* и *Propionibacterium* в составе кормов закономерно повысило количество представителей *Bacillota* и *Bacteroidota* у животных опытной группы. Отмечалось также увеличение относительного содержания бактерий отделов *Pseudomonadota* и *Fusobacteriota* и снижение количества бактерий отдела *Actinomycetota* ( $p < 0,05$ ). Относительное содержание амилолитических бактерий *S. ruminantium* оставалось стабильным, *Prevotella albensis* – снижалось, *Lactobacillus* sp. – несколько увеличивалось, а бактерий отделов *Verrucomicrobiota*, *Spirochaetota* и метаногенных архей отдела *Euryarchaeota* менялось незначительно. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии фактора риска развития ацидозного состояния. Важным критерием эффективности использования пробиотических бактерий является также статистически значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение доли патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в микробиоте рубца животных экспериментальной группы. Так, количество бактерий *E. coli* и *S. aureus* снижалось у 60 % опытных коров, тогда как у 80 % коров контрольной группы, получавших стандартный рацион, количество бактерий *Staphylococcus* sp. достоверно повышалось. Во время эксперимента отмечен также сдвиг показателя кислотности рубцовой жидкости в нейтральную область (7,0–7,3), что является важным фактором профилактики развития лактатного ацидоза.

Применение в рационах лактирующих коров указанных добавок, а также доломитовой муки (10 кг/т) в качестве буфера способствовало интенсификации процессов пищеварения и росту молочной продуктивности животных – отмечалось повышение поедаемости грубых кормов, переваримости питательных веществ корма (снижение кормовых затрат на получение 1 кг молока на 7,4 %), увеличение удоя молока натуральной (на 6,1 %) и базисной (на 6,5 %) жирности, а также улучшение его качественного состава (повышение содержания белка и жира на 0,02 %).

**Заключение.** Оптимизированы методы выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров, позволяющие получить препараты нуклеиновых кислот высокой чистоты без ингибиторов ПЦР, пригодные для молекулярно-генетических исследований. Подобраны праймеры для определения доминирующих таксонов микробиома рубца – бактерий отделов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* (классы *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*), *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* и архей отдела *Euryarchaeota*. Определены температурно-временные параметры проведения ПЦР-РВ для качественного и количественного анализа таксономического состава микробиома рубца.

Показано, что комплексное применение кормовых добавок «Споробакт-К» (на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*) и «Румибакт» (на основе пропионовокислых бактерий рода *Propionibacterium*) позволяет регулировать состав микробиоты рубца, контролировать численность патогенных бактерий, нормализовать показатель кислотности рубцовой жидкости со сдвигом в нейтральную область и обеспечивать профилактику лактатного ацидоза, повышать усвояемость трудногидролизуемых кормов за счет продукции широкого спектра гидролитических ферментов. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности их использования для повышения резистентности животных к условно-патогенной микробиоте, улучшения рубцового пищеварения, повышения молочной продуктивности и профилактики ацидоза у коров.

### Список использованных источников

1. Лаптев, Г. Ю. Микробиом рубца жвачных: современные представления / Г. Ю. Лаптев, Л. А. Ильина, В. В. Солдатова // Животноводство России. – 2018. – № 10. – С. 38–42.
2. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктистова [и др.] // Уч. записки Казан. ун-та. Сер. естеств. науки. – 2017. – № 1 (159). – С. 85–107.
3. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О. В. Федорова [и др.] // Вестн. технолог. ун-та. – 2016. – Т. 15, № 19. – С. 170–174.
4. Сверчкова, Н. В. Критерии отбора и характеристика штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* – основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для животноводства / Н. В. Сверчкова, Э. И. Коломиец // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 105–113.



5. Оптимизация метода выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости лактирующих коров / В. С. Летвинова [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. Дню белорус. науки и 95-летию кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, Витебск, 15–16 декабря 2022 г. / редкол.: Н. И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2023. – С. 160–162.
6. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments / J. E. M. Stach [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 5, N 10. – P. 828–841. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x>
7. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities / M. Mühling [et al.] // *ISME J.* – 2008. – Vol. 2, N 4. – P. 379–392. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.97>
8. The Gut microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity / M. L. Hermann-Bank [et al.] // *BMC Genomics.* – 2013. – Vol. 14. – Art. 788. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-788>
9. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa / T. Bacchetti de Gregoris [et al.] // *J. Microbiol. Methods.* – 2011. – Vol. 86, N 3. – P. 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>
10. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa / I. Kurina [et al.] // *Mol. Cell. Probes.* – 2020. – Vol. 52. – Art. 101570. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101570>
11. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии: учеб. пособие / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева; под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
12. Исследование микробиома рубца у овец с использованием молекулярно-генетических методов (обзор) / Е. М. Колоскова [и др.] // *Проблемы биологии продуктивных животных.* – 2020. – № 4. – С. 5–26.
13. Лаптев, Г. Ю. Микробиом рубца – основа здоровья коров / Г. Ю. Лаптев, Е. А. Ёбылдырым, Л. А. Ильина // *Животноводство России.* – 2020. – № 4. – С. 42–45.
14. Мирошникова, М. С. Основные представители микробиома рубца / М. С. Мирошникова // *Животноводство и кормопроизводство.* – 2020. – Т. 103, № 4. – С. 174–185.
15. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid / M. A. Cobos [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2011. – Vol. 90, N 1. – P. 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.006>

## References

1. Laptev G., Il'ina L., Soldatova V. Ruminant microbiome of ruminants: modern concepts. *Zhivotnovodstvo Rossii* [Animal husbandry in Russia], 2018, no. 10, pp. 38–42 (in Russian).
2. Feoktistova N. V., Mardanova A. M., Khadieva G. F., Sharipova M. R. Probiotics based on bacteria of genus *Bacillus* in poultry breeding. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki* [Scientific notes of Kazan University. Series Natural Sciences], 2017, vol. 159, no. 1, pp. 85–107 (in Russian).
3. Fedorova O. V., Nazmieva A. I., Nuretdinova E. I., Valeeva R. T. Probiotic preparations based on microorganisms of the genus *Bacillus*. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Technological University], 2016, vol. 15, no. 19, pp. 170–174 (in Russian).
4. Sverchkova N. V., Kolomiets E. I. Selection criteria and characterization of sporulating bacterial strains of genus *Bacillus* – the basis of probiotic preparations and feed additives for livestock. *Vestsi Natsyyanal'най akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 105–113 (in Russian).
5. Letvinova V. S., Bareiko A. A., Sidorenko A. V., Sverchkova N. V. Optimization of the method for isolating metagenomic DNA from the ruminal fluid of lactating cows. *Aktual'nye problemy infektsionnoi patologii zhivotnykh i puti ikh resheniya: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi Dnyu Belorusskoi nauki i 95-letiyu kafedry epizootologii i infektsionnykh boleznei (Vitebsk, 15–16 dekabrya 2022 goda)* [Current problems of infectious pathology of animals and ways to solve them: Proceedings of the International scientific and practical conference dedicated to the Day of Belarusian Science and the 95th anniversary of the Department of Epizootology and Infectious Diseases (Vitebsk, December 15–16, 2022)]. Vitebsk, 2023, pp. 160–162 (in Russian).
6. Stach J. E. M., Maldonado L. A., Ward A. C., Goodfellow M., Bull A. T. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003, vol. 5, no. 10, pp. 828–841. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x>
7. Mühling M., Woolven-Allen J., Murrell J. C., Joint I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME Journal*, 2008, vol. 2, no. 4, pp. 379–392. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.97>
8. Hermann-Bank M. L., Skovgaard K., Stockmarr A., Larsen N., Mølbak L. The Gut microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genomics*, 2013, vol. 14, art. 788. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-788>
9. Bacchetti de Gregoris T., Aldred N., Clare A. S., Burgess J. G. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, vol. 86, no. 3, pp. 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>
10. Kurina I., Popenko A. S., Klimentenko N., Koshechkin S., Chuprikova L., Filipenko M., Tyakht A., Alexeev D. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, vol. 52, art. 101570. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101570>

11. Tepper E. Z., Shil'nikova V. K., Pereverzeva G. I. *Practical studies in microbiology: a manual*. Moscow, Drofa Publ., 2004. 256 p. (in Russian).

12. Koloskova E. M., Ostrenko K. S., Ezerskii V. A., Ovcharova A. N., Belova N. V. Studies of the sheep rumen microbiome using molecular genetic methods: a review. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals], 2020, no. 4, pp. 5–26 (in Russian).

13. Laptev G., Ilydyrym E., Il'ina L. Rumen microbiome is the basis of cow health. *Zhivotnovodstvo Rossii* [Animal husbandry in Russia], 2020, no. 4, pp. 42–45 (in Russian).

14. Miroshnikova M. S. The main representatives of the rumen microbiome. *Zhivotnovodstvo i kormoproizvodstvo* [Livestock and forage production], 2020, vol. 103, no. 4, pp. 174–185 (in Russian).

15. Cobos M. A., Ley de Coss A., Ramirez N. D., Gonzalez S. S., Ferrera Cerrato R. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Research in Veterinary Science*, 2011, vol. 90, no. 1, pp. 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.006>

### Информация об авторах

*Сверчкова Наталья Владимировна* – канд. биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [sverchkova@biotech.bas-net.by](mailto:sverchkova@biotech.bas-net.by)

*Проскурнина Ирина Александровна* – заведующий лабораторией. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [sverchkova@biotech.bas-net.by](mailto:sverchkova@biotech.bas-net.by)

*Литвинова Вероника Сергеевна* – аспирант. Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН (ул. Губкина, 3, 117971, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: [miranikki@yandex.by](mailto:miranikki@yandex.by)

*Рябая Наталья Евгеньевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [microbio@mbio.bas-net.by](mailto:microbio@mbio.bas-net.by)

*Саханчук Анна Ивановна* – канд. с.-х. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству (ул. Фрунзе, 11, 222160, г. Жодино, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: [info@belniig.by](mailto:info@belniig.by)

*Коломиец Эмилия Ивановна* – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [kolomiets@biotech.bas-net.by](mailto:kolomiets@biotech.bas-net.by)

### Information about the authors

*Natalia V. Sverchkova* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Chief Researcher. State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology” (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [sverchkova@biotech.bas-net.by](mailto:sverchkova@biotech.bas-net.by)

*Irina A. Proskurnina* – Head of the Laboratory. State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology” (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [pros@biotech.bas-net.by](mailto:pros@biotech.bas-net.by)

*Veronika S. Litvinova* – Postgraduate student. N. I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences (3, Gubkin Str., 117971, Moscow, Russian Federation). E-mail: [miranikki@yandex.by](mailto:miranikki@yandex.by)

*Natalia E. Ryabaya* – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [microbio@mbio.bas-net.by](mailto:microbio@mbio.bas-net.by)

*Anna I. Sachanchuk* – Ph. D. (Agric.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Livestock (11, Frunze Str., 222160, Zhodino, Minsk district, Republic of Belarus). E-mail: [info@belniig.by](mailto:info@belniig.by)

*Emiliya I. Kolomiets* – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology” (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [kolomiets@biotech.bas-net.by](mailto:kolomiets@biotech.bas-net.by)

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 595.384.591.5:595.3  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-289-297>

Поступила в редакцию 26.02.2024  
Received 26.02.2024

В. Ф. Кулеш<sup>1</sup>, Ю. Г. Гигиняк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный педагогический университет им. Максима Танка,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

## РАЗМНОЖЕНИЕ СИБИРСКОГО ШРИМСА *EXOPALAEEMON MODESTUS* (HELLER) ИЗ КАПЧАГАЙСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА (РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН): РЕПРОДУКТИВНАЯ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ И ПЛОДОВИТОСТЬ

**Аннотация.** Изучены элементы репродуктивных показателей сибирского шримса *Exopalaemon modestus* (Heller) из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан). Оценена величина репродуктивной производительности в сравнении с другими видами креветок из сем. Palaemonidae, которая в середине вегетационного сезона (июль) составила 0,24. Рассчитаны уравнения зависимости массы яйцекладки от массы половозрелых самок. Величина абсолютной плодовитости составила в среднем  $68 \pm 19$  яиц при длине самки  $35,8 \pm 3,29$  мм. Эта взаимосвязь описывается уравнением регрессии (коэффициент детерминации  $R^2 = 0,583$ ). Оценивать и анализировать репродуктивные показатели необходимо с учетом возрастной структуры и времени вегетационного периода.

**Ключевые слова:** сибирский шримс, размножение, яйцекладка, репродуктивная производительность, абсолютная плодовитость, вегетационный сезон

**Для цитирования:** Кулеш, В. Ф. Размножение сибирского шримса *Exopalaemon modestus* (Heller) из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан): репродуктивная производительность и плодовитость / В. Ф. Кулеш, Ю. Г. Гигиняк // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 289–297. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-289-297>

Victor F. Kulesh<sup>1</sup>, Yuri G. Hihiniak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maxim Tank Belarusian State Pedagogical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources,  
Minsk, Republic of Belarus

## REPRODUCTION OF SIBERIAN SHRIMP *EXOPALAEEMON MODESTUS* (HELLER) FROM THE KAPCHAGAI RESERVOIR (REPUBLIC OF KAZAKHSTAN): REPRODUCTIVE PERFORMANCE AND FECUNDITY

**Abstract.** The elements of reproductive performance of Siberian shrimp *Exopalaemon modestus* (Heller) from Kapchagai reservoir (Republic of Kazakhstan) were studied. The value of reproductive performance was estimated in comparison with other shrimp species from the family Palaemonidae. Palaemonidae that in the middle of the growing season (July) was 0.24. The equations for the relationship between the oviposition weight and the weight of sexually mature females were calculated. The value of absolute fecundity averaged  $68 \pm 19$  eggs (s. d.) to a female length of  $35.8 \pm 3.29$  mm (s. d.). This relationship is described by the regression equation (determination coefficient  $R^2 = 0.583$ ). Reproductive performance should be evaluated and analysed taking into account the age structure and time of the growing season.

**Keywords:** Siberian shrimp, reproduction, oviposition, reproductive productivity, absolute fecundity, growing season

**For citation:** Kulesh V. F., Hihiniak Yu. G. Reproduction of Siberian shrimp *Exopalaemon modestus* (Heller) from the Kapchagai reservoir (Republic of Kazakhstan): reproductive performance and fecundity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 289–297 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-289-297>

**Введение.** Пресноводная креветка – сибирский шримс *Exopalaemon modestus* (*Palaemon modestus*) благодаря своей экологической пластичности широко распространен на азиатском континенте. На севере он доходит до сибирских рек, на юге – до южной оконечности Китая и острова Тайвань, а также встречается в водоемах Дальнего Востока (водоемы бассейна Амура, Уссури), Кореи, Японии. Особенно большие поселения найдены в пресноводных водоемах на юго-западе Корейского полуострова. Максимальные скопления сибирского шримса приурочены к литоральной

зоне водоемов [1–3]. Креветки устойчивы к дефициту кислорода. Летальные пороги содержания кислорода в воде при температуре 22,0–24,5 °С составляют 0,57–0,96 мг/л [1]. *Exopalaemon modestus* способен существовать в широком температурном диапазоне – от 1,0 до 35,0 °С и выше. В р. Амур, где были отмечены поселения этого вида, зимняя температура опускается до 0,1 °С [1, 4].

В 1980-е годы сибирский шримс впервые был зарегистрирован нами в Капчагайском водохранилище (бассейн р. Или), недалеко от Алма-Аты [5]. Позже, в мае 2012 г., этот вид был обнаружен в самой р. Или Алматинской области [6]. Затем был описан обширный ареал *E. modestus* в водоемах Жамбылской и Южно-Казахстанской областей. Вероятнее всего, сибирский шримс, как и другие виды пресноводных креветок *Macrobrachium nipponense*, был завезен сюда с Дальнего Востока и Китая при акклиматизации растительоядных рыб [7].

В конце XX в. (1995 г.) эта креветка попала в западную часть Северной Америки, в р. Колумбия и водоемы ее бассейна [8, 9]. Как полагают, она появилась в р. Колумбия в результате обмена балластными водами с океанских судов, что является обычным способом распространения инвазивных видов. Креветка заняла одно из лидирующих мест в бентосном сообществе этих водоемов. Ее численность в неводных обловах составила от 0,004 до 2,0 экз/м<sup>2</sup>, а биомасса – от 0,14 до 0,30 г/м<sup>2</sup> [10]. В последующие годы численность креветок значительно выросла, и в 2015 г. в водохранилищах р. Снейк (приток р. Колумбия) были отмечены популяции сибирского шримса с плотностью 5,1 экз/м<sup>2</sup> [11, 12].

В 2000 г. этот вид был впервые обнаружен в Калифорнии при исследовании залива Сан-Франциско в нижнем течении р. Сакраменто. С тех пор численность и распространение сибирского шримса быстро выросли в этом регионе, выше по течению рек Сакраменто, Сан-Хоакин [13].

Таким образом, с интенсификацией экономических отношений наблюдается стремительное расширение поселений сибирского шримса. В местах естественного ареала (в Китае, Корее) этот вид имеет весьма значимую экологическую и коммерческую ценность. Благодаря своим небольшим размерам эта креветка является пищевым объектом для многих видов рыб. В некоторых больших озерах продукция сибирского шримса составила половину или даже большую часть от всего улова креветок. Из-за превосходного пищевого аромата *E. modestus* в последние годы завоевал весь рынок Китая и выращивать его в прудовой аквакультуре стало выгодно.

Наши исследования показали, что сибирский шримс может быть объектом тепловодной аквакультуры и использоваться как дополнительный компонент кормовой базы рыб в водоемах – охладителях энергетических объектов. В этих же условиях было изучено личиночное развитие *E. Modestus*, доставленного из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан) в 1988 г. [14, 15]. Однако до сих пор остается недостаточно изученным весьма важный период онтогенеза этого вида – размножение и некоторые вопросы репродукции, чему и посвящено данное исследование.

**Материалы и методы исследования.** При исследовании Капчагайского водохранилища в июле 1988 г. сотрудниками Института зоологии НАН Беларуси были обнаружены два вида пресноводных креветок, которые были идентифицированы крупнейшим знатоком этого систематического таксона Л. Б. Ходтхейсом (L. B. Holthuis) как *Exopalaemon modestus* (Heller, 1862) и *Macrobrachium nipponense* (De Naan, 1849) [5].

Креветки *E. modestus* были отловлены из мелководий Капчагайского водохранилища при помощи сачков и небольшого ручного трала и доставлены живыми в аквариальную Института зоологии НАН Беларуси. Часть креветок фиксировали 70%-м этиловым спиртом. Для определения абсолютной плодовитости яйценосных самок отбирали сразу же после откладки ими яиц на плеоподы (без глазков). В это время яйца окрашены в ярко-зеленый цвет. С течением эмбриогенеза яйца приобретают серо-зеленую окраску, а на момент вылупления личинок они становятся прозрачно-серыми с визуально определяемыми глазками.

В стационарных условиях яйца счищали с плеопод самок для определения массы яйцекладки. Для определения сухой массы самок и яйцекладку помещали в термостат и высушивали при температуре 60 °С. Сырую, сухую массу как тела самок, так и яйцекладок определяли при помощи электронных весов с точностью до 0,01 мг. Общую длину тела креветок (TL, мм) измеряли от острия (начала) рострума до конца тельсона при помощи штангенциркуля. Минимальную длину тела половозрелых самок определяли при наличии кладки яиц [16]. Репродуктивную произ-



водительность (репродуктивное усилие) рассчитывали как отношение сухой массы яйцекладки к сухой массе самки. Изменчивость длины тела креветок, плодовитость и величину яйцекладки оценивали, используя стандартное отклонение (s. d.) и коэффициент вариации (с. v., %).

Полученный материал обрабатывали с применением программного пакета STATISTICA 7.0.

**Результаты и их обсуждение.** В табл. 1 приведены длина и масса половозрелых особей, сухая и сырая масса самок без яиц и такие репродуктивные показатели, как сырая и сухая масса яйцекладки. Как видно из табл. 1, длина тела половозрелых особей (самки и самцы) составляла от 28 до 48 мм, сырая масса тела – от 120 до 590 мг при средних показателях  $35,3 \pm 3,5$  и  $292,7 \pm 82,9$  соответственно. Близкие параметры характерны и для самок без яиц. Длина тела является более консервативным показателем, поэтому коэффициенты вариации имеют небольшое значение. Для сырой массы тела коэффициенты вариации находятся в пределах 28,3 и 30,0 %, что свидетельствует о большей степени неравномерности распределения этой величины в данной выборке. То же относится и к сухой массе.

Таблица 1. Длина, масса тела и репродуктивные показатели сибирского шримса

Table 1. Length, body weight and reproductive parameters of siberian shrimp

Показатель	Значение показателя			с. v., %	Число измерений
	среднее $\pm$ s. d.	минимальное	максимальное		
Длина половозрелых особей, мм	$35,3 \pm 3,5$	28	48	8,9	172
Сырая масса половозрелых особей, мм	$292,7 \pm 82,9$	120	590	28,3	172
Длина самок без яиц, мм	$36,3 \pm 3,5$	28	45	9,6	110
Сырая масса самок без яиц, мг	$301,4 \pm 90,5$	120	520	30,0	110
Сухая масса самок без яиц	$65,6 \pm 15,3$	30	106	25,3	110
Сырая масса яйцекладки	$45,9 \pm 15,2$	18	81	33,0	110
Сухая масса яйцекладки	$15,4 \pm 5,1$	6	26	32,3	110

При изучении репродукционных параметров для эколого-энергетических расчетов следует учитывать соотношение массы и длины тела как половозрелых самцов и самок, так и отдельно самок (рис. 1). Зависимость массы (W, мг) от длины тела (L, мм) описывается экспоненциальным уравнением:

$$\text{для половозрелых самцов и самок} - W = 27,31e^{0,065L} \quad (R^2 = 0,719), \quad (1)$$

$$\text{для самок без яиц} - W = 27,31e^{0,065L} \quad (R^2 = 0,658). \quad (2)$$

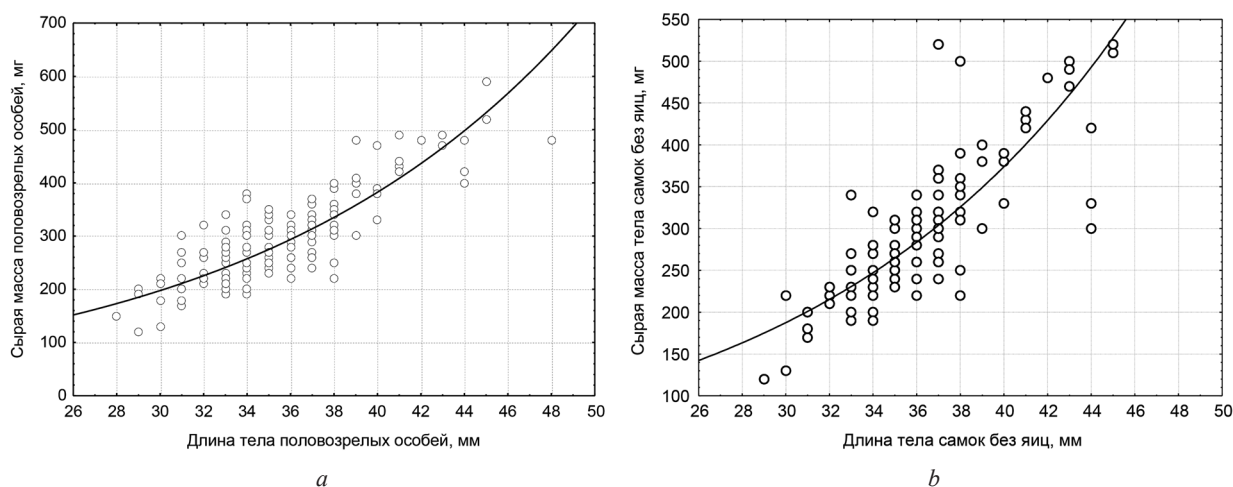


Рис. 1. Зависимость сырой массы тела половозрелых особей (самцы и самки) (a) и самок без яиц (b) от длины тела: a – кривая согласно уравнению (1), b – согласно уравнению (2)

Fig. 1. Dependence of the crude body weight of sexually mature individuals (a) and females without eggs (b) on the body length: a – curve according to equation (1), b – according to equation (2)

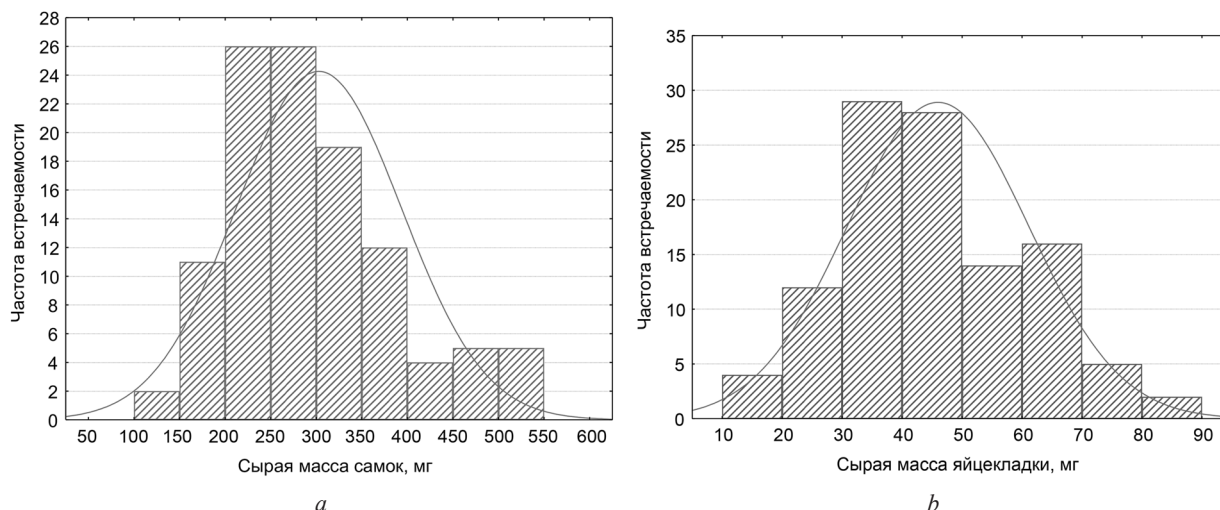


Рис. 2. Диапазоны массы тела самок (a) и яйцекладок (b)

Fig. 2. Range of body weights of females (a) and egg-laying females (b)

Средняя сырая масса яйцекладки самок, собранных в июле из Капчагайского водохранилища, составляет  $45,9 \pm 15,2$  (18–81) мг. Сухая масса в 3 раза ниже и равняется в среднем  $15,4 \pm 5,1$  (6–26) мг (табл. 1). Коэффициенты вариации, как и для массы тела самок, находятся в пределах 32–33 %, что также свидетельствует о достаточно широком спектре распределения значений этого показателя для узкой выборки креветок.

На рис. 2 показаны диапазоны сырой массы тела самок (a) и массы яйцекладок (b). Как видно из рис. 2, масса тела большинства самок сибирского шримса колебалась в пределах 200–350 мг. Несколько иным было распределение массы яйцекладок. Здесь максимальный весовой интервал характерен для двух классов – от 30 до 50 мг. Примерно в 2 раза меньше масса яйцекладки у особей с массой тела от 20–30 до 50–70 мг.

Для количественных расчетов репродуктивных показателей следует учитывать соотношение сырой и сухой массы яйцекладки и сырой и сухой массы тела самок (рис. 3). Эти соотношения удовлетворительно описываются уравнениями регрессии:

$$\text{для сырой массы} - W_{\text{ovo}} = 6,82 + 0,13W \quad (R^2 = 0,60), \quad (3)$$

где  $W_{\text{ovo}}$  – сырая масса яйцекладки, мг;  $W$  – сырая масса тела самки, мг;

$$\text{для сухой массы} - W_{\text{s_ovo}} = 0,06 - 0,24W_s \quad (R^2 = 0,505), \quad (4)$$

где  $W_{\text{s_ovo}}$  – сырая масса яйцекладки, мг;  $W_s$  – сырая масса тела самки, мг.

Обращает на себя внимание невысокий коэффициент детерминации в приведенных уравнениях, хотя прослеживается общая тенденция, свидетельствующая о прямо пропорциональном увеличении массы яйцекладки с массой тела самок. Коэффициенты вариации (см. табл. 1) для этого показателя выше на 30 %, что также показывает неравномерное его распределение по отношению к массе тела. Такие же результаты приведены при исследовании репродуктивных показателей *M. hainanense* [16]. Это небольшая креветка, обитающая в лесных ручьях Юго-Восточного Китая. Ее размеры вполне сопоставимы с *Exopalaemon modestus*. Например, самая крупная из 16 яйценосных самок была 53,7 мм. Авторы попытались установить соотношение репродуктивной производительности от массы тела, но такой зависимости не обнаружено (коэффициент детерминации  $R^2$  составил всего 0,03 %).

В стратегии размножения такой показатель, как репродуктивная производительность, или репродуктивное усилие (RE), играет важнейшую роль. Это отношение массы или энергетического эквивалента одной яйцекладки к аналогичному показателю самки [5]. Вследствие ограниченности вещества и энергии, идущих на размножение, у половозрелых особей естественным образом поддерживается оптимальное соотношение между массой одного яйца и количеством яиц,



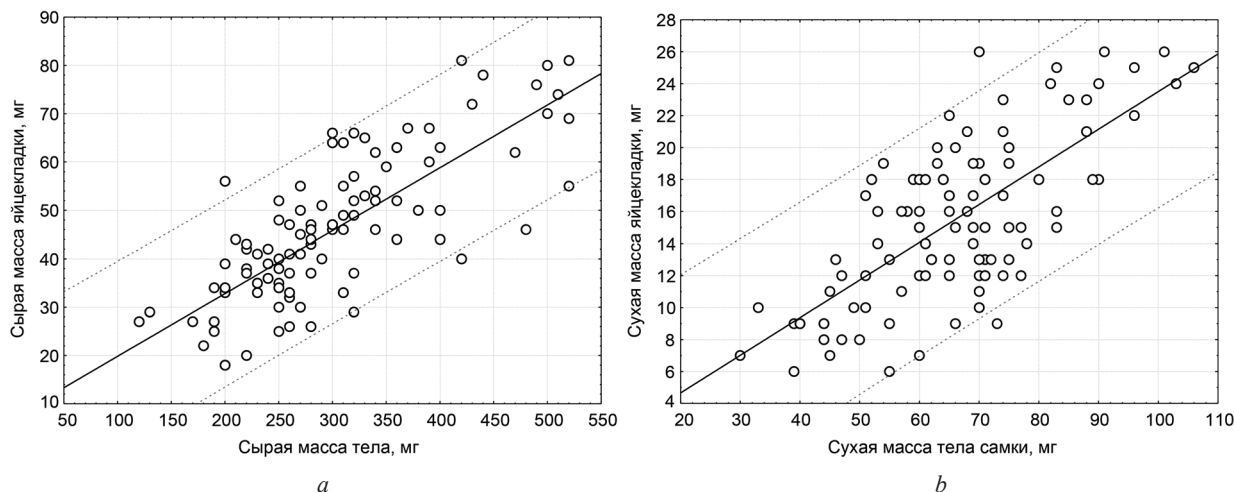


Рис. 3. Зависимость сырой (а) и сухой (b) массы яйцекладки от сырой (а) и сухой (b) массы тела самки: а – прямая согласно уравнению (3), b – прямая согласно уравнению (4). Доверительные интервалы (вероятность 0,95 %) обозначены штриховыми линиями

Fig. 3. Dependence of raw (a) and dry (b) mass of oviposition on raw (a) and dry (b) body weight of female: a – straight line according to equation (3), b – straight line according to equation (4). Confidence intervals (probability 0.95 %) are indicated by the dashed lines

с одной стороны, и затратами энергии на размножение самок – с другой. Измеренная таким образом доля запасенной организмом энергии, которую он использует на размножение, изменяется в широком диапазоне у гидробионтов, но в пределах близких таксонов изменения этого показателя вполне сопоставимы.

В табл. 2 приведены данные о репродуктивной производительности у пресноводных креветок семейства Palaemonidae. У родов с крупными яйцами (*Palaemon* и *Echopalaemon*) этот показатель находится в пределах 0,12–0,24. У креветок больших размеров с мелкими яйцами он возрастает от 0,19 до 0,56.

Следует отметить, что величина репродуктивного усилия во многом зависит от условий местобитания того или иного вида и довольно существенно изменяется у различных внутривидовых популяций. Значение имеет и период вегетации. Так, например, в водоеме-охладителе ГРЭС № 3 (г. Электрогорск, Московская обл.) этот показатель для самок *M. nipponense* в июне составил 0,47, а в августе снизился до 0,35. Такая же величина этого показателя была характерна для самок восточной речной креветки из водоема-охладителя Березовской ГРЭС в мае [5]. Отметим также, что репродуктивное усилие *M. hainanense* в среднем составило всего 0,11, или 11 % (в интервале 3,7–17,1 %) [16].

Пик размножения – июнь–июль. Плодовитость – от 25 до 50 яиц. Репродуктивное усилие измерялось только у 16 самок, которые были собраны с января 2001 г. по декабрь 2002 г. [16], что не дает возможности провести сравнение с нашими данными.

В наших исследованиях сборы сибирского шримса происходили в конце первой декады июля, т. е. в первой половине вегетационного периода, когда величина репродуктивной производительности была самой высокой (0,24) по сравнению с приведенными в литературе данными. К сожа-

Таблица 2. Сравнение репродуктивной производительности (репродуктивное усилие) у креветок семейства Palaemonidae

Table 2. Comparison of reproductive output (reproductive effort) in shrimps of the family Palaemonidae

Вид	Репродуктивное усилие	Автор
<i>M. nipponense</i>	0,29–0,56	[5]
<i>M. nipponense</i>	0,16–0,24	[17]
<i>M. nobili</i>	0,30	[18]
<i>M. olfersii</i>	0,22	[19]
<i>M. acanturus</i>	0,19	[19]
<i>M. hainanense</i>	0,11	[16]
<i>E. modestus</i>	0,17	[20]
<i>E. modestus</i>	0,12	[11]
<i>E. modestus</i>	0,24	Собственные данные
<i>P. gravieri</i>	0,12	[20]
<i>P. northropi</i>	0,14	[19]
<i>P. pandaliformis</i>	0,19	[19]

лению, и другие авторы не приводят точное время сбора материала. Можно сделать вывод о том, что репродуктивная производительность, как и масса одного яйца, имеет максимальное значение в начальный период размножения. Далее значения этих показателей снижаются при продуцировании последующих кладок яиц к концу вегетационного периода. Для сравнения: у восточной речной креветки из солоноватоводного оз. Тузкан и Южного Голодностепского канала (пустыня Каракум, Узбекистан) в августе репродуктивное усилие составило 0,29 и 0,56 соответственно, т. е. этот показатель достаточно изменчив и для адекватной оценки его необходимо определять отдельно для каждой популяции [5].

Такие же переменные данные приводит К. Mashiko [17, 21], отмечая, что репродуктивное усилие для эстуарных популяций выше, чем для чисто пресноводных, и это можно расценивать как адаптацию к неблагоприятным условиям обитания. Размер кладки яиц подвержен влиянию факторов среды и колеблется в основном в зависимости от обеспеченности пищей. Судя по литературным данным, в солоноватых и морских водах величина репродуктивного усилия ниже, чем в пресных у представителей родов *Macrobrachium* и *Palaemon* [5, 17, 19, 21]. Данная тенденция может расцениваться как адаптация к менее благоприятным условиям существования креветок в пресных водах, чем в солоноватых и морских.

Наряду с репродуктивной производительностью одним из ключевых репродуктивных показателей креветок является плодовитость. В табл. 3 приводятся данные по плодовитости сибирского шримса из Капчагайского водохранилища по сравнению с другими местообитаниями.

Т а б л и ц а 3. Плодовитость *E. modestus* из различных местообитаний

Table 3. Fecundity of *E. modestus* from different habitats

Местообитание, источник	Плодовитость, число яиц			Длина тела (от острия рострума до конца тельсона), мм			Число измерений
	средняя ± s. d.	минимальная	максимальная	средняя ± s. d.	минимальная	максимальная	
оз. Young-am, Корея [2]	182 ± 68	60	353	–	7,7*	16,7*	83
вдхр. Капчагайское, Казахстан, собств. данные	68 ± 19,5	30	127	36,3 ± 3,5	29	45	110
р. Снейк, США [9]	148 ± 76,4	37	250	62 ± 7,2	54	75	12
р. Снейк, США [11]	189 ± 54,9	66	332	12,7 ± 1,5	9,0*	16,3*	128

\* Длина карапакса указана от заднего края глазной впадины до медиального края карапакса.

Зависимость величины абсолютной плодовитости от длины тела яйценосных самок показана на рис. 4. Как видно на рис. 4, *a*, наблюдается довольно большой разброс данных, особенно у самок больше 40 мм, поэтому для установления общей тенденции мы сочли возможным рассчитать уравнение регрессии для узкого диапазона размеров тела яйценосных самок без экстремальных значений, находящихся за пределами доверительного эллипса (рис. 4, *b*).

Полученное уравнение имеет вид:

$$E = 86,21 - 4,30L (R^2 = 0,583), \quad (5)$$

где  $E$  – абсолютная плодовитость, число яиц без глазков;  $L$  – длина самки от острия рочтрума до конца тельсона, мм.

Средняя плодовитость креветок, собранных нами в Капчагайском водохранилище (Казахстан), составила  $68 \pm 19$  (30–127) яиц при их средней длине  $35,8 \pm 3,29$  (28–45) мм. Этот показатель соответствует максимальной плодовитости речной формы креветок из оз. Ханка, но почти в 3 раза ниже средней абсолютной плодовитости этого вида из корейского оз. Young-am, которая равна  $182 \pm 68$  (60–353) яиц при длине карапакса 7,69–16,74 мм [1, 2]. Если пересчитать на общую длину (от острия рострума до конца тельсона), то длина тела самок будет колебаться примерно от 30 до 70 мм. В р. Снейк, приток р. Колумбия (США), абсолютная плодовитость составила от 37 до 250 яиц (в среднем – 148,0), что соответствует длине тела корейской популяции креветок, но несколько меньше, чем диапазон яйцекладки в водоемах Кореи [9].

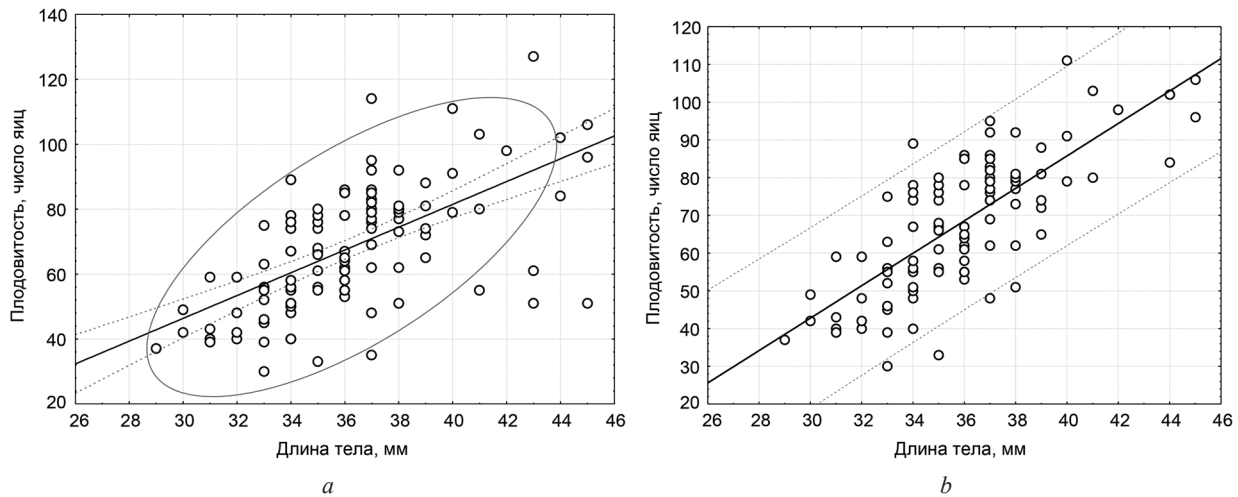


Рис. 4. Зависимость абсолютной плодовитости от длины тела самки: *a* – с экстремальными значениями, *b* – без экстремальных значений; прямая (*b*) – согласно уравнению (5), прерывистая линия – доверительный интервал (вероятность 0,95 %)

Fig. 4. Dependence of the absolute fecundity on the female length: *a* – with extreme values, *b* – without extreme values; straight line (*b*) – according to equation (5), dashed line – confidence interval (probability 0.95 %)

Как известно, величина плодовитости зависит от длины или массы тела и довольно изменчива на протяжении вегетационного периода, особенно у короткоживущих особей. Продолжительность жизни сибирского шримса в различных водоемах оценивается примерно в 1,1–1,3 года, но для некоторых особей может варьироваться от 1,6 года до 2 лет [2, 11]. При этом максимальных размеров и массы тела креветки достигают к концу вегетационного периода, который для различных географических зон имеет различную протяженность.

Так, в Южной Корее вегетационный сезон относительно продолжителен – начинается в марте и длится до декабря. Пик сезона приходится на конец весны и лето, яйцекладущие самки встречаются с мая по сентябрь, но выводков несколько, а самки способны постоянно размножаться в течение всего сезона размножения. Пробы на плодовитость были взяты у самок на протяжении всего вегетационного периода, что и обусловило такие показатели плодовитости и длины тела яйценосных самок [2]. В Калифорнии в р. Снейк репродуктивный сезон по протяженности такой же, как в Южной Корее. Яйценосные самки были собраны там с сентября по декабрь [11] и с конца августа по декабрь [9], когда в популяциях преобладали половозрелые особи максимальных размеров, что и обусловило различия с нашими данными (наши пробы были взяты примерно в середине вегетационного периода, когда половозрелая популяция самок достигла только средних размеров –  $36,3 \pm 3,5$  мм). Подтверждением этому служат и результаты траловых уловов сибирского шримса в р. Амур и оз. Ханка в сентябре–октябре (средняя длина тела креветок составила  $51,3 \pm 1,5$  мм в р. Амур и 50–60 мм в оз. Ханка) [4, 22].

**Заклучение.** Размножение является наиболее значимым периодом в онтогенезе пресноводных креветок, а также определяющим критерием для выбора выгодного объекта аквакультуры. В этой связи изучены элементы репродуктивного цикла – плодовитость, репродуктивная производительность сибирского шримса *Exopalaemon modestus*. Рассчитаны уравнения взаимосвязи сырой и сухой массы яйцекладки от сырой и сухой массы тела половозрелых самок. В середине вегетационного периода (июль) репродуктивная производительность составляет 0,24, что выше, чем в других популяциях современного ареала этого вида, а величина абсолютной плодовитости –  $68 \pm 19$  яиц (s. d. 30–127) при средней длине  $35,8 \pm 3,29$  мм (s. d. 28–45). Эта взаимосвязь описывается уравнением регрессии (коэффициент детерминации  $R^2 = 0,583$ ). Оценивать и анализировать репродуктивные показатели в течение вегетационного периода необходимо с учетом возрастной структуры и времени, когда были взяты пробы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Куренков, И. И. К биологии дальневосточных пресноводных креветок / И. И. Куренков // Труды Амурской икhtiологической экспедиции 1945–1949 гг. / отв. ред. Г. В. Никольский. – М., 1950. – Т. 1. – С. 379–390.
2. Growth and reproductive biology of the freshwater shrimp *Exopalaemon modestus* (Decapoda: Palaemonidae) in a lake of Korea / C. W. Oh [et al.] // J. Crust. Biol. – 2002. – Vol. 22, N 2. – P. 357–366. [https://doi.org/10.1651/0278-0372\(2002\)022\[0357:GARBOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1651/0278-0372(2002)022[0357:GARBOT]2.0.CO;2)
3. Guo, Z. L. On the genus *Exopalaemon* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in Guangdong province, Southern China / Z. L. Guo, X. Q. Wang, J. I. Zhang // Crustaceana. – 2005. – Vol. 78, N 7. – P. 839–850. <https://doi.org/10.1163/156854005774445537>
4. Кошелев, В. Н. Видовой состав и распределение рыб и креветок в русле нижнего Амура / В. Н. Кошелев, Н. В. Колпаков // Изв. Тихоокеан. науч.-исслед. рыбохоз. центр. – 2020. – Т. 200, вып. 2. – С. 292–307.
5. Экология пресноводных креветок / Н. Н. Хмелева [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 1997. – 254 с.
6. De Grave, S. The first record of *Exopalaemon modestus* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) in Kazakhstan / S. De Grave, J. Mann // Crustaceana. – 2012. – Vol. 85, N 12–13. – P. 1665–1667. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003144>
7. О распространении пресноводных креветок (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) в водоемах южного Казахстана и возможности их применения в качестве биоиндикаторов состояния водных экосистем / И. И. Темрешев [и др.] // Изв. НАН Республики Казахстан. Сер. биол. и мед. – 2017. – Т. 2, № 320. – С. 215–223.
8. Introduction of a siberian freshwater shrimp to western North America / R. L. Emmett [et al.] // Biol. Invasions. – 2002. – Vol. 4, N 4. – P. 447–450. <https://doi.org/10.1023/A:1023641915417>
9. Haskell, C. A. Range expansion of an exotic siberian prawn to the lower Snake River / C. A. Haskell, R. D. Baxter, K. F. Tiffan // Northwest Sci. – 2006. – Vol. 80, N 4. – P. 311–316.
10. Introduced palaemonid shrimp invades the Yolo Bypass floodplain / S. Zeug [et al.] // IEP Newslett. – 2002. – Vol. 15, N 1. – P. 13–15.
11. Erhardt, J. M. Ecology of nonnative Siberian prawn (*Palaemon modestus*) in the lower Snake River, Washington, USA / J. M. Erhardt, K. F. Tiffan // Aqua. Ecol. – 2016. – Vol. 50, N 4. – P. 607–611. <https://doi.org/10.1007/s10452-016-9581-4>
12. Tiffan, K. F. Feeding ecology of non-native siberian prawns, *Palaemon modestus* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae), in the lower Snake River, Washington, USA / K. F. Tiffan, W. R. Hurst // Crustaceana. – 2016. – Vol. 89, N 6–7. – P. 721–736. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003553>
13. Brown, T. Status of the Siberian prawn, *Exopalaemon modestus*, in the San Francisco estuary / T. Brown, K. Hieb // San Francisco Estuary Watershed Sci. – 2014. – Vol. 12, N 1. – P. 1–13. <https://doi.org/10.15447/sfew.2014v12iss1art4>
14. Кулеш, В. Ф. Биология культивирования промысловых видов пресноводных креветок и речных раков на теплых водах / В. Ф. Кулеш. – М.: Новое знание, 2012. – 328 с.
15. Kulesh, V. F. Peculiarities of the life cycle of freshwater shrimps with abbreviated larval development / V. F. Kulesh // Hydrobiol. J. – 2020. – Vol. 56, N 4. – P. 43–59. <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v56.i4.40>
16. Mantel, S. K. Reproduction and sexual dimorphism of the palaemonid shrimp *Macrobrachium hainanense* in Hong Kong streams / S. K. Mantel, D. Dudgeon // J. Crust. Biol. – 2005. – Vol. 25, N 3. – P. 450–459. <https://doi.org/10.1651/c-2541>
17. Mashiko, K. Diversified egg and clutch sizes among local populations of the fresh-water prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan) / K. Mashiko // J. Crust. Biol. – 1990. – Vol. 10, N 2. – P. 306–314. <https://doi.org/10.2307/1548489>
18. Pandian, T. J. Moulting and spawning cycles in *Macrobrachium nobili* (Henderson and Mathai) / T. J. Pandian, C. Balasundaram // Int. J. Invertebr. Reprod. – 1982. – Vol. 5, N 1. – P. 21–30. <https://doi.org/10.1080/01651269.1982.10553451>
19. Anger, K. Morphometry and reproductive traits of tropical caridean shrimps / K. Anger, G. S. Moreira // J. Crust. Biol. – 1998. – Vol. 18, N 4. – P. 823–838. <https://doi.org/10.2307/1549156>
20. Oh, C. W. Comparative study on reproductive effort and spawning frequency of the two palaemonid prawns (*Exopalaemon modestus* and *Palaemon grarieri*) with different habitats / C. W. Oh, K. Y. Park // Fish. Aqua. Sci. – 2000. – Vol. 3, N 3–4. – P. 180–187.
21. Mashiko, K. Evidence of differentiation between the estuarine and upper freshwater population inhabiting the same water system in the long-armed prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan) / K. Mashiko // Zool. Mag. – 1983. – Vol. 92, N 2. – P. 180–185.
22. Барабанщиков, Е. И. Результаты траловых съемок в озере Ханка в 2018 и 2020 гг. / Е. И. Барабанщиков, М. Е. Шаповалов // Вопр. рыболовства. – 2022. – Т. 23, № 4. – С. 97–112.

## References

1. Kurenkov I. I. Towards a biology of Far Eastern freshwater shrimps. *Trudy Amurskoi ikhtiologicheskoi ekspeditsii 1945–1949 gg.* [Proceedings of the Amur ichthyological expedition 1945–1949]. Moscow, 1950, vol. 1, pp. 379–390 (in Russian).
2. Oh C.-W., Suh H.-L., Park K.-Y., Ma C.-W., Lim H.-S. Growth and reproductive biology of the freshwater shrimp *Exopalaemon modestus* (Decapoda: Palaemonidae) in a lake of Korea. *Journal of Crustacean Biology*, 2002, vol. 22, no. 2, pp. 357–366. [https://doi.org/10.1651/0278-0372\(2002\)022\[0357:GARBOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1651/0278-0372(2002)022[0357:GARBOT]2.0.CO;2)
3. Guo Z. L., Wang X. Q., Zhang J. I. On the genus *Exopalaemon* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in Guangdong province, Southern China. *Crustaceana*, 2005, vol. 78, no. 7, pp. 839–850. <https://doi.org/10.1163/156854005774445537>
4. Koshelev W. N., Kolpakov N. W. Species composition and distribution of fish and shrimps in the Lower Amur River channel. *Izvestiya Tikhookeanskogo nauchno-issledovatel'skogo rybkhozyaistvennogo tsentra* [News of the Pacific Research Fisheries Center], 2020, vol. 200, iss. 2, pp. 292–307 (in Russian).



5. Khmeleva N. N., Kulesh V. F., Alekhnovich A. V., Giginyak Yu. G. *Ecology of freshwater shrimps*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 1997. 254 p. (in Russian).
6. De Grave S., Mann J. The first record of *Exopalaemon modestus* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) in Kazakhstan. *Crustaceana*, 2012, vol. 85, no. 12–13, pp. 1665–1667. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003144>
7. Temreshev I. I., Kozhbaeva P. A., Esenbekova G. E., Esenova G. Zh., Slivinskij G. G. Distribution of freshwater shrimps (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in water bodies of southern Kazakhstan and the possibility of their use as bioindicators of the state of aquatic ecosystems. *Izvestiya NAN Respubliki Kazakhstan. Seriya biologicheskaya i meditsinskaya* [News of the NAS of the Republic of Kazakhstan. Biological and medical series], 2017, vol. 2, no. 320, pp. 215–223 (in Russian).
8. Emmett R. L., Hinton S. A., Logan D. J., McCabe G. T. Introduction of a siberian freshwater shrimp to western North America. *Biological Invasions*, 2002, vol. 4, no. 4, pp. 447–450. <https://doi.org/10.1023/A:1023641915417>
9. Haskell C. A., Baxter R. D., Tiffan K. F. Range expansion of an exotic siberian prawn to the lower Snake River. *Northwest Science*, 2006, vol. 80, no. 4, pp. 311–316.
10. Zeug S., O’Leary G., Sommer T., Harrell B. Introduced palaemonid shrimp invades the Yolo Bypass floodplain. *IEP Newsletter*, 2002, vol. 15, no. 1, pp. 13–15.
11. Erhardt J. M., Tiffan K. F. Ecology of nonnative Siberian prawn (*Palaemon modestus*) in the lower Snake River, Washington. *Aquatic Ecology*, 2016, vol. 50, no. 4, pp. 607–611. <https://doi.org/10.1007/s10452-016-9581-4>
12. Tiffan K. F., Hurst W. R. Feeding ecology of non-native siberian prawns, *Palaemon modestus* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae), in the lower Snake River, Washington, USA. *Crustaceana*, 2016, vol. 89, no. 6–7, pp. 721–736. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003553>
13. Brown T., Hieb K. Status of the Siberian prawn, *Exopalaemon modestus*, in the San Francisco estuary. *San Francisco Estuary and Watershed Science*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 1–13. <https://doi.org/10.15447/sfews.2014v12iss1art4>
14. Kulesh V. F. *Cultivation biology of commercial freshwater shrimp and river crayfish species in warm waters*. Moscow, Nowoe zhananie Publ., 2012. 328 p. (in Russian).
15. Kulesh V. F. Peculiarities of the life cycle of freshwater shrimps with abbreviated larval development. *Hydrobiological Journal*, 2020, vol. 56, no. 4, pp. 43–59. <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v56.i4.40>
16. Mantel S. K., Dudgeon D. Reproduction and sexual dimorphism of the palaemonid shrimp *Macrobrachium hainanense* in Hong Kong streams. *Journal of Crustacean Biology*, 2005, vol. 25, no. 3, pp. 450–459. <https://doi.org/10.1651/c-2541>
17. Mashiko K. Diversified egg and clutch sizes among local populations of the fresh-water prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan). *Journal of Crustacean Biology*, 1990, vol. 10, no. 2, pp. 306–314. <https://doi.org/10.2307/1548489>
18. Pandian T. J., Balasundaram C. Moulting and spawning cycles in *Macrobrachium nobili* (Henderson and Mathai). *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 1982, vol. 5, no. 1, pp. 21–30. <https://doi.org/10.1080/01651269.1982.10553451>
19. Anger K., Moreira G. S. Morphometrie and reproductive traits of tropical caridean shrimps. *Journal of Crustacean Biology*, 1998, vol. 18, no. 4, pp. 823–838. <https://doi.org/10.2307/1549156>
20. Oh C. W., Park K. Y. Comparative study on reproductive effort and spawning frequency of the two palaemonid prawns (*Exopalaemon modestus* and *Palaemon granieri*) with different habitats. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, vol. 3, no. 3–4, pp. 180–187.
21. Mashiko K. Evidence of differentiation between the estuarine and upper freshwater population inhabiting the same water system in the long-armed prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan). *Zoological Magazine*, 1983, vol. 92, no. 2, pp. 180–185.
22. Barabanshchikov E. I., Shapowalov M. E. Results of trawl surveys in Lake Khanka in 2018 and 2020. *Voprosy rybolovstva* [Question fisheries], 2022, vol. 23, no. 4, pp. 97–112 (in Russian).

### Інфармацыя аб аўтарах

Кўлеш Віктор Федаровіч – д-р біол. навук, прафесар. Беларускі ўніверсітэт імя Максіма Танка (ул. Советская, 18, 220030, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: victor\_kulesh@tut.by

Гігіняк Юры Грыгор’евіч – канд. біол. навук, вяд. науч. супрацоўнік. Научно-практычны цэнтр НАН Беларусі па біярэсурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: antarctida\_2010@mail.ru

### Information about the authors

Victor F. Kulesh – D. Sc. (Biol.), Professor. Maxim Tank Belarusian State Pedagogical University (27, Sovetskaja Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: victor\_kulesh@tut.by

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

ISSN 1029-8940 (Print)  
 ISSN 2524-230X (Online)  
 УДК 577.29  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-298-308>

Поступила в редакцию 11.03.2024  
 Received 11.03.2024

**А. М. Шишлова-Соколовская, О. Ю. Урбанович**

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

### **CRISPR/Cas9-ОПОСРЕДОВАННЫЙ НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНА *PDS NICOTIANA TABACUM L.***

**Аннотация.** Система CRISPR/Cas9 является одним из эффективных инструментов для редактирования геномов растений. С помощью этой системы нами получены трансформанты *Nicotiana tabacum* с различным фенотипом, несущие в своем геноме мутационные события инсерционно-делеционного типа в гене *PDS*, кодирующем фермент 15-цис-фитоендесатуразу. Эндогенный ген табака *NtPDS* был выбран в качестве мишени, так как внесение мутаций в его нуклеотидную последовательность позволяет легко визуализировать признаки. Тетрааллельный нокаут гена *NtPDS* приводил к полному альбинизму растений. Трансформанты-альбиносы отличались более медленным ростом, карликовостью и были нежизнеспособны при культивировании *in vitro*. Мутанты с пестролистностью в культуре *in vitro* образовывали корни и не отличались от контрольных растений по размеру листьев. Анализ нуклеотидной последовательности протоспейсера гена мишени *NtPDS* был выполнен на случайной выборке, включавшей 21 трансгенное растение поколения T<sub>0</sub> с различным фенотипом – от полностью альбиносного до дикого типа. Результаты секвенирования показали, что все трансформанты с видимыми фенотипическими проявлениями несут мутантные последовательности в гене *NtPDS* с частотой 51,0–80,0 %, при этом эффективность направленного мутагенеза составила 33,33 %. У трансформантов с фенотипом дикого типа не обнаружено мутированных последовательностей в мишени.

**Ключевые слова:** система CRISPR/Cas9, гидовая РНК, PAM, *pRGEB31*, *NtPDS*, *Nicotiana tabacum*

**Для цитирования:** Шишлова-Соколовская, А. М. CRISPR/Cas9-опосредованный направленный мутагенез гена *PDS Nicotiana tabacum L.* / А. М. Шишлова-Соколовская, О. Ю. Урбанович // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 298–308. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-298-308>

**Anastasia M. Shishlova-Sokolovskaya, Oksana Yu. Urbanovich**

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

### **CRISPR/Cas9-MEDIATED SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF THE *PDS* GENE OF *NICOTIANA TABACUM L.***

**Abstract.** CRISPR/Cas9 system is one of the effective tools for editing plant genomes. Using the CRISPR/Cas9 system, we have obtained different-type *Nicotiana tabacum* transformants carrying in their genome the mutational events of insertion-deletion type in the *PDS* gene, encoding 15-cis-phytoene desaturase enzyme. The endogenous tobacco *NtPDS* gene was chosen as a target, since introducing mutations into its nucleotide sequence leads to appearing easily visualized characters. The tetra-allelic knockout of the *NtPDS* gene led to complete albinism in plants. Albino transformants were characterized by a slower growth, dwarfism, and were not viable when cultivated *in vitro*. Mutants with variegated leaves in the *in vitro* culture formed roots and did not differ from the control in leaf size. A nucleotide sequence of the protospacer of the target *NtPDS* gene was analyzed on a random sample, including 21 transgenic plants of the T<sub>0</sub> generation with different phenotypes – from completely albino to wild type. Sequencing results showed that all transformants with visible phenotypic manifestations carried mutant sequences in the *NtPDS* gene with a frequency of 51.0–80.0 %, while the efficiency of site-directed mutagenesis was 33.33 %. In transformants of a wild-type phenotype, no mutated sequences were detected in the target gene.

**Keywords:** CRISPR/Cas9 system, guide RNA, PAM, *pRGEB31*, *NtPDS*, *Nicotiana tabacum*

**For citation:** Shishlova-Sokolovskaya A. M., Urbanovich O. Yu. CRISPR/Cas9-mediated site-directed mutagenesis of the *PDS* gene of *Nicotiana tabacum L.* *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya biyolagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 298–308 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-298-308>

**Введение.** Технология редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9 – относительно простой, но эффективный и высокоспецифичный инструмент, с помощью которого в определенные участки растительного генома можно вносить изменения, такие как инсерции, делеции, за-

мены нуклеотидов [1]. В результате может происходить нокаут генов, изменение их аллельного состава и уровня экспрессии. На сегодняшний день данная технология применяется для редактирования генома более 30 видов растений, включая такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как рис, соя, пшеница, кукуруза и картофель [2].

Эффективность данной технологии определяется рядом параметров: способом доставки генетического материала в растительную клетку, вариантом нуклеазы (Cas9 или ортологи), кодонным составом гена Cas9, регуляторными элементами (промотором, терминатором) гена Cas9 и гидовой РНК, структурой гидовой РНК. В примененной для редактирования различных геномов технологии CRISPR/Cas9 была использована одна объединенная направляющая РНК, содержащая последовательность из 20 п. о. (спейсер), комплементарную мишени (протоспейсеру) в геноме, и последовательность из 70 п. о. для образования комплекса Cas9 и геномной ДНК. При этом протоспейсерная последовательность должна содержать мотив 5'-NGG-3' (PAM), расположенный на 3'-конце мишени, для связывания белка Cas9 с ДНК и дальнейшего ее расщепления. Нуклеаза Cas9 содержит два каталитических домена: RuvC и C-концевой HNH. Каждый домен расщепляет одну из цепей ДНК, в результате чего образуются двухцепочечные разрывы ДНК на 3 п. о. выше мотива PAM [3, 4]. В эукариотических клетках репарацию двухцепочечных разрывов обеспечивают два основных механизма – NHEJ (nonhomologous end joining – негомологичное соединение концов) и HDR (homology directed repair – репарация на основе гомологичной рекомбинации) [5]. При репарации по типу NHEJ в месте разрыва могут происходить инсерции или делеции небольшой длины – до нескольких десятков пар нуклеотидов. Если место разрыва приходится на кодирующую область гена, возможен сдвиг рамки считывания, приводящий к его нокауту. Данный механизм действует на протяжении всего клеточного цикла и обладает высокой способностью к репарации, так как не требует шаблона репарации (сестринской хроматиды или гомолога) или интенсивного синтеза ДНК. NHEJ восстанавливает большинство типов поломок на порядок быстрее, чем HDR. В основном благодаря данному механизму происходит восстановление целостности нуклеотидной последовательности, нарушенной системой CRISPR/Cas9 [6–8]. При этом могут возникать индуцированные мутации различного типа, приводящие к изменению фенотипа отредактированного растения.

Цель исследования – определить, какие мутационные события имели место в гене *NtPDS* при геномном редактировании табака с помощью системы CRISPR/Cas9, и оценить их фенотипическое проявление.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлся табак *Nicotiana tabacum* сорта *Petit Havana* линии *SRI*, предметом исследования – ген *PDS* (Gene ID:107816873, updated on 13-Dec-2019) *N. tabacum*. Ген *NtPDS* кодирует фермент 15-цис-фитоендесатуразу. Изменения в работе данного фермента приводят к нарушению биосинтеза хлорофилла, каротиноидов и гиббереллинов, в результате чего у растений проявляется фенотип альбинизма и карликовости [9, 10].

**Создание трансгенных/отредактированных растений табака.** Для получения трансгенных растений табака нами использована система стабильной трансформации на основе Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*. При создании векторной генетической конструкции выбрана высокоспецифичная gRNA5 (гидовая РНК) длиной 20 п. о., комплементарная протоспейсеру, находящемуся на 5-м экзоне гена *NtPDS* (3 085–3 105 п. о.). Разработанная последовательность gRNA5 клонирована по сайтам эндонуклеазы рестрикции *BsaI* в бинарный вектор *pRGEB31*. Полученную генетическую конструкцию *pRGEB31 + gRNA5-pds*, содержащую ген нуклеазы Cas9 и gRNA5, вводили в штаммы *A. tumefaciens* LBA4404 и EHA105 методом трехродительского скрещивания [11]. Жидкую культуру *A. tumefaciens* штаммов EHA105, LBA4404 культивировали в темноте в течение 24 ч при температуре 24 °С в 20 мл среды LB с добавлением антибиотиков канамицина и рифампицина в концентрациях 50 и 100 мг/л соответственно. С помощью полученной агробактериальной суспензии осуществляли инфицирование эксплантов. В качестве эксплантов использовали листья 3–4-недельных растений табака, выращенных в асептических условиях. В наших экспериментах для стабильной интеграции Т-ДНК использовано три способа *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

**Культивация на агаризованной среде.** Предварительно нарезанные растительные экспланты размером (0,3–0,5) × (0,3–0,5) см выкладывали на чашки Петри со средой СИМ (соли и витамины по Мурасиге-Скуга), 0,2 мг/л БАП (6-бензиламинопурин), 1 мг/л НУК (альфа-нафтилуксусная кислота), 30 г/л сахарозы, pH = 5,8) и агробактериальным газоном и культивировали в течение 24–48 ч в темноте при температуре 25 °С.

**Культивация в жидкой среде.** Листовые диски размером (0,3–0,5) × (0,3–0,5) см нарезали в присутствии агробактериальной суспензии и выдерживали 40 мин, а затем выкладывали на агаризованную среду СИМ и культивировали в течение 24–48 ч в темноте при температуре 25 °С.

**Вакуумная инфльтрация.** Экспланты с агробактериальной суспензией помещали в стерильную колбу Бюензена, из которой откачивался воздух до «эффекта кипения». Через 15–20 мин давление повышали до атмосферного, после чего экспланты культивировали на неселективной агаризованной среде СИМ до 48 ч в темноте при температуре 25 °С.

По завершении этапов трансформации экспланты переносили на среду СИМ с добавлением тиментина (250 мг/л) и гиргромацина (10 мг/л) и культивировали при 24/18 °С, 16/8-часовом фотопериоде и освещенности порядка 2 000–3 000 лк.

Дальнейшую клеточную дедифференциацию и непрямой морфогенез в культуре *in vitro* инициировали на агаризованных средах СИМ (МС соли и витамины, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК, 30 г/л сахарозы, 250 мг/л тиментина, pH = 5,8) и RIM (МС соли и витамины, 0,05 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), 30 г/л сахарозы, 250 мг/л тиментина, pH = 5,8) с селективным агентом гиргромацином в концентрации 10 мг/л. Сформировавшиеся регенеранты переносили на безгормональную среду T-med (1/2 МС соли и витамины, 10 г/л сахарозы, 250 мг/л тиментина, pH = 5,8).

**Молекулярно-генетический анализ.** Геномную ДНК трансгенных растений табака поколения T<sub>0</sub>, отобранных на селективной среде, и растений дикого типа выделяли с использованием набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Для анализа событий направленного сайт-специфического мутагенеза применяли методы ПЦР-анализа и секвенирования по Сэнгеру. При этом использовали праймеры, разработанные и апробированные *in silico* в программах SnapGene Viewer 6.0, Unipro UGENE 41.0, и базу данных NCBI (табл. 1).

Таблица 1. Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов, использованных для анализа трансгенных растений табака поколения T<sub>0</sub>

Table 1. Sequence and annealing temperature of synthetic oligonucleotides used for analyzing transgenic tobacco plants of the T<sub>0</sub> generation

Олигонуклеотиды	Последовательность синтетических олигонуклеотидов, 5' → 3'	Температура отжига, °С
PDS-SEQ-F2	ttttacctgtcctgttggtgcatttctca	62
PDS-SEQ-R2	aattaacagataaaaaagataggcaaggc	57
35S-F	tcaacaagggtaatatccggaacctcctcgga	66
35S-R	agtccccctgttctctccaaatgaaatgaac	56
Cas9-F	gccgacaagaagtacagcatcgccctggaca	69
Cas9-R	tcgcctcccagctgagacaggtcgatccgtgtc	71
U3-F	agcttaaggaatctttaacatacgaacagat	59

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл. В смесь входили следующие реагенты: 100 нг ДНК, 2,5 мкл 10× буфера с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Thermo Fisher Scientific, США), 2,5 мкл 10 мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (Thermo Fisher Scientific), 2 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific), 2,5 мкл 4 пМ каждого из праймеров, 0,2 мкл 5 ед. Taq ДНК-полимеразы («Праймтех», Беларусь), 10,7 мкл H<sub>2</sub>O. Амплификацию проводили в амплификаторе BioRad с использованием следующей программы: денатурация – 94 °С, 4 мин; затем 35 циклов – 94 °С, 30 с, температура отжига праймеров (согласно табл. 1) – 45 с, 72 °С – 1 мин; ренатурация – 72 °С, 7 мин. Продукт реакции разделяли методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с бромистым этидием. Фрагмент ПЦР визуализировали с помощью системы Bio-Rad Gel Doc 2000.



Секвенирование по Сэнгеру выполнено на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США) с помощью набора реагентов BrilliantDye™ Terminator (v.3.1) Cycle Sequencing Kit (NimaGen, ЕС) согласно протоколу изготовителя и праймеров, представленных в табл. 1. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы SnapGene Viewer 6.0, базы данных NCBI и онлайн-инструмента анализа данных ICE CRISPR Analysis Tool.

**Результаты и их обсуждение.** Табак (*N. tabacum*) является удобным модельным объектом для многих научных исследований, включая генетическую трансформацию [12]. Эндогенный ген табака *NtPDS* был выбран в качестве мишени, так как внесение мутаций в его нуклеотидную последовательность приводит к появлению легко визуализируемых признаков, таких как альбинизм и карликовость [13, 14]. На основе эталонной последовательности генома *N. tabacum* (NCBI ID: 425) и выбранного гена-мишени *NtPDS* с помощью онлайн-ресурсов для системы CRISPR/Cas9 нами разработана высокоспецифичная гидовая РНК (gRNA5) [11]. При ее выборе учитывали происхождение *N. tabacum*. Данный вид представляет собой аллотетраплоид ( $2n = 4 \times = 48$ ), возникший в результате гибридизации предковых видов *N. sylvestris* ( $2n = 24$ ; материнский донорский геном S, ID: 13135) и *N. tomentosiformis* ( $2n = 24$ ; отцовский донорский геном T, ID: 12239) [15]. Размер генома табака достаточно большой – ~4,5 Гб, с высоким содержанием повторяющихся элементов (>70 %). Оба субгенома тетраплоидного табака очень похожи на геномы предков, так как вид сформировался относительно недавно – менее 0,2 млн лет назад [16]. Чтобы избежать гомеологии мишени, произведен анализ нуклеотидных последовательностей предковых родительских геномов табака *N. tomentosiformis* и *N. sylvestris*, который показал полную комплементарность выбранной спейсерной последовательности генам, кодирующим фермент 15-цис-фитоендесатуразу *N. tomentosiformis* (Gene ID: 104107035, updated on 27-Oct-2021) и *N. sylvestris* (Gene ID: 104248773, updated on 2-Jun-2019), и наличие последовательности PAM на 3'-конце протоспейсера.

Разработанная gRNA5 комплементарна протоспейсеру 5-го экзона гена *NtPDS* в положении 3 085–3 105 п. о. К 3'-концу протоспейсера примыкает последовательность PAM (5'-NGG-3'), необходимая для связывания и внесения разрывов в ДНК эндонуклеазой Cas9, что было показано *in silico* (рис. 1). Данная gRNA5 была использована при создании векторной конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds* [11].

С помощью векторной генетической конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds* методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации получено 68 трансгенных растений табака поколения T<sub>0</sub>, которые

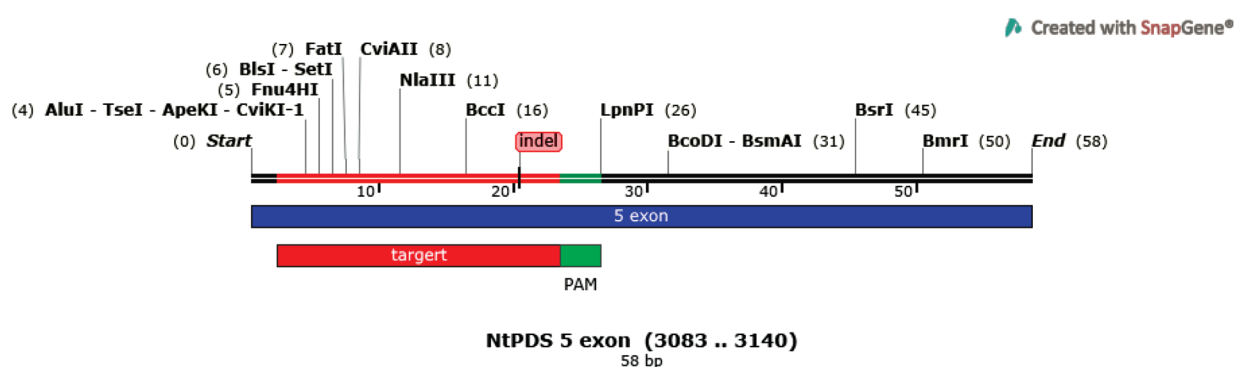


Рис. 1. Схема области 5-го экзона гена *NtPDS* *Nicotiana tabacum* сорта *Petit Havana* линии *SRI*, выбранной для направленного мутагенеза: 5 экзон – 5-й экзон гена мишени табака *NtPDS*; target – гидовая РНК, комплементарная 20 п. о. (3 085–3 105 п. о.) 5-го экзона гена *NtPDS*; PAM – мотив для специфического связывания белка Cas9 с мишенью, состоящий из 3 нуклеотидов (5'-NGG-3') и примыкающий к 3'-концевому участку гена *NtPDS*; indel – место, где эндонуклеаза Cas9 вносит разрыв в цепь ДНК целевого гена

Fig. 1. Scheme of the region of the 5th exon of the *Nicotiana tabacum* *NtPDS* gene of the *Petit Havana* variety of the *SRI* line selected for site-directed mutagenesis: 5 exon – 5th exon of the tobacco target *NtPDS* gene; target – gRNA, 20 bp (3 085–3 105 bp) complementary of the 5h exon of the *NtPDS* gene; PAM – reason for the specific binding of the Cas9 protein to the target consisting of 3 nucleotides (5'-NGG-3') and adjacent to the 3'-terminal region of the *NtPDS* gene; indel – the site where a break is introduced into the DNA chain of the target gene by Cas9 endonuclease

удалось укоренить. Способом кокультивации получено: на агаризованной среде – 19 трансформантов, в жидкой среде – 19, при вакуумной инфильтрации – 30 трансформантов.

Среди 68 трансгенных растений, способных к процессу ризогенеза, не наблюдалось исключительно альбиносного фенотипа, отражающего полную потерю функции гена *NtPDS*, так как регенеранты-альбиносы были нежизнеспособны и при длительном культивировании в культуре *in vitro* не образовывали корней и погибали. Из 68 трансгенных растений поколения  $T_0$  5 демонстрировали мозаичный фенотип, 4 из них не образовывали коробочек и были стерильными, остальные 63 растения фенотипически были идентичны дикому типу (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2. Анализ фенотипа укорененных трансформантов табака поколения  $T_0$   
Table 2. Analysis of the phenotype of rooted tobacco transformants of the  $T_0$  generation

Фенотип	Способ трансформации					
	Кокультивация на агаризованной среде		Кокультивация в жидкой среде		Вакуумная инфильтрация	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Мозаик	0	0	1	5,26	4	13,33
Дикий тип	19	100	18	94,74	26	86,67

Так как *N. tabacum* является тетраплоидом, для получения гомозиготной генетической модификации гена *PDS* (хлорофиллдефектный фенотип) необходим тетрааллельный нокаут. При неполном аллельном нокауте образуются растения с фенотипом либо дикого типа, либо мозаичным, как показано в ряде работ на других культурах [17–19].

В наших экспериментах получены трансгенные растения с тетрааллельным нокаутом гена *NtPDS*, проявляющимся в виде полного альбинизма растений. Трансформанты-альбиносы отличались более медленным ростом, карликовостью и были не способны к инициации процессов ризогенеза, что в итоге приводило к их гибели в процессе культивирования *in vitro* (рис. 2). Мутанты с пестролистностью в культуре *in vitro* образовывали корни и не отличались от контрольных листьев по размеру, но имели различную степень окраски на ранних стадиях и проявляли либо мозаичный фенотип, либо фенотип дикого типа при акклиматизации в условиях закрытого грунта. Полный альбинизм и мозаичный фенотип трансформантов могут быть связаны с нарушением путей биосинтеза каротиноидов и гибберелловой кислоты, что препятствует нормальному росту и развитию растений [20, 21].

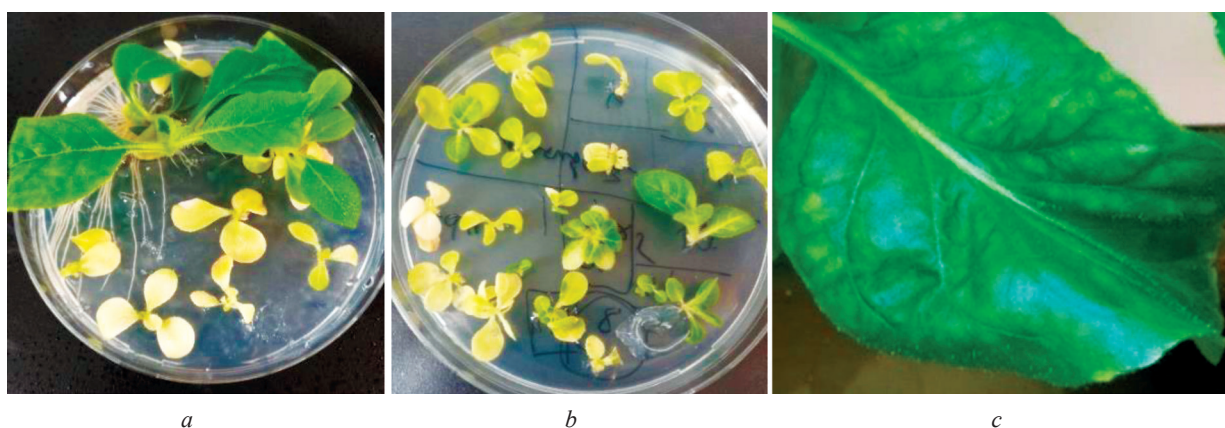


Рис. 2. Фенотипическое проявление направленного мутагенеза гена *NtPDS* с помощью системы CRISPR/Cas9 в трансгенных растениях табака поколения  $T_0$ : *a* – нежизнеспособные регенеранты-альбиносы и трансформанты дикого типа (зеленый окрас листьев) в культуре *in vitro*; *b* – трансформанты с мозаичным фенотипом и альбиносы в культуре *in vitro*; *c* – мозаичный фенотип трансгенного растения табака в культуре *in vivo*

Fig. 2. Phenotypic manifestation of the targeted mutagenesis of the *NtPDS* gene using the CRISPR/Cas9 system in the transgenic tobacco plants of the  $T_0$  generation: *a* – non-viable albino regenerants and wild-type transformants (green color of leaves) in the *in vitro* culture; *b* – transformants of mosaic phenotype and albinos in the *in vitro* culture; *c* – mosaic phenotype of the transgenic tobacco plant in the *in vivo* culture

Ген *PDS* рэгулюе біосінтэз каротиноідаў, якія з’яўляюцца важным кампанентам фотасінтэтычнага апарата. Змяненні ў функцыі гена *PDS* прыводзяць к альбіноснаму фенатыпу і аномаліям прызнакаў архітэктуры ў раслін [22]. Прадукт гена *PDS* ўдзельнічае ў рэакцыі двухступенчатай дэсатурацыі і пераўтварэнні фітоіна ў  $\zeta$ -каротін. Дэсатурацыя звязана з цепнымі акісліцельна-восстаноўчымі рэакцыямі электрон-транспартнай цепі, якія ўдзельнічаюць у вытворчасці хинонаў, пластыдаў терминальнай аксідазы і молекулярнага кісларода [23, 24].

Тэрмінальная аксідаза іграе рашаючую ролю ў працэсе фарміравання зелянога колера расліны, і парушэнні яе функцыянальнай актыўнасці прыводзяць альбо к альбінізму, альбо к пестрому фенатыпу за лічбы абесцвечвання хларапластаў ў адсутнасці каротиноідаў [25]. Следствальна, поўная абструкцыя функцыі гена *PDS*, затрагіваючая электрон-транспартную цепь і, як следствальна, вызываючая ўзваленне свабодных радыкалаў, прыводзіць к паследуючай гібелі такіх мутантных раслін. Фенатыпічныя праяўленні функцыянальнай дэструкцыі гена *PDS* прадэманстраваны і ў другіх відах раслін, такіх як арбуз, лук, яблоня, рыс, соя, картофель, банан, вінаград, мانیока [15, 16, 18, 21, 25–28].

Для падтвержэння збытій напавяленага мутагенеза гена *NtPDS*, індукіраванага сістэмай CRISPR/Cas9 ў геноме тэбакі, намі вызначана нуклеатідная паслядоўнасць гена-мішэні метадом секвеніравання па Сэнгеру. Аналіз нуклеатіднай паслядоўнасці, уключаючай абласць протаспейсэра, размерам 439 п. о. ў 5-м экзоне гена *NtPDS* выканан на слукайнай выборке, састаячай з 21 трансгеннага расліны пакалення  $T_0$  з разлічным фенатыпам – ад поўнаму альбіноснаму да дыкага тыпу. Рэзультацы секвеніравання паказалі, што ўсе трансформанты



Рис. 3. Рэзультацы аналізу нуклеатідных паслядоўнасцей гена-мішэні *NtPDS* трансформанта тэбакі с мозаічным фенатыпам

Fig. 3. Analysis results for the nucleotide sequences of the target *NtPDS* gene of the tobacco transformant of mosaic phenotype

с видимыми фенотипическими проявлениями имеют мутантные последовательности в гене *NtPDS*. У трансформантов с фенотипом дикого типа не обнаружено мутированных последовательностей в целевом гене, что может быть связано как с процессами репарации внесенных разрывов эндонуклеазой Cas9 в нити ДНК, так и с нарушением функциональной активности системы CRISPR/Cas9 в геноме этих растений.

Т а б л и ц а 3. Анализ мутационных событий 5-го экзона гена *NtPDS* в трансгенных растениях табака в поколении  $T_0$

Table 3. Analysis of the mutational events in exon 5 of the *NtPDS* gene in the transgenic tobacco plants in the  $T_0$  generation

Кол-во растений	Кол-во нокаутных растений	Эффективность мутагенеза, %	Частота мутаций, %	Тетраллельный нокаут		Неполный аллельный нокаут	
				кол-во растений	%	кол-во растений	%
21	7	33	51–80	5	23,81	2	9,52

Пр и м е ч а н и е. Эффективность мутагенеза рассчитывали по соотношению мутированных ампликонов и общего количества случайно секвенированных ампликонов.

Из общей выборки проанализированных растений направленный мутагенез обнаружен у 7, при этом 5 из них с фенотипом альбиносов были нежизнеспособными (не образовывали корней и погибли), 2 растения имели мозаичный фенотип и были высажены в закрытом грунте. У всех 7 растений были отмечены indel (инсерционно-делеционные мутации небольшого размера –



Рис. 4. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей гена-мишени *NtPDS* трансформанта табака с фенотипом альбиноса

Fig. 4. Analysis results for the nucleotide sequences of the target *NtPDS* gene of the tobacco transformant of albino phenotype



до 40 п. о.), примыкающие к области PAM. Так, нами наблюдалось три типа изменений в последовательности гена *NtPDS*: инсерция аденина в положении –3 от PAM у 6 растений, инсерция размером 3 и 2 нуклеотида в положении –3 от PAM у 1 растения (предположительно AG и AGG соответственно) и делеции различного размера (от 11 до 34 п. о.), находящиеся как на различном расстоянии от мотива PAM, так и захватывающие его (рис. 3, 4).

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что 75 % indel – это инсерции аденина в –3 положении относительно PAM (рис. 3, b), остальные 4 % являются делециями различного размера (от 17 до 34 п. о.). При этом частота мутации инсерционно-делеционного типа составляет 79 % от общего числа проанализированных геномов (рис. 3, a).

Из данных, представленных на рис. 4, видно, что 75 % indel – это инсерции аденина в –3 положении относительно PAM (рис. 4, b), остальные 5 % являются делециями различного размера (от 11 до 34 п. о.). При этом частота мутации инсерционно-делеционного типа составляет 80 % от общего числа проанализированных геномов (рис. 4, a).

Мутационные события, индуцированные системой CRISPR/Cas9, в растительном геноме приводят к сдвигу рамки считывания в последовательности гена и, как следствие, к образованию стоп-кодонов. В случае с геном *PDS* образование мутаций вызывает прекращение синтеза белка PDS и, как следствие, фотообесцвечивание [13]. В наших исследованиях частота мутаций составляла 51–80 % (табл. 3), и большая их часть (37–77 %) приходилась на инсерции. У разных видов растений частота мутаций при использовании CRISPR/Cas9 системы составляет 50–85 %. Например, у кукурузы – 70 %, у риса – 85,4, у томатов и сои – 50–60, у банана – 59 % [14, 29–31].

**Заключение.** Результаты проведенного исследования продемонстрировали, что направленный мутагенез генома табака посредством эндонуклеазы Cas9 и направляющей гидовой РНК, комплементарной гену *NtPDS*, приводит к возникновению делеций и инсерций в области протоспейсера гена-мишени. Различные мутации инсерционно-делеционного типа наблюдались в сайте 5-го экзона гена *NtPDS N. tabacum* сорта *Petit Havana* с частотой 51,0–80,0 % в поколении T<sub>0</sub>, при этом эффективность направленного мутагенеза при использовании векторной генетической конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds* составила 33,33 %. Мутации, индуцированные системой CRISPR/Cas9, оказались специфичными и высокоэффективными в редактировании генома табака, доказательством чего является их фенотипическое проявление – альбинизм и пестролистность.

#### Список использованных источников

1. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox / A. Razzaq [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 16. – Art. 4045. <https://doi.org/10.3390/ijms20164045>
2. Applications of CRISPR/Cas9 technology for modification of the plant genome / S. Deb [et al.] // *Genetica.* – 2022. – Vol. 150. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00146-2>
3. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA / H. Nishimasu [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 156, N 5. – P. 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
4. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation / M. Jinek [et al.] // *Science.* – 2014. – Vol. 343, N 6176. – Art. 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
5. Devkota, S. The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis / S. Devkota // *BMB Rep.* – 2018. – Vol. 51, N 9. – P. 437–443. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.9.187>
6. Jasin, M. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair / M. Jasin, J. E. Haber // *DNA Repair (Amst.)*. – 2016. – Vol. 44. – P. 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.001>
7. Shrivastav, M. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice / M. Shrivastav, L. P. De Haro, J. A. Nickoloff // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 134–147. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>
8. Pfeiffer, P. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations / P. Pfeiffer, W. Goedecke, G. Obe // *Mutagenesis.* – 2000. – Vol. 15, N 4. – P. 289–302. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>
9. Norris, S. R. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastiquinone as an essential component of phytoene desaturation / S. R. Norris, T. R. Barrette, D. DellaPenna // *Plant Cell.* – 1995. – Vol. 7, N 12. – P. 2139–2149. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>
10. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome / N. Kaur [et al.] // *Funct. Integr. Genomics.* – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 89–99. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>

11. Разработка CRISPR/Cas9 системы для геномного редактирования гена *NtPDS* табака (*Nicotiana tabacum*) / А. М. Шишлова-Соколовская, Е. П. Хмилевская, О. Ю. Урбанович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – 2022. – Т. 33. – С. 47–57.
12. Tso, T. C. Tobacco research and its relevance to science, medicine and industry / T. C. Tso // Beitrage zur Tabakforschung International / Contrib. Tobacco Res. – 2006. – Vol. 23, N 3. – P. 133–146. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0848>
13. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in *Cassava* / J. Odipio [et al.] // Front. Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – P. 1780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01780>
14. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9 / F. Naim [et al.] // Transgen. Res. – 2018. – Vol. 5. – P. 451–460. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0083-0>
15. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics / A. Kenton [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1993. – Vol. 240, N 2. – P. 159–169. <https://doi.org/10.1007/BF00277053>
16. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae) / I. J. Leitch [et al.] // Ann. Botany. – 2008. – Vol. 101, N 6. – P. 805–814. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm326>
17. Genome editing in *PDS* genes of tomatoes by non-selection method and of *Nicotiana benthamiana* by one single guide RNA to edit two orthologs / H. Komatsu [et al.] // Plant Biotechnol. – 2020 – Vol. 37, N 2. – P. 213–221. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0527b>
18. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system / C. Nishitani [et al.] // Nat. Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 31481. <https://doi.org/10.1038/srep31481>
19. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system / P. Wang [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2018. – Vol. 16, N 1. – P. 137–150. <https://doi.org/10.1111/pbi.12755>
20. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis / G. Qin [et al.] // Cell Res. – 2007. – Vol. 15. – P. 471–482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
21. CRISPR/Cas9-mediated editing of *phytoene desaturase* gene in onion (*Allium cepa* L.) / P. Mainkar [et al.] // Front Plant Sci. – 2023. – Vol. 14. – Art. 1226911. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1226911>
22. Cazzonelli, C. I. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants / C. I. Cazzonelli, B. J. Pogson // Trends Plant Sci. – 2010. – Vol. 15, N 5. – P. 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>
23. Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX) / E. Allison [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – 2011. – Vol. 1807, N 8. – P. 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.024>
24. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response / D. Rumeau [et al.] // Plant Cell Environ. – 2007. – Vol. 30, N 9. – P. 1041–1051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01675.x>
25. Lu, Q. S. M. An efficient and specific CRISPR-Cas9 genome editing system targeting soybean phytoene desaturase genes / Q. S. M. Lu, L. Tian // BMC Biotechnol. – 2022. – Vol. 22, N 1. – Art. 7. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00737-7>
26. Comparison of CRISPR-Cas9/Cas12a ribonucleoprotein complexes for genome editing efficiency in the rice phytoene desaturase (*OsPDS*) gene / R. Banakar [et al.] // Rice (N. Y.). – 2020. – Vol. 13, N 1. – Art. 4. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0365-z>
27. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system / S. Wang [et al.] // Plant Cell Rep. – 2015. – Vol. 34. – P. 1473–1476. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1816-7>
28. Hooghvorst, I. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon / I. Hooghvorst, C. López-Cristoffanini, S. Nogués, // Sci. Reports. – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 17077. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53710-4>
29. An agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize / S. N. Char [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2017. – Vol. 15, N 2. – P. 257–268. <https://doi.org/10.1111/pbi.12611>
30. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system / C. Brooks [et al.] // Plant Physiol. – 2014. – Vol. 166, N 3. – P. 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>
31. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 / T. B. Jacobs [et al.] // BMC Biotechnol. – 2015. – Vol. 15. – Art. 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>

## References

1. Razzaq A., Saleem F., Kanwal M., Mustafa G., Yousaf S., Imran Arshad H. M., Hameed M. K., Khan M. S., Joyia F. A. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 16, art. 4045. <https://doi.org/10.3390/ijms20164045>
2. Deb S., Choudhury A., Kharbyngar B., Satyawada R. R. Applications of CRISPR/Cas9 technology for modification of the plant genome. *Genetica*, 2022, vol. 150, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00146-2>
3. Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., Konecny S., Shehata S. I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, vol. 156, no. 5, pp. 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
4. Jinek M., Jiang F., Taylor D. W., Sternberg S. H., Kaya E., Ma E. [et al.]. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, vol. 343, N 6176, art. 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>

5. Devkota S. The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis. *BMB Reports*, 2018, vol. 51, no. 9, pp. 437–443. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.9.187>
6. Jasin M., Haber J. E. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair*, 2016, vol. 44, pp. 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.001>
7. Shrivastav M., De Haro L. P., Nickloff J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 134–1347. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>
8. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 2000, vol. 15, no. 4, pp. 289–302. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>
9. Norris S. R., Barrette T. R., DellaPenna D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell*, 1995, vol. 7, no. 12, pp. 2139–2149. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>
10. Kaur N., Alok A., Shivani Kaur N., Pandey P., Awasthi P., Tiwari S. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. *Rasthali* genome. *Functional and Integrative Genomics*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0577-5>
11. Shyshlova-Sokolovskaya A. M., Khmylevskaya E. P., Urbanovich O. Yu. Development of a CRISPR/Cas9 system for genomic editing of the NtPDS gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: collection of scientific papers], 2022, vol. 33, pp. 47–57 (in Russian).
12. Tso T. C. Tobacco research and its relevance to science, medicine and industry. *Beitrage zur Tabakforschung International / Contributions to Tobacco Research*, 2006, vol. 23, no. 3, pp. 133–146. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0824>
13. Odipio J., Alicai T., Ingelbrecht I., Nusinow D. A., Bart R., Taylor N. J. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in *Cassava*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, vol. 8, p. 1780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01780>
14. Naim F., Dugdale B., Kleidon J., Brinin A., Shand K., Waterhouse P., Dale J. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. *Transgenic Research*, 2018, vol. 5, pp. 451–460. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0083-0>
15. Kenton A., Parokony A. S., Gleba Y. Y., Bennett M. D. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993, vol. 240, no. 2, pp. 159–169. <https://doi.org/10.1007/BF00277053>
16. Leitch I. J., Hanson L., Lim K. Y., Kovarik A., Chase M. W., Clarkson J. J., Leitch A. R. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*, 2008, vol. 101, no. 6, pp. 805–814. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm326>
17. Komatsu H., Abdellatif I. M. Y., Yuan S., Ono M., Nonaka S., Ezura H., Ariizumi T., Miura K. Genome editing in *PDS* genes of tomatoes by non-selection method and of *Nicotiana benthamiana* by one single guide RNA to edit two orthologs. *Plant Biotechnology*, 2020, vol. 37, no. 2, pp. 213–221. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0527b>
18. Nishitani C., Hirai N., Komori S., Wada M., Okada K., Osakabe K., Yamamoto T., Osakabe Y. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no. 131481. <https://doi.org/10.1038/srep31481>
19. Wang P., Zhang J., Sun L., Ma Y., Xu J., Liang S. [et al.]. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, vol. 16, no. 1, pp. 137–150. <https://doi.org/10.1111/pbi.12755>
20. Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X. W., Chen Z., Qu L. J. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 2007, vol. 5, pp. 471–482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
21. Mainkar P., Manape T. K., Satheesh V., Anandhan S. CRISPR/Cas9-mediated editing of *phytoene desaturase* gene in onion (*Allium cepa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2023, vol. 14, art. 1226911. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1226911>
22. Cazzonelli C. I., Pogson B. J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 2010, vol. 15, no. 5, pp. 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>
23. Allison E., McDonald A., Ivanov G., Bode R., Maxwell D. P., Rodermeil S. R., Norman P., Hüner A. Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2011, vol. 1807, no. 8, pp. 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.024>
24. Rumeau D., Peltier G., Cournac L. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant, Cell and Environment*, 2007, vol. 30, no. 9, pp. 1041–1051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01675.x>
25. Lu Q. S. M., Tian L. An efficient and specific CRISPR-Cas9 genome editing system targeting soybean phytoene desaturase genes. *BMC Biotechnology*, 2022, vol. 22, no. 1, art. 7. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00737-7>
26. Banakar R., Schubert M., Collingwood M., Vakulskas C., Eggenberger A. L., Wang K. Comparison of CRISPR-Cas9/Cas12a ribonucleoprotein complexes for genome editing efficiency in the rice phytoene desaturase (*OsPDS*) gene. *Rice (N. Y.)*, 2020, vol. 13, no. 1, art. 4. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0365-z>
27. Wang S., Zhang S., Wang W., Xiong X., Meng F., Cui X. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Reports*, 2015, vol. 34, pp. 1473–1476. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1816-7>
28. Hooghvorst I., López-Cristoffanini C., Nogués S. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, p. 17077. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53710-4>

29. Char S. N., Neelakandan A. K., Nahampun H., Frame B., Main M., Spalding M. H. [et al.]. An agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 257–268. <https://doi.org/10.1111/pbi.12611>

30. Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z. B., Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology*, 2014, vol. 166, no. 3, pp. 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>

31. Jacobs T. B., LaFayette P. R., Schmitz R. J., Parrott W. A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnology*, 2015, vol. 15, art. 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>

### Информация об авторах

*Шышлова-Соколовская Анастасия Михайловна* – ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [s\\_anastasia78@mail.ru](mailto:s_anastasia78@mail.ru)

*Урбанович Оксана Юрьевна* – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [O.Urbanovich@igc.by](mailto:O.Urbanovich@igc.by)

### Information about the authors

*Anastasia M. Shyshlova-Sokolovskaya* – Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoryna Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [s\\_anastasia78@mail.ru](mailto:s_anastasia78@mail.ru)

*Oksana Yu. Urbanovich* – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoryna Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [O.Urbanovich@igc.by](mailto:O.Urbanovich@igc.by)



ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 634.737:581.5:581.522.4 (476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-309-320>

Поступила в редакцию 08.04.2024

Received 08.04.2024

Ж. А. Рупасова<sup>1</sup>, А. П. Яковлев<sup>1</sup>, Э. И. Коломиец<sup>2</sup>, З. М. Алешенкова<sup>3</sup>,  
Г. И. Булавко<sup>1</sup>, С. П. Зимич<sup>1</sup>, К. А. Добрянская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии»,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

## ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ УДОБРЕНИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ КОРНЕОБИТАЕМОЙ ЗОНЫ ВЫРАБОТАННОГО ТОРФЯНИКА ВЕРХОВОГО ТИПА ПОД ПОСАДКАМИ РАСТЕНИЙ КЛЮКВЫ КРУПНОПЛОДНОЙ В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

**Аннотация.** Приведены результаты сравнительного исследования в опытной культуре в географически удаленных на 250 км друг от друга Смолевичском районе Минской области и в более северном Докшицком районе Витебской области на рекультивируемых участках торфяной выработки верхового типа влияния минерального Basacot Plus 6 (N<sub>15</sub>P<sub>8</sub>K<sub>12</sub> кг/га д. в.) и отечественных биологических удобрений – азотфиксирующего и фосфатмобилизующего микробного МаКлоР в 5- и 10%-й концентрациях, а также органо-минерального Экогум-комплекса на микробиологические свойства субстрата под посадками виргинильных и генеративных растений раннеспелого *Ben Lear* и позднеспелого *Stevens* сортов клюквы крупноплодной в рамках идентичных полевых экспериментов. Установлено преимущественно ингибирующее влияние удобрений на совокупность основных характеристик микробиоты под посадками раннеспелого сорта и, напротив, стимулирующее влияние под посадками позднеспелого сорта. Под посадками раннеспелого сорта в Смолевичском районе, независимо от возраста растений, наиболее значительное ухудшение состояния микробиоценозов установлено при внесении минерального удобрения и обработках Экогум-комплексом, а в Докшицком районе – при использовании МаКлоРа, особенно в 5%-й концентрации.

Под посадками позднеспелого сорта клюквы в обоих районах исследований испытываемые удобрения, напротив, способствовали преимущественной активизации микробиологических процессов в зоне ризогенеза. При этом в Смолевичском районе, независимо от возраста растений, наибольшее стимулирующее влияние на них оказывало внесение минерального удобрения, а также использование Экогум-комплекса на виргинильных растениях и 5%-го МаКлоРа на генеративных. С продвижением к северу происходило заметное усиление позитивного воздействия испытываемых удобрений на формирование и функционирование микробиоты корнеобитаемой зоны позднеспелого сорта клюквы при наибольшей эффективности использования исключительно биологических удобрений, особенно бактериально-МаКлоР в 10%-й концентрации на виргинильных растениях и в 5%-й – на генеративных.

**Ключевые слова:** выработанный торфяник, клюква крупноплодная, сорта, минеральные и биологические удобрения, микробиоценоз, микробная масса, дыхательная и метаболическая активность

**Для цитирования:** Влияние минеральных и биологических удобрений на формирование микробиоты корнеобитаемой зоны выработанный торфяника верхового типа под посадками растений клюквы крупноплодной в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 309–320. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-309-320>

Zhanna A. Rupasova<sup>1</sup>, Alexander P. Yakovlev<sup>1</sup>, Emiliya I. Kolomiets<sup>2</sup>, Zinaida M. Aleshchenkova<sup>3</sup>,  
Galina I. Bulavko<sup>1</sup>, Svetlana P. Zimich<sup>1</sup>, Ksenia A. Dobryanskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology”, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

## EFFECT OF MINERAL AND BIOLOGICAL FERTILIZERS ON THE FORMATION OF THE MICROBIOTA OF THE ROOT ZONE OF THE DEVELOPED TOP-TYPE PEAT BOG UNDER THE PLANTING OF LARGE-FRUITED CRANBERRY PLANTS IN THE CONDITIONS OF BELARUS

**Abstract.** The results of a comparative study are presented on the influence of the mineral Basacot Plus 6 (N<sub>15</sub>P<sub>8</sub>K<sub>12</sub> kg/ha a. i.) and domestic biological fertilizers – nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing microbial MaKloR in 5 and 10 % concentrations, as well as organo-mineral Ecohum complex on the microbiological properties of the substrate under plantings of virginal and generative plants of early-ripening *Ben Lear* and late-ripening *Stevens* varieties of large-fruited cranberries in the experimental

culture in the recultivated areas of top-type peat excavation in identical experiments in the Smolevichi district of the Minsk region, geographically distant 250 km from each other and in the more northern Dokshitsy district of the Vitebsk region. It has been established that fertilizers have a predominantly inhibitory effect on the totality of the main characteristics of the microbiota under plantings of an early-ripening variety and, on the contrary, a stimulating effect under those of a late-ripening variety. Under plantings of an early ripening variety in the Smolevichi district, regardless of the age of plants, the most significant deterioration in the state of microbial cenoses was found when applying mineral fertilizer and treating with the Ecohum complex, and in the Dokshitsy district – when using MaKloR, especially in a 5 % concentration.

Under plantings of a late-ripening cranberry variety in the both areas under study, the tested fertilizers, on the contrary, contributed to the predominant activation of microbiological processes in the rhizogenesis zone. At the same time, in the Smolevichi district, regardless of the age of plants, the greatest stimulating effect on them was the application of mineral fertilizer, as well as the use of Ecohum complex on virginal plants and 5 % MaKloR on generative ones. As we moved north, there was a noticeable increase in the positive effect of the tested fertilizers on the formation and functioning of the microbiota of the root zone of the late-ripening cranberry variety, the greatest efficiency of using exclusively biological fertilizers, especially bacterial MaCloR in a 10 % concentration on virgin plants and 5 % on generative ones.

**Keywords:** exhausted peat bog, large-fruited cranberry, varieties, mineral and biological fertilizers, microbial cenosis, microbial mass, respiratory and metabolic activity

**For citation:** Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P., Kolomiets E. I., Aleshchenkova Z. M., Bulavko G. I., Zimich S. P., Dobryanskaya K. A. Effect of mineral and biological fertilizers on the formation of the microbiota of the root zone of the developed top-type peat bog under the planting of large-fruited cranberry plants in the conditions of 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. 4, pp. 309–320 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-309-320>

**Введение.** В связи с совершенствованием в Беларуси разработанной учеными Центрального ботанического сада НАН Беларуси технологии фиторекультивации выбывших из промышленной эксплуатации торфяных месторождений верхового типа путем создания локальных агроценозов интродуцированных сортов клюквы крупноплодной на основе соблюдения принципов органического земледелия особого внимания заслуживают вопросы оптимизации минерального питания данной культуры с использованием экологически безопасных биологических удобрений. Значительный интерес при этом представляет комплексное изучение влияния на основные характеристики формирующихся в корнеобитаемой зоне субстрата микробиомов под посадками виргинильных и генеративных растений модельных сортов клюквы не только традиционно применяемого при ее возделывании полного минерального удобрения, но и разработанных в УП «Белуниверсалпродукт» (Республика Беларусь) и в Институте микробиологии НАН Беларуси новых препаратов – органо-минерального (Экогум-комплекс) и бактериального (MaKloR), соответствующих биологической природе данного интродуцента. Их применение представляется особо актуальным в связи с принятым в Беларуси в 2018 г. Законом об органическом земледелии, существенно ужесточающим требования к качеству экологически чистой растениеводческой продукции, при производстве которой ограничено использование любых химических средств, в том числе минеральных удобрений. В этой связи в 2020–2021 гг. в рамках полевых экспериментов на рекультивируемых участках выбывших из промышленной эксплуатации торфяных месторождений верхового типа – «Радемье-Зеленоборское» в Смолевичском районе Минской области и «Рамжино-Журавлевское» в удаленном на 250 км к северу Докшицком районе Витебской области – в рамках однотипных полевых экспериментов с применением вышеуказанных удобрений выполнены сравнительные исследования микробиологических свойств торфяного субстрата в корнеобитаемой зоне виргинильных и генеративных растений раннеспелого сорта *Ben Lear* и позднеспелого сорта *Stevens* клюквы крупноплодной.

**Материалы и методы исследования.** Основные наблюдения выполнены в условиях сезона 2020 г., характеризовавшегося преимущественно близкими к средней климатической норме или несколько уступающими ей температурными показателями при наиболее теплом июне (в обоих районах исследований отмечено превышение их средних многолетних значений на 21–36 %). При этом данный сезон характеризовался весьма неравномерным выпадением осадков, обусловившим в Смолевичском районе дефицит влаги в пределах 5–77 % в апреле, мае, июле и сентябре при ее избытке на уровне 14–68 % в июне и августе. В Докшицком же районе практически на всем протяжении вегетационного периода наблюдался острый дефицит влаги с отставанием количества выпавших осадков от средней многолетней нормы на 28–47 %, и лишь в мае оно превысило ее на 12 %.

В обоих районах исследования выполнены в рамках однотипных полевых экспериментов с 5-вариантной схемой: **1** – контроль, без внесения удобрений; **2** – припосадочное (в мае) луночное внесение минерального удобрения Basacot Plus 6 ( $N_{15}P_8K_{12}$  кг/га д. в.) из расчета 1,5 г под растение; **3** – некорневая обработка вегетирующих растений раствором удобрения Экогум-комплекс в концентрации 15 мл на 3 л воды из расчета 75 мл на растение; **4** – припосадочное (в мае) луночное внесение 5%-го раствора препарата МаКлоР из расчета 0,2 л под растение; **5** – припосадочное (в мае) луночное внесение 10%-го раствора препарата МаКлоР из расчета 0,2 л под растение. Повторность опытов трехкратная, в каждом варианте высажено по 15 растений каждого сорта клюквы крупноплодной.

Исследование микробиологических свойств торфяного субстрата в полевых экспериментах осуществляли трижды за сезон. Определение массы активно функционирующих микроорганизмов в торфяном субстрате проводили с использованием физиологического метода [1] в трехкратной биологической повторности. Данные статистически обработаны с помощью программы Excel.

**Результаты и их обсуждение.** По нашим наблюдениям, запасы активно функционирующей микробной массы в корнеобитаемой зоне выработанного торфяника соответствовали значениям, свойственным слаборазвитому микробоценозу, поскольку исходная величина данного показателя варьировалась в рамках эксперимента в диапазоне 283–489 мкг С/г торфа, что было вполне сопоставимо с результатами, полученными нами ранее под посадками вересковых [2]. При этом выделение углекислого газа из торфяного субстрата, обеспечиваемое корнями опытных растений и почвенными микроорганизмами (за счет трансформации органического вещества), варьировалось в рамках эксперимента в диапазоне 25–45 мкг  $CO_2$ /г торфа в сутки.

Интегральным показателем активности микробоценоза считается метаболический коэффициент ( $qCO_2$ ), представляющий собой соотношение интенсивности дыхания почвы и микробной массы. Как правило, определение последней проводят в лабораторных условиях с использованием биохимических или кинетических методов, что предполагает предварительное получение коэффициентов пересчета. Поскольку данные методы трудно сопоставимы между собой, для упрощения и стандартизации процедуры определения метаболического коэффициента вместо величины микробной массы предложено использовать скорость субстрат-индуцированного дыхания [3]. В этом случае значение метаболического коэффициента рассчитывают как отношение скоростей выделения  $CO_2$  из небогатенного торфа ( $V_{\text{basal}}$ ) и торфа, в который внесен избыток доступного дыхательного субстрата ( $V_{\text{SIR}}$ ), в частности глюкозы ( $qCO_2 = V_{\text{basal}}/V_{\text{SIR}}$ ). Данный способ расчета существенно упрощает процедуру определения данного показателя и позволяет проводить сравнение результатов, полученных разными авторами. К примеру, для микробоценозов болот таежной зоны он обычно варьировался в интервале 0,01–0,1 [4], тогда как в нашем эксперименте в Смоленском районе его значения также не превышали 0,09–0,11, а в Докшицком районе оказались еще ниже – 0,05–0,08, что свидетельствовало о весьма слабой микробиологической активности торфяного субстрата в обоих районах исследований.

В период наблюдений, как и в наших более ранних аналогичных исследованиях с другим представителем вересковых – голубикой высокорослой [5], в опытах с клюквой крупноплодной на фоне испытываемых агроприемов выявлены весьма значительные различия количественных показателей основных характеристик микробоценозов корнеобитаемой зоны торфяного субстрата в зависимости от комплекса биотических и абиотических факторов. Они нашли отражение в разной ширине диапазонов варьирования внутрисезонных изменений исследуемых показателей в рамках экспериментов, представление о величине которых, независимо от ориентации, можно составить на основании табл. 1. Нетрудно убедиться, что наименее выразительными оказались данные различия по численности микроорганизмов, тогда как наибольшими – по дыхательной и метаболической активности, что косвенно свидетельствовало о разной степени влияния испытываемых агроприемов на обозначенные характеристики микробиоты – менее значительной в первом случае и более значительной во втором. Вместе с тем выявленные при этом межвариантные различия исследуемых показателей убедительно свидетельствовали об индивидуальном характере влияния испытываемых агроприемов на жизнедеятельность микробиоты остаточного слоя торфяной залежи.

Таблица 1. Диапазоны внутрисезонных изменений относительно контроля основных характеристик микробиомов корнеобитаемой зоны торфяного субстрата в вариантах опытов с использованием удобрений под посадками клюквы крупноплодной в районах исследований, %

Table 1. Ranges of intraseasonal changes with respect to the control in the main characteristics of the microbiomes of the root zone of the peat substrate in the variants of experiments using fertilizers under plantings of large-fruited cranberries in the study areas, %

Вариант опыта	Сорт <i>Ben Lear</i>			Сорт <i>Stevens</i>		
	С <sub>биом</sub> , мкг/г торфа	Дыхание, мкг CO <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэфф.	С <sub>биом</sub> , мкг/г торфа	Дыхание, мкг CO <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэфф.
<b>Смолевичский район</b>						
<i>Виргинильные растения</i>						
2	1–15	21–137	12–157	1–6	35–89	25–44
3	4–26	18–102	33–87	10–21	3–70	33–88
4	8–13	10–59	10–64	17–22	2–27	5–200
5	10–71	41–119	37–39	2–11	24–73	10–33
<i>Генеративные растения</i>						
2	1–2	13–144	12–129	20–28	3–21	12–100
3	14–58	41–129	33–36	14–22	32–80	14–56
4	10–23	16–82	6–60	21–23	20–144	7–100
5	3–4	11–56	6–46	8–31	9–16	20–33
<b>Докшицкий район</b>						
<i>Виргинильные растения</i>						
2	2–44	56–162	59–175	1–3	8–21	13–33
3	7–23	46–148	56–167	24–54	46–83	50–155
4	1–8	52–189	56–167	26–131	47–60	33–63
5	2–28	55–215	63–216	19–36	46–130	16–33
<i>Генеративные растения</i>						
2	Не определяли			4–38	26–42	36–47
3				1–45	37–173	53–150
4				8–14	48–126	44–100
5				1–8	7–8	11–13

Наиболее объективное представление о степени данного влияния на протяжении вегетационного периода можно составить на основе сопоставления относительных различий исследуемых показателей с контролем в вариантах полевого опыта, в результате которого выявлена весьма неоднозначная картина данных различий (табл. 2, 3). При этом в Смолевичском районе в весенний период, для которого обычно характерна наибольшая активность микробиоценозов, в корнеобитаемой зоне виргинильных растений раннеспелого и позднеспелого сортов клюквы во всех вариантах опыта с применением удобрений наблюдалось отставание от контроля величины микробной массы (на 20–44 и 15–26 % соответственно), наименьшее при внесении минерального удобрения, наибольшее в первом случае при использовании Экогум-комплекса и 10%-го МаКлоРа, а во втором – при применении 5%-й концентрации МаКлоРа.

Как видим, наименее выраженное ингибирующее воздействие на численность активно функционирующих микроорганизмов под обоими таксонами клюквы в начале сезона оказывало минеральное удобрение. На наш взгляд, показанное снижение массы микроорганизмов в субстрате относительно контроля в весенний период года, скорее всего, связано с усилением конкуренции между культивируемыми растениями и микробиоценозами за элементы минерального питания. Очевидно, темпы переработки органического вещества торфа и высвобождения из него питательных элементов в это время уступали скорости их потребления организмами, что приводило к снижению микробной массы в корнеобитаемом слое субстрата за счет сокращения численности менее конкурентоспособных видов. Вместе с тем отставание от контроля вариантов опыта с использованием удобрений по интенсивности выделения из субстрата углекислого газа, определяемой темпами окисления органических веществ в процессе дыхания эдафобионтов, оказалось



Таблица 2. Относительные различия с контролем основных характеристик микробиоты корнеобитаемого слоя торфяного субстрата под посадками растений клюквы крупноплодной в вариантах полевого опыта с использованием удобрений в Смолевичском районе в зависимости от времени года, %

Table 2. Relative differences with the control of the main characteristics of the microbiota of the root layer of the peat substrate under plantings of cranberry plants in the variants of the field experiment using fertilizers in the Smolevichi district depending on the time of year, %

Вариант опыта	Май			Июль			Сентябрь		
	С <sub>био</sub> <sup>м</sup> мкг/г торфа	Дыхание, мкг СО <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэф.	С <sub>био</sub> <sup>м</sup> мкг/г торфа	Дыхание, мкг СО <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэф.	С <sub>био</sub> <sup>м</sup> мкг/г торфа	Дыхание, мкг СО <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэф.
<b>Виргинильные растения</b>									
<i>Сорт Ben Lear</i>									
2	-20,0	-28,2	-11,1	-20,7	-7,5	-30,0	-8,6	-14,3	-5,3
3	-44,2	-25,7	<b>+33,3</b>	-29,8	-18,3	-20,0	-	-21,7	-21,1
4	-21,3	-15,0	<b>+11,1</b>	-15,1	-49,0	<b>+10,0</b>	-	-5,4	-5,3
5	-41,6	-17,0	<b>+44,4</b>	-	-	-20,0	<b>+21,3</b>	-32,0	-42,1
<i>Сорт Stevens</i>									
2	-14,5	<b>+5,2</b>	<b>+20,0</b>	-8,0	<b>+18,5</b>	<b>+80,0</b>	-	<b>+5,1</b>	-
3	-24,5	-7,4	<b>+20,0</b>	-	-5,5	<b>+60,0</b>	<b>+10,2</b>	<b>+25,4</b>	<b>+15,4</b>
4	-25,8	-10,6	<b>+10,0</b>	-	-31,9	-	-17,4	-4,9	<b>+15,4</b>
5	-24,0	<u>-16,8</u>	-	-10,9	-13,8	<b>+80,0</b>	-6,0	-10,6	-7,7
<b>Генеративные растения</b>									
<i>Сорт Ben Lear</i>									
2	-	-30,8	-30,0	-8,8	-6,1	-	<b>+16,6</b>	-	-12,5
3	-29,6	-23,5	<b>+10,0</b>	-	-	-6,3	<b>+11,2</b>	-28,1	-37,5
4	-	-	-	-5,0	-	-	-5,3	-	<b>+6,3</b>
5	-11,5	-	<b>+10,0</b>	-16,6	-14,7	-	<b>+4,7</b>	-4,6	-6,3
<i>Сорт Stevens</i>									
2	<b>+22,1</b>	<b>+7,8</b>	-27,3	-13,4	-	<b>+14,3</b>	-37,3	-	<b>+63,6</b>
3	-5,1	-	-18,2	-	-6,9	-	-13,4	-10,9	<b>+9,1</b>
4	-	-16,2	-36,4	<b>+8,9</b>	<b>+10,3</b>	-	-	<b>+25,1</b>	<b>+36,4</b>
5	<b>+10,1</b>	<b>+23,7</b>	-9,1	-10,5	-22,8	-14,3	-29,1	-	<b>+45,5</b>

Примечание. Здесь и в табл. 3 прочерк означает отсутствие статистически значимых по *t*-критерию Стьюдента различий с контролем при  $p < 0,05$ .

также более выразительным под сортом *Ben lear*, нежели под сортом *Stevens*, при минимальном его проявлении в первом случае при внесении обеих концентраций МаКлоРа и максимальном – при обработках.

Применение Экогум-комплекса и внесение минерального удобрения на посадках позднеспелого сорта обеспечило даже незначительное позитивное влияние на дыхательную активность микробиома, тогда как применение 10 %-го МаКлоРа, напротив, обусловило наиболее выраженное ее подавление.

Заметим, что из-за выявленных различий в степени влияния испытываемых агроприемов на интенсивность дыхания и величину микробной массы микробоценозов, соотношением которых определяется его метаболическая активность, значения соответствующего коэффициента в весенний период года под посадками виргинильных растений обоих таксонов клюквы в Смолевичском районе почти во всех вариантах опыта с использованием удобрений превышали контрольные на 11–44 % под раннеспелым сортом и на 10–20 % под позднеспелым, что следует рассматривать как позитивный результат, наиболее выраженный при применении Экогум-комплекса, а также 10%-го МаКлоРа в первом случае и минерального удобрения во втором.

В середине лета для большинства вариантов опыта с использованием удобрений, особенно биологических, показано заметное нивелирование различий с контролем по запасам микробной массы, особенно под позднеспелым сортом, при сохранении преимущественного отставания от него по данному признаку на фоне неоднозначных тенденций в изменении дыхательной

Таблица 3. Относительные различия с контролем основных характеристик микробиоты корнеобитаемого слоя торфяного субстрата под посадками растений клюквы крупноплодной в вариантах полевого опыта с использованием удобрений в Докшицком районе в зависимости от времени года, %

Table 3. Relative differences with the control of the main characteristics of the microbiota of the root layer of the peat substrate under plantings of cranberry plants in the variants of the field experiment using fertilizers in the Dokshitsky district, depending on the time of year, %

Вариант опыта	Май			Июль			Сентябрь		
	С <sub>биом</sub> <sup>*</sup> мкг/г торфа	Дыхание, мкг CO <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэф.	С <sub>биом</sub> <sup>*</sup> мкг/г торфа	Дыхание, мкг CO <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэф.	С <sub>биом</sub> <sup>*</sup> мкг/г торфа	Дыхание, мкг CO <sub>2</sub> /г торфа в сутки	Метаб. коэф.
<b>Виргинильные растения</b>									
<i>Сорт Ben Lear</i>									
2	–	+4,5	–	+8,2	+29,7	+22,2	+13,3	–13,8	–22,2
3	+19,6	–11,3	–25,0	+20,3	–	–11,1	+8,0	–15,5	–22,2
4	+7,1	–25,1	–25,0	+17,1	–	–11,1	–7,9	–25,8	–22,2
5	–	–21,3	–25,0	+8,8	+17,8	+5,5	–	–20,6	–22,2
<i>Сорт Stevens</i>									
2	–15,4	–5,9	+14,3	–	–58,7	–59,1	–37,3	–	+50,0
3	–	+43,3	+28,6	–8,2	–5,0	+4,5	–13,4	+14,6	+33,3
4	–18,9	+47,8	+71,4	+19,9	–14,1	–27,3	–	–	–
5	–11,0	+38,8	+57,1	+42,5	+15,7	–18,2	–29,1	+41,6	+100,0
<b>Генеративные растения</b>									
<i>Сорт Stevens</i>									
2	–27,0	+54,5	+120,0	+4,9	–26,6	–28,6	–	+25,1	+33,3
3	–16,3	–10,0	+20,0	+17,1	–18,1	–28,6	+14,6	+18,8	+16,7
4	–17,9	+44,4	+80,0	+29,1	+8,7	–14,3	–19,8	+31,2	+66,7
5	–	+54,5	+60,0	+29,6	–44,9	–57,1	–13,2	+17,1	+33,3

и метаболической активности микробиоценоза по сравнению с весенним периодом. Вместе с тем на данном этапе отмечено заметное усиление влияния генотипа растений на степень проявления различий опытных вариантов с контролем по основным характеристикам микробиоты, поддерживавшееся до конца вегетационного периода. При этом для зоны ризогенеза раннеспелого сорта доминирующей тенденцией в формировании микробиоценоза на фоне испытываемых удобрений являлось отставание исследуемых показателей от контроля, тогда как для таковой позднеспелого в ряде случаев получен положительный эффект, преимущественно в отношении метаболической активности (см. табл. 2). На наш взгляд, это могло быть обусловлено разным количественным и качественным составом корневых выделений у модельных сортов клюквы, оказывавших вкуче с используемыми удобрениями неоднозначное влияние на исследуемые показатели.

Что касается генеративных растений клюквы, вступивших в фазу плодоношения, то, как и у более молодых экспериментальных аналогов, в первой половине вегетационного периода установлено доминирование отставания опытных вариантов от контроля по исследуемым характеристикам микробиоты, особенно под посадками раннеспелого сорта, хотя и проявившееся в меньшей степени, чем в опыте с виргинильными растениями. При этом в ряде вариантов расхождения с контролем оказались столь незначительными, что даже не нашли статистического подтверждения (см. табл. 2). Вторая же половина сезона отмечена существенным усилением относительно контроля влияния генотипа опытных растений на характер изменений исследуемых показателей в вариантах с использованием удобрений. При этом под посадками раннеспелого сорта установлено увеличение численности микроорганизмов на 5–17 % на фоне отставания от него на 13–37 % под посадками позднеспелого, причем в обоих случаях наибольшие контрасты выявлены при внесении минерального удобрения. Противоположная картина наблюдалась при анализе подобных изменений метаболической активности микробиоты относительно контроля – преимущественное снижение на 6–38 % под сортом *Ben Lear* и увеличение на 9–64 % под сортом *Stevens* (табл. 2). Нетрудно убедиться, что основные характеристики микробиоценозов, сформиро-

вавшихся под посадками сортов клюквы крупноплодной в Смолевичском районе, в значительной степени определялись генотипом и возрастом опытных растений.

Проведение аналогичного эксперимента в удаленном на расстояние 250 км к северу Докшицком районе позволило определить также влияние географического фактора на изменение исследуемых характеристик микробиомов при использовании удобрений. Как следует из табл. 3, здесь также отчетливо проявились изменения направленности и степени возрастных и генотипических различий относительно контроля, но при этом, в отличие от Смолевичского района, в большинстве случаев они свидетельствовали о существенном улучшении всех показателей на фоне испытываемых агроприемов, особенно под посадками генеративных растений клюквы. Заметим, что в начале сезона применение удобрений под виргинильными растениями раннеспелого сорта способствовало увеличению по сравнению с контролем запасов микробной массы на 7–20 % (при использовании Экогум-комплекса и 5%-го МаКлоРа). При этом в большинстве вариантов опыта отмечено снижение на 11–25 % дыхательной и метаболической активности при противоположной картине данных изменений под посадками позднеспелого сорта с преимущественным уменьшением численности микроорганизмов на 11–19 %, сопровождаемым усилением дыхательного процесса на 44–55 %, а метаболической активности – на 14–71 %.

В середине вегетационного периода в корнеобитаемой зоне субстрата в вариантах опыта с использованием удобрений наблюдалась противоположная установленной в весенний период картина изменения данных показателей, характеризовавшаяся превышением на 8–20 % контрольного уровня запасов микробной массы под сортом *Ben Lear*, тогда как под сортом *Stevens* подобное превышение на 20–43 % выявлено лишь при внесении МаКлоРа при неоднозначных изменениях в обоих случаях дыхательной и метаболической активности и наиболее выраженных контрастах на фоне внесения минерального удобрения. В конце вегетационного периода в основных чертах сохранилась установленная в начале сезона картина различий тестируемых вариантов опыта с контролем по основным характеристикам микробиоты под виргинильными растениями клюквы, но при иной степени проявления данных различий (табл. 3). Несмотря на то что в Докшицком районе аналогичные исследования с генеративными растениями клюквы проводили лишь на примере позднеспелого сорта *Stevens*, тем не менее они показали определенное сходство профилирующих тенденций в направленности изменений исследуемых показателей под действием испытываемых удобрений с установленными в эксперименте с виргинильными растениями.

Вместе с тем из-за показанного выше значительного влияния комплекса биотических и абиотических факторов на процессы формирования микробиомов под посадками опытных растений в районах исследований не представлялось возможным выявить наиболее эффективные агроприемы, способствовавшие наибольшему улучшению их основных характеристик. С целью определения самого результативного агроприема в каждом варианте опыта с применением удобрений проведено суммирование установленных различий данных характеристик с контролем (с учетом их знака) в начале, середине и конце вегетационного периода (табл. 4). Как и следовало ожидать, направленность и величина отклонений от контроля совокупности основных характеристик микробиома корнеобитаемой зоны субстрата на фоне испытываемых агроприемов определялись комплексом биотических и абиотических факторов, в том числе генотипом и возрастом растений, а также географическим положением района исследований. При этом в условиях Смолевичского района под посадками виргинильных растений раннеспелого сорта клюквы на протяжении всего вегетационного периода выявлено отставание от контроля на 11–68 % данного интегрального показателя во всех вариантах опыта с использованием удобрений, наиболее значительное в июле, особенно при обработках Экогум-комплексом, и в меньшей, причем сходной, степени – при внесении 5 %-го МаКлоРа и минерального удобрения. Заметим, что в последнем случае установлено аналогичное ингибирующее воздействие на совокупность исследуемых показателей в самом начале сезона, тогда как в его конце подобный эффект обнаружен при внесении бактериального удобрения в 10%-й концентрации, оказавшем, напротив, наиболее щадящее, хотя и негативное влияние на характеристики микробиома в весенне-летний период (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Относительные различия с контролем совокупности основных характеристик микробиоты корнеобитаемого слоя торфяного субстрата в районах исследований под посадками растений клюквы крупноплодной в вариантах опыта с использованием удобрений в зависимости от времени года, %

Table 4. Relative differences with control of the set of main characteristics of the microbiota of the root-inhabited layer of peat substrate in the study areas under plantings of large-fruited cranberry plants in the experimental variants using fertilizers, depending on the season, %

Вариант опыта	Сорт <i>Ben Lear</i>				Сорт <i>Stevens</i>			
	Май	Июль	Сентябрь	Совокупный эффект за сезон	Май	Июль	Сентябрь	Совокупный эффект за сезон
<b>Смолевичский район</b> <i>Виргинильные растения</i>								
2	-59,3	-58,2	-28,2	-145,7	+10,7	+90,5	+5,1	+106,3
3	-36,6	-68,1	-42,8	-147,5	-11,9	+54,5	+51,0	+93,6
4	-25,2	-54,1	-10,7	-90,0	-26,4	-31,9	-6,9	-65,2
5	-14,2	-20,0	-52,8	-87,0	-40,8	+55,3	-24,3	-9,8
<i>Генеративные растения</i>								
2	-60,8	-14,9	<b>+4,1</b>	-71,6	+2,6	+0,9	+26,3	+29,8
3	-43,1	-6,3	-54,4	-103,8	-23,3	-6,9	-15,2	-45,4
4	0	-5,0	<b>+1,0</b>	-4,0	-52,6	+19,2	+61,5	+28,1
5	-1,5	-31,3	-6,2	-39,0	+24,7	-47,6	+16,4	-6,5
<b>Докшицкий район</b> <i>Виргинильные растения</i>								
2	<b>+4,5</b>	<b>+60,1</b>	-22,7	<b>+41,9</b>	-7,0	-117,8	+12,7	-112,1
3	-16,7	<b>+9,2</b>	-29,7	-37,2	+71,9	-8,7	+34,5	+97,7
4	-43,0	<b>+6,0</b>	-55,9	-92,9	+100,3	-21,5	0	+78,8
5	-46,3	<b>+32,1</b>	-42,8	-57,0	+84,9	+40,0	+112,5	+237,4
<i>Генеративные растения</i>								
2	Не определяли				+147,5	-50,3	+58,4	+155,6
3					-6,3	-29,6	+50,1	+14,2
4					+106,5	+23,5	+78,1	+208,1
5					+114,5	-72,6	+37,2	+79,1

В отличие от сорта *Ben Lear*, для корнеобитаемой зоны виргинильных растений сорта *Stevens* в ряде случаев показано, напротив, позитивное влияние агроприемов на формирующийся микробиоценоз, в частности внесения минерального удобрения – на протяжении всего вегетационного сезона, обработок Экогум-комплексом – в летне-осенний и 10%-го МаКлоРа – в летний период, на что указывало превышение контрольного уровня совокупности исследуемых показателей в этих вариантах опыта на 5–91 %, наиболее значительное при внесении минерального удобрения. В Смолевичском районе противоположное по результативности влияние испытываемых агроприемов на микробиоту зоны ризогенеза сортов клюквы с разными сроками созревания плодов выявлено также под посадками генеративных растений. Тем не менее в большинстве вариантов опыта с раннеспелым сортом нельзя не отметить ослабления негативного воздействия удобрений на совокупность исследуемых характеристик преимущественно в летне-осенний период при аналогичном установленному у более молодых экспериментальных аналогов ее отставании от контроля в начале сезона при обработках Экогум-комплексом и внесении минерального удобрения, а в его середине – при использовании 10%-го МаКлоРа. При этом под посадками позднеспелого сорта клюквы наблюдалось заметное смещение позитивного влияния испытываемых агроприемов на совокупность анализируемых характеристик микробиоты на осенний период, что подтверждалось превышением контрольного уровня на 16–62 %, наиболее значительным, как и в летний период, при использовании 5%-го МаКлоРа (табл. 4).

В аналогичном эксперименте в более северном Докшицком районе, как и в Смолевичском, для зоны ризогенеза виргинильных растений сорта *Ben Lear* также показано преобладание негативного влияния удобрений на данный показатель в начале и в конце вегетации, особенно на фоне



внесения бактериального удобрения, но, в отличие от более южного района, в летний период во всех вариантах опыта с использованием удобрений выявлен существенный позитивный эффект с превышением контрольного уровня на 6–60 %, наиболее значимый при внесении 10%-го МаКлоРа и особенно минерального удобрения (табл. 4). При этом начало и окончание вегетационного сезона, напротив, отмечены заметным ингибированием по сравнению с контролем микробиологических процессов в корнеобитаемой зоне раннеспелого сорта, наиболее значительным при использовании микробного удобрения, тогда как в зоне ризогенеза виргинильных растений сорта *Stevens* наблюдалась противоположная картина, что, впрочем, было характерно и для Смолевичского района.

Вместе с тем нельзя не отметить, что выявленные различия под посадками виргинильных растений модельных сортов в Докшицком районе проявились намного выразительнее и свидетельствовали о наибольшей активизации микробиологических процессов в начале и в конце вегетационного периода с превышением контрольных значений в большинстве вариантов опыта на 72–100 и 13–113 % соответственно и их ингибировании на 9–118 % в середине сезона. При этом независимо от времени года наиболее высокая результативность в усилении микробиологической активности в торфяном субстрате установлена при использовании Экогум-комплекса и 10 %-ного МаКлоРа, а наименьшая – при внесении минерального удобрения (табл. 4).

Довольно схожая с этой, но более выразительная картина ответной реакции микробиоты корнеобитаемой зоны позднеспелого сорта клюквы на испытываемые агроприемы наблюдалась и под посадками генеративных растений. Как и под виргинильными аналогами, наибольшее проявление стимулирующего влияния удобрений на совокупность ее основных характеристик выявлено в начале и в конце вегетационного периода при доминировании отрицательного эффекта от их применения в середине сезона. Но, в отличие от корнеобитаемой зоны более молодых растений сорта *Stevens*, в корнеобитаемой зоне плодоносящих растений наиболее результативным в плане активизации в ней микробиологических процессов на всех этапах сезонного цикла их развития оказалось внесение не 10%-го, а 5%-го МаКлоРа (табл. 4).

Как видим, испытываемые удобрения оказывали весьма значительное, причем в большинстве случаев неоднозначное влияние на формирование микробиоты корнеобитаемой зоны торфяного субстрата под посадками разновозрастных растений модельных сортов клюквы крупноплодной. Различия темпов активизации или ингибирования микробиологических процессов в зоне ризогенеза разновозрастных растений модельных сортов клюквы на основных этапах сезонного развития в районах исследований проявились в разной направленности и степени значимых различий с контролем по каждому обозначенному признаку, а также по их совокупности (см. табл. 2–4). Однако из-за существенных расхождений в результативности испытываемых удобрений в плане активизации микробиологических процессов на протяжении вегетационного периода не представлялось возможным выявление в рамках эксперимента наиболее эффективного агроприема, который мог бы свидетельствовать о наиболее значительном за весь сезон позитивном влиянии на данные процессы. В этих целях мы сочли целесообразным в каждом варианте опыта с использованием удобрений ориентироваться на величину совокупного эффекта, полученного путем суммирования частных эффектов в начале, середине и конце вегетационного периода (с учетом их знака) и интегрировавшего в себе индивидуальные особенности ответной реакции соответствующих микробсообществ на комплексное воздействие биотических и абиотических факторов.

Как следует из табл. 4, независимо от географического положения района исследований и возраста растений раннеспелого сорта испытываемые удобрения оказали в основном ингибирующее влияние на совокупность основных характеристик микробсообщества корнеобитаемой зоны, наиболее значительное под посадками виргинильных растений при внесении минерального удобрения и обработках Экогум-комплексом, оказавших также максимальное отрицательное воздействие на состояние микробиоты под генеративными растениями данного сорта. Как и под посадками его более молодых экспериментальных аналогов, значительный негативный эффект в этом плане наблюдался на фоне внесения минерального удобрения при наиболее щадящем, хотя и отрицательном, воздействии микробного удобрения, особенно в 5%-й концентрации, обусловившем практически полное отсутствие различий с контролем по совокупности исследуемых характеристик.

Ингибирующее воздействие биологических удобрений на состояние микробиоты под посадками сорта *Ben Lear* за вегетационный период в целом проявилось и в условиях более северного Докшицкого района, в котором, в отличие от Смолевичского, наибольший отрицательный эффект обеспечивало внесение бактериального удобрения, особенно в 5%-й концентрации, тогда как наименее значительный эффект установлен при обработках растений Экогум-комплексом. Заметим, что впервые в данном эксперименте получен довольно выразительный положительный результат на фоне внесения минерального удобрения.

Совершенно иной характер результирующего за сезон воздействия испытываемых агроприемов на функционирование микробиомов в обоих районах исследований выявлен под посадками позднеспелого сорта клюквы. Так, в Смолевичском районе, независимо от возраста растений, стимулирующее влияние на протекающие в них процессы оказывало внесение минерального удобрения, наиболее значительное под виргинильными растениями при схожей с ним результативности обработок Экогум-комплексом, тогда как под генеративными растениями сходным по эффективности с внесением минерального удобрения было использование 5%-го МаКлоРа. При этом в обоих случаях, несмотря на негативное в целом влияние на развитие микробоценозов под посадками сорта *Stevens* 10 %-го МаКлоРа, его применение оказалось самым щадящим в ряду используемых в эксперименте биологических удобрений.

Вместе с тем позитивное влияние испытываемых агроприемов на функционирование микробиомов корнеобитаемой зоны позднеспелого сорта клюквы наиболее выразительно проявилось в условиях Докшицкого района. Как следует из табл. 4, исключительно эффективным в этом плане оказалось использование всех биологических удобрений, особенно бактериального МаКлоР в 10%-й концентрации на виргинильных растениях и в 5%-й – на генеративных. Что касается обработок Экогум-комплексом, то наиболее результативными они были при применении на виргинильных растениях сорта *Stevens*. Однако представляется труднообъяснимым впервые полученный в данном эксперименте весьма существенный отрицательный эффект от внесения минерального удобрения в плане интегрального воздействия на параметры жизнедеятельности микробоценоза под виргинильными растениями позднеспелого сорта на фоне весьма значительного позитивного влияния на них данного агроприема под генеративными растениями.

Нетрудно убедиться, что формирование и функционирование микробиомов корнеобитаемой зоны торфяного субстрата под экспериментальными посадками разновозрастных растений модельных сортов клюквы крупноплодной при использовании удобрений разной химической природы в значительной степени определялись комплексным воздействием широкого спектра биотических и абиотических факторов. Вместе с тем, как показали результаты настоящих исследований, независимо от возраста растений наиболее значительное влияние на восприимчивость микробоценозов к изменению агрохимического фона оказывала сортовая принадлежность опытных растений. Так, если под посадками раннеспелого сорта испытываемые удобрения производили преимущественно ингибирующее воздействие на формирование и функционирование микробиоты, то под посадками позднеспелого сорта – напротив, стимулирующее.

С аналогичным проявлением доминирующей роли видо- и сортоспецифичности культиваров при оценке влияния агроприемов с использованием минеральных и бактериальных удобрений на функционирование микробоценозов корнеобитаемой зоны торфяного субстрата на севере республики мы сталкивались также в более ранних исследованиях с растениями узколистной голубики и разновозрастных сортов высокорослой голубики [5]. На наш взгляд, выявленные в данном эксперименте весьма существенные различия основных характеристик микробиомов в зависимости от генотипа культиваров позволяют предположить их обусловленность разным химическим составом корневых выделений сортов клюквы с разными сроками созревания плодов, имеющих, очевидно, первостепенное значение для функционирования сообществ микроорганизмов в зоне ризогенеза.

**Заключение.** В результате изучения в опытной культуре в географически удаленных на 250 км друг от друга Смолевичском районе Минской области и в более северном Докшицком районе Витебской области на рекультивируемых участках торфяной выработки верхового типа влияния минерального Basacot Plus 6 ( $N_{15}P_8K_{12}$  кг/га д. в.) и отечественных биологических удобрений –

азотфиксирующего и фосфатмобилизующего микробного МаКлоР в 5- и 10%-й концентрациях, а также органо-минерального Экогум-комплекса на микробиоту корнеобитаемой зоны торфяного субстрата под посадками растений клюквы крупноплодной – раннеспелого *Ben Lear* и позднеспелого *Stevens* сортов в рамках идентичных полевых экспериментов установлено, что наиболее значительное влияние на ее состояние и функционирование при варьировании агрохимического фона в рамках эксперимента оказывает сортовая принадлежность опытных растений. Это подтверждалось преимущественно ингибирующим влиянием испытываемых удобрений на совокупность основных характеристик микробиоты под посадками раннеспелого сорта и, напротив, стимулирующим – под посадками позднеспелого сорта. Выявленные в эксперименте весьма существенные различия основных микробиологических показателей в зависимости от генотипа культиваров позволили предположить их обусловленность разным химическим составом корневых выделений сортов клюквы с разными сроками созревания плодов, имевших, очевидно, первостепенное значение для функционирования сообществ микроорганизмов в зоне ризогенеза.

При этом в Смолевичском районе наиболее значительное ухудшение состояния микробоценозов под посадками виргинильных растений сорта *Ben Lear* показано при внесении минерального удобрения и обработках Экогум-комплексом, оказавших также максимальное отрицательное воздействие на него, и под посадками генеративных растений. Наряду с этим весьма выразительный негативный эффект в этом плане получен на фоне внесения минерального удобрения при наиболее щадящем, хотя и отрицательном, воздействии микробного удобрения, особенно в 5%-й концентрации. Установлено, что в условиях более северного Докшицкого района наибольший отрицательный эффект в формировании микробоценозов под раннеспелым сортом обеспечивало внесение МаКлоРа, особенно в 5%-й концентрации, тогда как наименьший установлен при обработках растений Экогум-комплексом.

Показано, что в обоих районах исследований под посадками позднеспелого сорта клюквы испытываемые агроприемы, напротив, способствовали преимущественной активизации микробиологических процессов в зоне ризогенеза. При этом в Смолевичском районе, независимо от возраста растений, стимулирующее влияние на них оказывало внесение минерального удобрения, наиболее значительное под виргинильными растениями при схожей с ним результативности обработок Экогум-комплексом, тогда как под генеративными растениями близким по эффективности внесению минерального удобрения было использование 5%-го МаКлоРа. Независимо от возраста растений, несмотря на негативное в целом влияние на развитие микробоценозов 10%-го МаКлоРа, его применение оказалось самым щадящим из используемых в данном эксперименте биологических удобрений.

Установлено, что с продвижением к северу происходило заметное усиление позитивного воздействия испытываемых удобрений на формирование и функционирование микробиомов корнеобитаемой зоны позднеспелого сорта клюквы, что подтверждалось более высокими значениями их основных характеристик в Докшицком районе, нежели в Смолевичском. При этом самым эффективным в этом плане оказалось использование в эксперименте исключительно биологических удобрений, особенно бактериального МаКлоР в 10%-й концентрации на виргинильных растениях и в 5%-й – на генеративных. При этом обработки растений Экогум-комплексом наиболее результативными оказались при применении на виргинильных растениях данного сорта.

#### Список использованных источников

1. Anderson, J. P. S. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils / J. P. S. Anderson, K. H. Domsch // *Soil Biol. Biochem.* – 1978. – Vol. 10, N 3. – P. 215–221. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90099-8](http://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90099-8)
2. Рупасова, Ж. А. Фиторекультивация выбывших из промышленной эксплуатации торфяных месторождений севера Беларуси на основе возделывания ягодных растений сем. Ericaceae / Ж. А. Рупасова, А. П. Яковлев. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 282 с.
3. Мирчинк, Т. Г. Современные подходы к оценке биомассы и продуктивности грибов и бактерий в почве / Т. Г. Мирчинк, Н. С. Паников // *Успехи микробиологии.* – 1985. – Т. 20. – С. 198–226.
4. Гродницкая, И. Д. Микробные сообщества и трансформация соединений углерода в болотных почвах таежной зоны / И. Д. Гродницкая, М. Ю. Трусова // *Почвоведение.* – 2009. – № 9. – С. 1099–1107.
5. Эффективность микробных удобрений при возделывании голубики на выработанных торфяниках Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]. – Минск: Беларус. навука. – 2020. – 236 с.

## References

1. Anderson J. P. S., Domsch K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1978, vol. 10, no. 3, pp. 215–221. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90099-8](http://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90099-8)
2. Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P. *Phytorecultivation of peat deposits in the north of Belarus that have been abandoned from industrial exploitation based on the cultivation of berry plants of the family. Ericaceae*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 282 p. (in Russian).
3. Mirchink T. G., Panikov N. S. Modern approaches to assessing the biomass and productivity of fungi and bacteria in the soil. *Uspekhi mikrobiologii* [Advances in microbiology], 1985, vol. 20, pp. 198–226 (in Russian).
4. Grodnitskaya I. D., Trusova M. Yu. Microbial communities and transformation of carbon compounds in swamp soils of the taiga zone. *Pochvovedenie* [Soil science], 2009, no. 9, pp. 1099–1107 (in Russian).
5. Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P., Reshetnikov V. N., Kolomiets E. I., Aleshchenkova Z. M. *The effectiveness of microbial fertilizers in the cultivation of blueberries on the exhausted peat bogs of Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2020. 236 p. (in Russian).

## Информация об авторах

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

*Яковлев Александр Павлович* – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: A.Yakovlev@cbg.org.by

*Коломиец Эмилия Ивановна* – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, генеральный директор. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

*Алещенкова Зинаида Михайловна* – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleschenkova@mbio

*Булавко Галина Ивановна* – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bulavkog@mail.ru

*Зимич Светлана Павловна* – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: antohina\_lana@mail.ru

*Добрянская Ксения Андреевна* – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: K.dobryaskaya01@gmail.com

## Information about the authors

*Zhanna A. Rupasova* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by

*Alexander P. Yakovlev* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A.Yakovlev@cbg.org.by

*Emiliya I. Kolomiets* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, General Director. State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology” (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

*Zinaida M. Aleshchenkova* – D. Sc. (Biol.), Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleschenkova@mbio

*Galina I. Bulavko* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bulavkog@mail.ru

*Svetlana P. Zimich* – Junior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antohina\_lana@mail.ru

*Ksenia A. Dobryanskaya* – Junior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: K.dobryaskaya01@gmail.com



ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 502:628.4.047  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-321-328>

Поступила в редакцию 20.04.2024  
Received 20.04.2024

Е. А. Танкевич<sup>1</sup>, А. Н. Никитин<sup>2</sup>, Ю. К. Симончик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

## ВЛИЯНИЕ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ НА БИОДОСТУПНОСТЬ <sup>137</sup>CS И ЕГО ПОСТУПЛЕНИЕ ИЗ ТОРФЯНИСТО-ГЛЕЕВОЙ ПОЧВЫ В БИОМАССУ *AVENA SATIVA* L.

**Аннотация.** Изучено влияние основных физиологических групп почвенных микроорганизмов на переход <sup>137</sup>Cs из торфянисто-глеевой почвы, загрязненной в результате аварии на Чернобыльской АЭС, в биомассу овса посевного (*Avena sativa* L.), а также воздействие данных групп микроорганизмов на содержание в исследуемой почве стабильных изотопов К, Са, Sr, Cs в биодоступных формах.

Установлено, что внесение в торфянисто-глеевую почву фосфатмобилизирующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов не изменяет уровень накопления <sup>137</sup>Cs в надземной биомассе овса посевного. При этом обе группы почвенных микроорганизмов существенно (на 44–84 %) повышают содержание радиоактивного и стабильного изотопов цезия в водорастворимой форме в почве. На этом фоне внесение фосфатмобилизирующих бактерий в торфянисто-глеевую почву снижает на 30,5 % накопление радионуклида в корнях растения. Отсутствие усиления накопления <sup>137</sup>Cs овсом при увеличении содержания радионуклида в водорастворимой форме объясняется прежде всего повышением содержания биодоступного К в торфянисто-глеевой почве при внесении в нее фосфатмобилизирующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов.

**Ключевые слова:** почвенные ассоциации микроорганизмов, радиоактивное загрязнение, зона отчуждения Чернобыльской АЭС, биологическая доступность техногенных радионуклидов, цезий-137, макроэлементы, микроэлементы

**Для цитирования:** Танкевич, Е. А. Влияние основных физиологических групп микроорганизмов на биодоступность <sup>137</sup>Cs и его поступление из торфянисто-глеевой почвы в биомассу *Avena sativa* L. / Е. А. Танкевич, А. Н. Никитин, Ю. К. Симончик // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 321–328. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-321-328>

Elena A. Tankevich<sup>1</sup>, Aleksander N. Nikitin<sup>2</sup>, Yuliya K. Simonchik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

## INFLUENCE OF THE MAIN PHYSIOLOGICAL GROUPS OF MICROORGANISMS ON THE BIOAVAILABILITY OF <sup>137</sup>CS AND ITS ENTRY FROM PEATY-GLEY SOIL INTO THE BIOMASS OF *AVENA SATIVA* L.

**Abstract.** The influence of the main physiological groups of soil microorganisms on transfer of <sup>137</sup>Cs from the peaty-gley soil into the biomass of oats (*Avena sativa* L.) are analyzed in the article. The soil contaminated with radioisotopes after the Chernobyl nuclear power plant accident. The impact of these groups of microorganisms on the content of stable isotopes K, Ca, Sr, Cs in bioavailable forms in the soil are presented as well.

It was established that the introduction of phosphate-mobilizing bacteria and spore-forming ammonifiers into peaty-gley soil did not change the level of <sup>137</sup>Cs accumulation in the aboveground biomass of oats. However, both groups of soil microorganisms significantly (by 44–84 %) increase the content of radioactive and stable isotopes of cesium in water-soluble form in the soil. Against this background, the introduction of phosphate-mobilizing bacteria into peaty-gley soil reduces the accumulation of radionuclide in the roots of the plant by 30.5 %. The absence of increased accumulation of <sup>137</sup>Cs in oats with increase in the content of radionuclide in water-soluble form is explained primarily by an increase in the content of K in bioavailable form in peaty-gley soil when phosphate-mobilizing bacteria and spore-forming ammonifiers are added to it.

**Keywords:** associations of soil microorganisms, radioactive contamination, exclusion zone of Chernobyl NPP, bioavailability of technogenic radionuclides, caesium-137, macroelements, microelements

**For citation:** Tankevich E. A., Nikitin A. N., Simonchik Yu. K. Influence of the main physiological groups of microorganisms on the bioavailability of <sup>137</sup>Cs and its entry from peaty-gley soil into the biomass of *Avena sativa* L. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 321–328 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-321-328>

**Введение.** Важную роль в биологическом круговороте веществ играют микроорганизмы, являющиеся связующими звеньями между многими элементами экосистем. Микроорганизмы выполняют функцию редуцентов экосистем, минерализуя органические вещества и тем самым превращая их в доступные для продуцентов соединения. В почвах различных типов содержатся сообщества микроорганизмов с характерным видовым составом, разнообразием и количественным соотношением различных физиологических групп [1].

Миграция радионуклидов происходит в экосистеме благодаря совокупности разных процессов, которые приводят к изменению форм нахождения радионуклидов в почве или к их пространственному перемещению под действием биотических и абиотических факторов [2].

В настоящее время значительная доля  $^{137}\text{Cs}$  чернобыльского происхождения в почвах находится в связанном состоянии. Прочность этих связей определяется такими показателями, как физико-химический состав выпадений радионуклидов, агрохимическое состояние почвы, процентное содержание гумуса в почве, количество вносимых минеральных удобрений, активность почвенной микробиоты. И если три первых показателя стабильны для земель, находящихся в сельскохозяйственном производстве и любые изменения в их структуре требуют больших капитальных затрат, то последние два фактора дают возможность потенциально уменьшить поступление радионуклидов в растительные организмы и снизить экономические затраты [3].

Цель работы – изучить влияние основных физиологических групп почвенных микроорганизмов на изменение физико-химических форм  $^{137}\text{Cs}$  и содержание в биодоступных формах стабильных изотопов K, Ca, Sr, Cs в торфянисто-глеевой почве зоны отчуждения Чернобыльской АЭС (в условиях вегетационного эксперимента), а также на переход радиоизотопов  $^{137}\text{Cs}$  из почвы в биомассу овса посевного (*Avena sativa* L.).

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлись основные физиологические группы почвенных микроорганизмов, оказывающие существенное влияние на биологическую доступность техногенных радионуклидов и содержание макро- и микроэлементов в торфянисто-глеевой почве с высоким уровнем радиоактивного загрязнения.

Торфянисто-глеевую почву отбирали на глубине 10–15 см в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС – в бывшем н. п. Масаны (Гомельская область, Беларусь, Полесский государственный радиационно-экологический заповедник).

Почву предварительно очищали от надземных частей растений и просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм, тщательно перемешивали, затем помещали в специальные пластиковые сосуды объемом 1 л для выращивания растений. Сосуды каждого варианта опыта размещали на отдельных пластиковых поддонах. Агрохимический анализ использованной в эксперименте почвы выполняли согласно ГОСТам [4–9].

Для вегетационного эксперимента были отобраны наиболее значимые физиологические группы почвенных микроорганизмов, оказавшие существенное влияние на изменение физико-химических форм техногенных радионуклидов по результатам предыдущего эксперимента [10].

В результате посевов на элективные агаризованные питательные среды согласно общепринятым в микробиологии методам [11, 12] получены следующие накопительные культуры: 1) фосфатмобилизующие микроорганизмы; 2) спорообразующие аммонификаторы.

В экспериментальных работах использовали семена овса посевного производства ОАО «МинскСортСемОвощ». Все работы по отбору посадочного материала, подготовке к посадке семян проводили согласно [13].

В каждый горшок высевали по 15 семян выбранной культуры на глубину 1 см, затем в почву при закладке эксперимента и через 15 дней после высева растений вносили по 220 мл суспензий каждой из исследуемых физиологических групп почвенных микроорганизмов (содержащих приблизительно  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл). Оценку титра микроорганизмов выполняли согласно [14]. В контрольные образцы вносили по 220 мл мясо-пептонного бульона (МПБ) без инокуляции микроорганизмов.

Суспензии почвенных микроорганизмов готовили на основе МПБ. Для этого в МПБ из чашек Петри стерильной микробиологической петлей вносили инокулянт, представляющий одну из выделенных групп почвенных микроорганизмов.

Полученные бактериальные культуры помещали в термостат и инкубировали при температуре  $37,0 \pm 0,1$  °С в течение суток до появления визуально определяемой мутности. Перед внесением в почву мутность жидких сред доводили до стандарта ВВЛ (стандарта мутности № 0.5 по МакФарланду) – при длине волны 625 нм оптическая плотность бактериальных суспензий составляла 0,08–0,10 [14].

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ. По мере необходимости на протяжении всего эксперимента в субстраты с растениями вносили дистиллированную воду для поддержания влажности 70 % от полной влагоемкости.

Каждый из вариантов опыта выполняли в 5-кратной повторности. Продолжительность вегетационного эксперимента составила 30 сут.

Вегетационный эксперимент проводили в фитокомнате с регулируемым климатом. В рабочем пространстве фитокомнаты постоянно поддерживалась температура воздуха  $24 \pm 1$  °С, влажность воздуха  $55 \pm 5$  %. Продолжительность искусственного светового дня составила 16 ч при потоке ФАР  $100 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ . Для освещения использовались светодиодные лампы ЛД-27-25W-1200-УХЛ4.

По окончании вегетационного эксперимента срезали надземные части растений. Фитомассу высушивали до абсолютно-сухого состояния, измельчали и взвешивали. Образцы помещали в сосуды емкостью 100 мл для последующих измерений на гамма-спектрометрическом комплексе CANBERRA Packard.

Образцы подземной части растений аккуратно отряхивали от почвенной смеси, корни промывали до отделения комочков почвы, высушивали до абсолютно сухого веса, а затем помещали в сосуды для последующих измерений.

Для характеристики уровня накопления  $^{137}\text{Cs}$  в образцах растений и содержания радионуклида в почве использовали величину удельной активности (УА, Бк/кг).

Для изучения влияния каждой из физиологических групп почвенных микроорганизмов на изменение биодоступных форм  $^{137}\text{Cs}$  определяли содержание водорастворимой и ионообменной форм радионуклида методом последовательной экстракции [15, 16].

Последовательная экстракция включала следующие этапы:

1. Водорастворимую форму выделяли посредством экстракции в дистиллированной воде. Образец почвы (20 г) помещали в 200 мл дистиллированной воды. Суспензию взбалтывали при комнатной температуре на протяжении 24 ч. Экстракт отделяли от почвы фильтрованием. Почву промывали 200 мл дистиллированной воды на фильтровальной бумаге. Жидкую фазу помещали в сосуд емкостью 100 мл для измерения на  $\gamma$ -спектрометре и ICP-MS.

2. Ионообменную форму выделяли посредством экстракции в растворе ацетата аммония. Твердую фазу, полученную на предыдущем этапе, помещали в 200 мл 1 М раствора ацетата аммония с рН, доведенной до 7,0. Суспензию взбалтывали при комнатной температуре на протяжении 24 ч. Экстракт отделяли от почвы фильтрованием. Почву промывали 200 мл дистиллированной воды. Жидкую фазу помещали в сосуд емкостью 100 мл для измерения на  $\gamma$ -спектрометре и ICP-MS.

Измерения на гамма-спектрометрическом комплексе CANBERRA Packard с коаксиальным полупроводниковым детектором Ge(Li) расширенного энергетического диапазона проводили в соответствии с принятыми методическими рекомендациями [17]. Относительная ошибка измерения удельной активности  $^{137}\text{Cs}$  в пробах составляла от 5 до 10 %, в зависимости от активности образца. Измерение концентрации макро- и микроэлементов в каждом опытном варианте проводили в 5-кратной повторности на ICP-MS Elan-DRCe (Perkin Elmer) согласно СТБ ISO17294-1-2007 и СТБ ISO 17294-2-2007 [18, 19].

**Результаты и их обсуждение.** Удельная активность используемой торфянисто-глеевой почвы составляла  $13\,213 \pm 2\,643$  Бк/кг. Уровень рН почвы (4,8) указывает на то, что она относится к среднекислым. Количество обменного магния избыточное – 836 мг/кг, очень высокое содержание кальция – 5 198 мг/кг. Для данной почвы характерно очень высокое содержание подвижного фосфора – 267 мг/кг, очень высокое содержание обменного калия (310 мг/кг), а также суммы поглощенных оснований (35,2 ммоль/100 г).

Результаты вегетационного эксперимента показали, что спорообразующие аммонификаторы увеличили среднее значение удельной активности радионуклида в надземных органах растения

Таблица 1. Влияние почвенных микроорганизмов основных физиологических групп на накопление  $^{137}\text{Cs}$  овсом посевнымTable 1. Influence of soil microorganisms of the main physiological groups on the accumulation of  $^{137}\text{Cs}$  in oats

Вариант опыта	Удельная активность, Бк/кг	
	Подземная часть	Надземная часть
Контроль	11942,4 ± 4334,5	128,3 ± 45,3
Фосфатмобилизующие микроорганизмы	8303,8 ± 1637,7*	134,4 ± 33,8
Спорообразующие аммонификаторы	15154 ± 4924,1	170,4 ± 70,6

Примечание. \* – отличия от контроля статистически значимы при  $p < 0,05$ .

на 32,8 %, однако различия с контролем статистически недостоверны в силу высокой вариабельности данного показателя (табл. 1). Внесение в почву фосфатмобилизующих микроорганизмов снизило удельную активность  $^{137}\text{Cs}$  в надземных органах овса на 30,5 % по сравнению с контролем.

Внесение в почву спорообразующих аммонификаторов привело к повышению среднеарифметического значения удельной активности радионуклида в корневой системе овса на 26,9 % относительно контроля, однако, как и в случае с надземными органами, статистическую значимость этого изменения подтвердить не удалось.

В табл. 2 представлено влияние почвенных микроорганизмов основных физиологических групп на содержание водорастворимой и ионообменной форм  $^{137}\text{Cs}$  в торфянисто-глеевой почве.

Таблица 2. Влияние внесения почвенных микроорганизмов основных физиологических групп в торфянисто-глеевую почву на содержание в ней водорастворимой и ионообменной форм  $^{137}\text{Cs}$ Table 2. Influence of soil microorganisms of the main physiological groups on the content of water-soluble and ion-exchange forms of  $^{137}\text{Cs}$  in peat-gley soil

Вариант опыта	Содержание $^{137}\text{Cs}$ , Бк/кг	
	водорастворимой формы	ионообменной формы
Контроль	16,0 ± 4,5	100,0 ± 17,0
Фосфатмобилизующие микроорганизмы	29,4 ± 14,7*	107,5 ± 17,6
Спорообразующие аммонификаторы	25,5 ± 7,4**	166,3 ± 102,2

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4 отличия от контроля статистически значимы при  $p < 0,05$  (\*) и  $p < 0,01$  (\*\*).

Как и в эксперименте, приведенном в работе [10], внесение в почву фосфатмобилизующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов привело к значимому увеличению содержания  $^{137}\text{Cs}$  в водорастворимой форме, однако величина отклонения от контроля была в данном случае не столь значительная. Фосфатмобилизующие микроорганизмы повысили активность  $^{137}\text{Cs}$  в водорастворимой форме на 84,1 % по сравнению с контрольным вариантом, а спорообразующие аммонификаторы – на 59,9 %.

Ослабление влияния указанных физиологических групп микроорганизмов обусловлено тем, что данный эксперимент проводился не со стерильной почвой. Конкурентные взаимодействия между микроорганизмами почвы могли снизить плотность популяции фосфатмобилизующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов. Присутствие других физиологических групп микроорганизмов и активность корневой системы растений также способны компенсировать эффект от внесения в почву вышеназванных микроорганизмов.

Статистически значимых изменений содержания ионообменной формы  $^{137}\text{Cs}$  в торфянисто-глеевой почве после внесения фосфатмобилизующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов в вегетационном опыте не наблюдалось. В варианте со спорообразующими аммонификаторами прослеживалась тенденция к увеличению содержания радионуклида в ионообменной форме, однако это сопровождалось высокой вариабельностью показателя, что не позволяет сделать вывод о статистической достоверности выявленного изменения.



Содержание легкодоступного <sup>137</sup>Cs (суммы водорастворимой и ионообменной форм) в торфянисто-глеевой почве во всех вариантах опыта увеличилось: фосфатмобилизующие микроорганизмы повысили удельную активность <sup>137</sup>Cs на 18 % по сравнению с контролем, а спорообразующие аммонификаторы – на 65,4 % (рис. 1).

Наблюдаемое явление может быть следствием высвобождения в раствор <sup>137</sup>Cs, связанного в органических остатках, сосредоточенных в почве, в результате их микробиологической деструкции. Аналогичные результаты получены и в модельном эксперименте с торфянисто-глеевой почвой [10].

Таким образом, можно сделать вывод, что все исследуемые группы микроорганизмов, участвуя в разрушении органического вещества торфянисто-глеевой почвы, повышают биологическую доступность радиоактивного изотопа Cs в почве.

Содержание Ca как в водорастворимой, так и в ионообменной форме во всех опытных вариантах несколько увеличилось по сравнению с контролем (табл. 3). Достоверные различия с контролем в содержании водорастворимой формы Ca зафиксированы при внесении обоих исследуемых групп микроорганизмов.

Таблица 3. Содержание Ca и K в образцах торфянисто-глеевой почвы, мг/кг

Table 3. Concentration of Ca and K in the samples of peat-gley soil, mg/kg

Вариант опыта	Форма Ca		Форма K	
	водорастворимая	ионообменная	водорастворимая	ионообменная
Контроль	2291,6 ± 1241,6	7153,7 ± 710,6	925,3 ± 258,7	802,3 ± 122,7
Фосфатмобилизующие микроорганизмы	3364,5 ± 298,4*	7645,5 ± 752,7	1527,3 ± 168,0**	823,0 ± 89,3
Спорообразующие аммонификаторы	3259,3 ± 206,3*	7570,6 ± 461,2	1401,0 ± 599,2*	829,4 ± 51,1

На рис. 2 показано влияние исследуемых физиологических групп микроорганизмов на содержание легкодоступного (водорастворимый + ионообменный) Ca в торфянисто-глеевой почве.

Повышение содержания легкодоступного Ca было характерно для всех вариантов опыта, при этом полученные данные являлись достоверными.

Результаты анализа показали, что содержание K в водорастворимой форме увеличивается на 51–65 % после внесения в почву фосфатмобилизующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов. Содержание данного элемента в ионообменной форме является более инертным показателем в испытываемых системах и не претерпевает существенных изменений.

Содержание легкодоступного K увеличилось как при внесении фосфатмобилизующей группы микроорганизмов, так и спорообразующих аммонификаторов – на 36 и 29,1 % соответственно (рис. 3).

В табл. 4 представлены данные по содержанию стабильных изотопов Cs и Sr в торфянисто-глеевой почве после окончания эксперимента с внесением в почву фосфатмобилизующих и спорообразующих аммонификаторов.

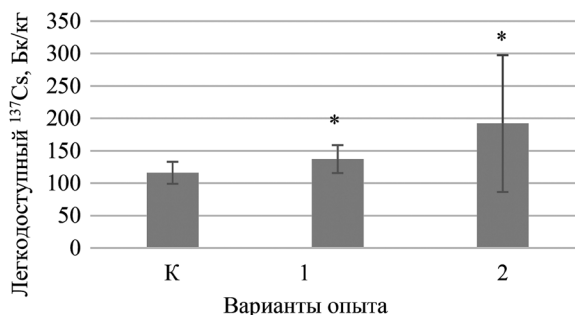


Рис. 1. Содержание легкодоступного <sup>137</sup>Cs в торфянисто-глеевой почве. Здесь и на рис. 2–5: К – контроль, 1 – фосфатмобилизующие микроорганизмы, 2 – спорообразующие аммонификаторы; планки погрешностей указывают на доверительные интервалы (α = 0,05). \* – значимые отличия от контроля (p < 0,05)

Fig. 1. Content of bioavailable <sup>137</sup>Cs in peat-gley soil. Here and in Fig. 2–5: K – control, 1 – phosphate-mobilizing microorganisms, 2 – spore-forming ammonifiers; Error bars indicate confidence intervals (α = 0.05). \* – significant differences from control (p < 0.05)

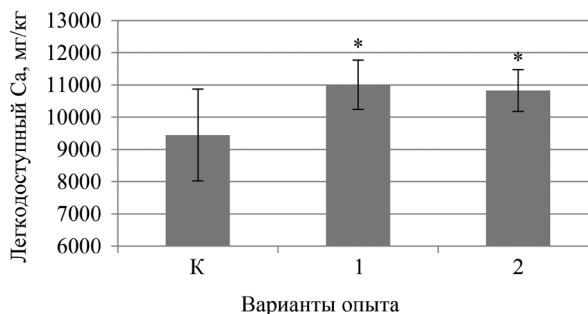


Рис. 2. Содержание легкодоступного Ca в торфянисто-глеевой почве. \* – значимые отличия от контроля (p < 0,05)

Fig. 2. Content of bioavailable Ca in peat-gley soil. \* – significant differences from control (p < 0.05)

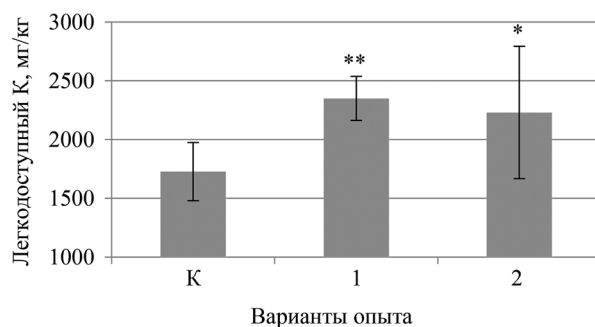


Рис. 3. Содержание легкодоступного K в торфянисто-глеевой почве.  
Значимые отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$

Fig. 3. Content of bioavailable K in peat-gley soil.  
Significant differences from control: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$

Т а б л и ц а 4. Содержание Cs и Sr в образцах торфянисто-глеевой почвы, мкг/кг

Table 4. Concentration of Cs and Sr in the samples of peat-gley soil, mkg/kg

Вариант опыта	Форма Cs		Форма Sr	
	водорастворимая	ионообменная	водорастворимая	ионообменная
Контроль	1,7 ± 0,5	45,1 ± 3,7	23,4 ± 2,9	55,5 ± 5,6
Фосфатмобилизующие микроорганизмы	3,1 ± 0,5**	41,9 ± 5,5	28,7 ± 2,4**	56,5 ± 5,3
Спорообразующие аммонификаторы	2,4 ± 0,5*	40,0 ± 1,8**	27,5 ± 1,8**	54,9 ± 2,4

Содержание Cs в водорастворимой форме увеличилось при внесении как фосфатмобилизующих микроорганизмов, так и спорообразующих аммонификаторов – на 82,7 и 43,6 % соответственно. При этом наблюдались достоверные различия по отношению к контролю.

Внесение спорообразующих аммонификаторов в почву, напротив, привело к снижению содержания Cs в ионообменной форме. Эффект снижения содержания данной формы радионуклидов при внесении фосфатмобилизующих бактерий статистически незначим.

Только при внесении в почву спорообразующих аммонификаторов наблюдалось статистически значимое уменьшение содержания легкодоступного Cs по сравнению с контролем (рис. 4).

Содержание Sr в водорастворимой форме увеличилось при воздействии как фосфатмобилизующих, так и спорообразующих аммонификаторов – на 22,2 и 17 % соответственно. Достоверные различия по сравнению с контролем отмечались во всех вариантах опыта.

При этом ионообменная форма Sr не претерпела существенных изменений при внесении в торфянисто-глеевую почву анализируемых групп микроорганизмов.

Значимое увеличение содержания легкодоступного Sr наблюдалось при внесении в почву группы фосфатмобилизующих микроорганизмов (рис. 5).

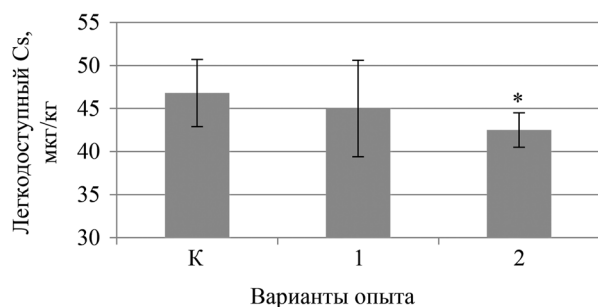


Рис. 4. Содержание легкодоступного Cs в торфянисто-глеевой почве. \* – значимые отличия от контроля ( $p < 0,05$ )

Fig. 4. Content of bioavailable Cs in peat-gley soil.  
\* – significant differences from control ( $p < 0.05$ )

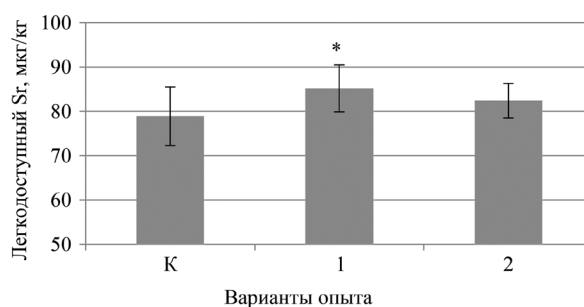


Рис. 5. Содержание легкодоступного Sr в торфянисто-глеевой почве. \* – значимые отличия от контроля ( $p < 0,05$ )

Fig. 5. Content of bioavailable Sr in peat-gley soil.  
\* – significant differences from control ( $p < 0.05$ )

**Заклучение.** В вегетационном эксперименте показано, что внесение в торфянисто-глеевую почву фосфатмобилизующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов не приводит к изменению накопления  $^{137}\text{Cs}$  в надземных частях овса посевного, хотя содержание в почве водорастворимой формы радионуклидов при этом повышается на 44–84 %. Более того, внесение фосфатмобилизующих бактерий в торфянисто-глеевую почву снижает на 30,5 % накопление радионуклида в корнях растения. Отсутствие эффекта усиления накопления  $^{137}\text{Cs}$  овсом при увеличении содержания радионуклида в водорастворимой форме объясняется прежде всего повышением содержания биодоступного калия в торфянисто-глеевой почве при внесении в нее фосфатмобилизующих бактерий и спорообразующих аммонификаторов.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке грантов на выполнение научно-исследовательских работ докторантами, аспирантами и соискателями НАН Беларуси № 2017-08-64 на 2017 г. и № 2021-26-05 на 2021 г.

**Acknowledgements.** This work was supported by grants to perform research work doctoral students, graduate students and applicants of the National Academy of Sciences of Belarus No. 2017-08-64 for 2017 and No. 2021-26-05 for 2021.

### Список использованных источников

1. Семенова, И. Н. Изучение эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов в зоне влияния горнорудного производства / И. Н. Семенова, Г. Р. Ильбулова, Я. Т. Суюндуков // *Фундам. исслед.* – 2011. – № 11-2. – С. 410–414.
2. Сахаров, В. К. Радиоэкология: учеб. пособие / В. К. Сахаров. – СПб.: Лань, 2006. – 313 с.
3. Черненко, И. В. Бактериальные азотфиксирующие препараты на почвах, подвергшихся радиоактивному загрязнению / И. В. Черненко, В. А. Николаев, Н. И. Бохан // *Агропанорама.* – 1997. – № 4. – С. 20–21.
4. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО: ГОСТ 26483-85: введ. 01.07.1986. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – 6 с.
5. Определение гидролитической кислотности по методу Каппена в модификации ЦИНАО: ГОСТ 26212-2021: введ. 01.08.2022. – М.: Рос. ин-т стандартизации, 2021. – 12 с.
6. Определение суммы поглощенных оснований по методу Каппена: ГОСТ 27821-2020: введ. 01.01.2022. – М.: Стандартинформ, 2020. – 9 с.
7. Определение обменного кальция и обменного (подвижного) магния методами ЦИНАО: ГОСТ 26487-85: введ. 01.07.1986. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – 14 с.
8. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО: ГОСТ 26207-91: введ. 01.07.1993. – М.: Изд-во стандартов, 1992. – 7 с.
9. Методы определения органического вещества: ГОСТ 26213-2021: введ. 01.08.2022. – М.: Рос. ин-т стандартизации, 2021. – 12 с.
10. Изменение биологической доступности цезия-137 в торфяной почве из зоны отчуждения Чернобыльской АЭС при развитии в ней различных физиологических групп почвенных микроорганизмов / Е. А. Танкевич [и др.] // *Весн. МДПУ імя І. П. Шамякіна.* – 2023. – № 2 (62). – С. 30–36.
11. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почв / под ред. Ю. М. Возняковской. – Л.: Всерос. науч.-исслед. ин-т с.-х. микробиологии, 1987. – 47 с.
12. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 239 с.
13. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038-84: введ. 01.07.1986. – М.: Стандартинформ, 1985. – 29 с.
14. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: метод. указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
15. *Chemical speciation in the environment* / ed. by A. M. Ure, C. M. Davidson. – 2<sup>nd</sup> ed. – Wiley-Blackwell, 2002. – 452 p.
16. Iodine-129 and caesium-137 in chernobyl contaminated soil and their chemical fractionation / X. Hou [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2003. – Vol. 308. – N 1–3. – P. 97–109. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00546-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00546-6)
17. МВИ объемной и удельной активности гамма-излучающих радионуклидов на гамма-спектрометрах с полупроводниковыми детекторами: МВИ. МН 3421-2010: введ. 28.05.10. – Минск: БелГИМ, 2010. – 35 с.
18. Качество воды. Применение масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Ч. 1. Общие требования: СТБ ISO 17294-1-2007: введ. 01.05.2008. – Минск: БелГИСС, 2008. – 32 с.
19. Качество воды. Применение масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Ч. 2. Определение 62 элементов: СТБ ISO 17294-2-2007: введ. 01.05.2008. – Минск: Госстандарт, 2007. – 21 с.

### References

1. Semenova I. N., Il'bulova G. R., Suyundukov Ya. T. Study of ecological and trophic groups of soil microorganisms in the zone of influence of mining production. *Fundamental'nye issledovaniya* [Basic research], 2011, no. 11-2, pp. 410–414 (in Russian).
2. Sakharov V. K. *Radioecology*. Sankt-Peterburg, Lan' Publ., 2006. 313 p. (in Russian).

3. Chernenok I. V., Nikolaev V. A., Bokhan N. I. Bacterial nitrogen-fixing preparations on soils exposed to radioactive contamination. *Agropanorama* [Agropanorama], 1997, no. 4, pp. 20–21 (in Russian).
4. *State Standart 26483-85. Preparation of salt extract and determination of its pH using the TsINAO method.* Moscow, Standards Publishing House, 1985. 6 p. (in Russian).
5. *State Standart 26212-2021. Determination of hydrolytic acidity using the Kappen method as modified by TsINAO.* Moscow, Russian Institute of Standardization, 2021. 12 p. (in Russian).
6. *State Standart 27821-2020. Determination of the amount of absorbed bases using the Kappen method.* Moscow, Standardinform Publ., 2020. 9 p. (in Russian).
7. *State Standart 26487-85. Determination of exchangeable calcium and exchangeable (mobile) magnesium using TsINAO methods.* Moscow, Standarts Publishing House, 1985. 14 p. (in Russian).
8. *State Standart 26207-91. Determination of mobile compounds of phosphorus and potassium using the Kirsanov method as modified by TsINAO.* Moscow, Standarts Publishing House, 1992. 7 p. (in Russian).
9. *State Standart 26213-2021. Methods for determining organic matter.* Moscow, Russian Institute of Standardization, 2021. 12 p. (in Russian).
10. Tankevich E. A., Nikitin A. N., Kontsevaya I. I., Simonchik Yu. K. Changes in the biological availability of cesium-137 in peat soil from the exclusion zone of the Chernobyl NPP during the development of different physiological groups of soil microorganisms in it. *Vestnik Mozyrskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta im. I. P. Shamyakina* [Bulletin of Mozyr State Pedagogical University named after I. P. Shamyakin], 2023, no. 2 (62), pp. 30–36 (in Russian).
11. Voznyakovskaya Yu. M. *Basic microbiological and biochemical methods of soil research.* Leningrad, All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, 1987. 47 p. (in Russian).
12. Tepper E. Z., Shil'nikova V. K., Pereverzeva G. I. *Microbiology Workshop.* Moscow, Agropromizdat Publ., 1987. 239 p. (in Russian).
13. *State Standart 12038-84. Seeds of crops. Methods for determining germination.* Moscow, Standardinform Publ., 1985. 29 p. (in Russian).
14. *Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Guidelines.* Moscow, Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Russian Ministry of Health, 2004. 91 p. (in Russian).
15. Ure A. M., Davidson C. M. *Chemical speciation in the environment. Second edition.* Wiley-Blackwell Publ., 2002. 452 p.
16. Hou X., Fogh C. L., Kucera J., Andersson K. G., Dahlgard H., Nielsen S. P. Iodine-129 and caesium-137 in chernobyl contaminated soil and their chemical fractionation. *Science of The Total Environment*, 2003, vol. 308, no. 1–3, pp. 97–109. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00546-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00546-6)
17. *MVI. MN 3421-2010. MVI of volumetric and specific activity of gamma-emitting radionuclides on gamma spectrometers with semiconductor detectors.* Minsk, Belarusian State Institute of Metrology, 2010. 35 p. (in Russian).
18. *STB ISO 17294-1-2007. Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry. Pt. 1. General requirements.* Minsk, Belarusian State Institute of Standardization and Certification, 2008. 32 p. (in Russian).
19. *STB ISO 17294-2-2007. Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry. Pt. 2. Definition of 62 elements.* Minsk, Gosstandart Publ., 2007. 21 p. (in Russian).

### Информация об авторах

Танкевич Елена Александровна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0009-0009-6443-4733>. E-mail: elena.karpova1991@mail.ru

Никитин Александр Николаевич – канд. с-х. наук, зам. директора по научной работе. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1369-0093>. E-mail: nikitinale@gmail.com

Симончик Юлия Константиновна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: simonagomel@gmail.com

### Information about the authors

Elena A. Tankevich – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0009-0009-6443-4733>. E-mail: elena.karpova1991@mail.ru

Aleksander N. Nikitin – Ph. D. (Agric.), Deputy Director for Research. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikitinale@gmail.com

Yuliya K. Simonchik – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: simonagomel@gmail.com



ISSN 1029-8940 (Print)  
 ISSN 2524-230X (Online)  
 УДК 575.174.015.3:581.9  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-329-339>

Поступила в редакцию 22.05.2024  
 Received 22.05.2024

**А. Н. Мялик, Н. В. Гудная, Т. Г. Кулагина, Д. А. Дубарь, В. В. Титок**

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## ПРИРОДООХРАННОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РЕГРЕССИВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *LOBELIA DORTMANNA* L. В БЕЛАРУСИ

**Аннотация.** В статье представлен анализ генетического разнообразия популяций *Lobelia dortmanna* L. (лобелии Дортманна), выполненный с помощью молекулярных iPBS-маркеров. Изучены все известные в Беларуси популяции из озер Белое (Лунинецкий р-н), Свитязь (Новогрудский р-н), Беянец и Бредно (Россонский р-н), расположенные в островных локалитетах вдали от юго-восточной границы ареала. Показано, что наибольшее генетическое разнообразие Нея характерно для популяции оз. Беянец (0,15), наименьшее – для популяции оз. Бредно (0,10). Для данного вида не выявлено взаимосвязи между положением популяции в пределах ареала, ее численностью, жизненностью растений и уровнем генетического разнообразия. Для белорусских популяций *Lobelia dortmanna* L. установлено преобладание межпопуляционной изменчивости (54 %) над внутривидовой (46 %), что указывает на высокий уровень их генетической дифференциации. Поток генов для популяций исследуемого вида равен 0,35, что подтверждает низкий уровень обмена генами между популяциями и согласуется с крайне низкой численностью вида на территории Беларуси, а также с изолированностью популяций как от основного фрагмента ареала вида, так и между собой. Данные кластерного анализа популяций *Lobelia dortmanna* L. показывают их разделение на две генетически разрозненные группы, географическое положение которых подтверждает их генетическую связь с фенноскандинавским и атлантикоевропейским фрагментами ареала вида в Европе.

**Ключевые слова:** охраняемые растения, водные макрофиты, молекулярные iPBS-маркеры, генетическое разнообразие популяций

**Для цитирования:** Природоохранное значение генетической структуры регрессивных популяций *Lobelia dortmanna* L. в Беларуси / А. Н. Мялик [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 329–339. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-329-339>

**Aliaksandr M. Mialik, Natallia U. Hudnaya, Tatsiana G. Kulahina, Daniil A. Dubar, Vladimir V. Titok**

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

## CONSERVATION SIGNIFICANCE OF THE GENETIC STRUCTURE OF REGRESSIVE POPULATIONS OF *LOBELIA DORTMANNA* L. IN BELARUS

**Abstract.** The article analyzes the genetic diversity of populations of *Lobelia dortmanna* L. (Dortmann's lobelia) performed using molecular iPBS markers. All known populations in Belarus from lakes Beloye (Luninetsky district), Svityaz (Novogrudsky district), Belyanets and Bredno (Rossonosky district), located in island localities far from the south-east border of the range, were studied. The research results showed that Nei's greatest genetic distance is characteristic of the Belyanets population (0.15), and the least one is characteristic of the Bredno population (0.10). For this species, no relationship has been identified between the position of the population within the range, its size, plant vitality and the level of genetic diversity. For Belarusian populations of *Lobelia dortmanna* L., a predominance of interpopulation variability (54 %) over intrapopulation variability (46 %) was established, which indicates a high level of their genetic differentiation. The gene flow for populations of the species under study is 0.35, which confirms the low level of gene exchange between populations and is consistent with an extremely low population size of the species in the territory of Belarus, as well as the isolation of populations both from the main fragment of the species' range and among themselves. Data of the cluster analysis of *Lobelia dortmanna* L. populations demonstrate their division into 2 genetically distinct groups, the geographical location of which confirms their genetic connection with the Fennoscandian and Atlantic-European fragments of the species' range in the northern part of Europe.

**Keywords:** protected plants, aquatic macrophytes, molecular iPBS markers, genetic diversity of populations

**For citation:** Mialik A. M., Hudnaya N. U., Kulahina T. G., Dubar D. A., Titok V. V. Conservation significance of the genetic structure of regressive populations of *Lobelia dortmanna* L. in Belarus. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 329–339 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-329-339>

**Введение.** Во флоре Беларуси одним из наиболее редких и уязвимых видов водных растений, состояние которого оценивается как критическое, является *Lobelia dortmanna* L. (лобелия Дортманна) из семейства *Campanulaceae*. На территории страны этот реликтовый вид произрастает

в островных локалитетах за юго-восточной границей ареала и на протяжении многих десятилетий известен только в трех естественных локалитетах – в Лунинецком (оз. Белое), Новогрудском (оз. Свитязь) и Россонском (озера Бредно, Белянец, Белое-Доброплесы) районах. Искусственная популяция *L. dortmanna* известна также в оз. Рогово Городокского района [1]. Встречается данный вид только в прибрежной зоне олиго- и мезотрофных озер единично или небольшими группами, образуя местами сплошные заросли. Соответственно, *L. dortmanna* имеет I категорию охраны Красной книги Республики Беларусь как вид, находящийся на грани исчезновения. Основные факторы угрозы для популяций вида заключаются в загрязнении и обмелении водоемов в результате гидромелиоративных работ, повреждении растений сетями при ловле рыбы, чрезмерных рекреационных и хозяйственно-эксплуатационных нагрузках на водоемы [2, 3]. Для сохранения этого вида во флоре Беларуси необходимо не только ужесточение мер охраны и их реальное соблюдение, но и разработка и реализация плана действий по его сохранению. С учетом реликтового происхождения *L. dortmanna*, изолированности локалитетов и сокращения численности растений в них для дальнейшего сохранения этого вида необходима также оценка генетического разнообразия популяций, так как последний показатель является важным фактором в сохранении видов, поскольку влияет на их способность адаптироваться к изменяющимся условиям среды [4]. Ряд исследователей указывают на то, что сокращающиеся популяции редких видов растений нередко характеризуются низким уровнем генетического разнообразия, которое утрачивается из-за более быстрого генетического дрейфа [5, 6]. Одним из способов оценки генетического разнообразия популяций растений является использование молекулярных маркеров, которые считаются эффективными инструментами для определения генетического разнообразия, поскольку они не ограничены по количеству, демонстрируют высокий полиморфизм и не зависят от факторов окружающей среды [7]. Таким образом, молекулярные маркеры благодаря сравнению генотипов по ряду полиморфных локусов позволяют оценить генетическое разнообразие видов, которое может использоваться как важный и информативный параметр для оценки состояния угрожаемых видов и разработки научно обоснованных способов их сохранения.

Проблема сокращения и исчезновения мест произрастания *L. dortmanna* актуальна не только для Беларуси, но и на всем протяжении европейского фрагмента ареала данного вида. Ухудшение жизнеспособности популяций отмечается в ряде озер Вологодской области России, где данный вид также произрастает на юго-восточной границе ареала [8]. За последние десятилетия *L. dortmanna* исчезла в 48 % известных ранее локалитетах на территории Дании в пределах области сплошного распространения, но причины такого стремительного сокращения численности до конца не изучены [9].

Цель данной работы – оценить перспективы сохранения *L. dortmanna* во флоре Беларуси на основе выявления особенностей генетической структуры популяций.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования являлась *L. dortmanna* – многолетнее травянистое растение с мочковатой корневой системой и линейными листьями длиной до 7–8 см, собранными в прикорневую розетку, находящуюся под водой. Цветоносные стебли безлистные либо покрыты многочисленными мелкими чешуйками, во время цветения и плодоношения находятся над водой. Цветки бело-голубого цвета, имеют колокольчатую форму и собраны в рыхлую однобокую кисть на верхушке стебля (рис. 1). Их цветение продолжается с конца июля по начало августа, семена созревают в августе. Плод – сухая продолговатая коробочка, – раскрывается двумя створками. Семена мелкие, удлинённо-бугристые, распространяются ветром. Ареал вида охватывает Северную, Среднюю и Восточную Европу, а также Северную Америку. В Беларуси этот вид находится в отдельных локалитетах за юго-восточной границей ареала, встречается в прибрежных зонах олиго- и мезотрофных озер на чистом песчаном дне на глубине до 1 м [3].

Для изучения генетического разнообразия *L. dortmanna* выбрана система праймеров, основанная на консервативных последовательностях PBS (primer binding site) LTR-ретротранспозонов благодаря своей способности определять генетическое разнообразие внутри и между популяциями, что имеет важное значение для разработки научно обоснованных рекомендаций по сохранению данного вида.

Рис. 1. *Lobelia dortmanna* L. (лобелия Дортманна) из оз. СвитязьFig. 1. *Lobelia dortmanna* L. (Dortmann's lobelia) from Lake Svityaz

Исходным материалом для оценки генетического разнообразия популяций *L. dortmanna* послужили образцы вегетативных органов растений, собранные при проведении экспедиционных исследований в сезон 2023 г. С помощью рекогносцировочных и маршрутных методов найдены популяции вида, выполнена оценка их жизнестойкости, изучены морфометрические параметры, дано флористическое описание фитоценозов и отобран растительный материал из 5 растений в каждой популяции для молекулярно-генетических исследований. Собирается также гербарный материал, снабженный ваучерными этикетками, который хранится в гербарии Центрального ботанического сада НАН Беларуси (MSKH<sup>1</sup>). Документирование мест сбора образцов (табл. 1) осуществлялось также с помощью информационного ресурса [inaturalist.org](https://www.inaturalist.org), что при необходимости позволит в будущем отыскать данные популяции и провести мониторинговые исследования.

Таблица 1. Характеристика мест сбора образцов *Lobelia dortmanna* L.Table 1. Characteristic of the collection sites for *Lobelia dortmanna* L.

Популяция	Местоположение	Координаты	Фитоценоз	Авторы сбора и дата	Документирование
Оз. Белое (OzB)	Брестская обл., Лунинецкий р-н, д. Бостынь, 6,4 км к западу	52.385524 N, 26.646170 E	Литоральная зона озера, совместно с <i>Isoetes lacustris</i> L.	Мялик А. Н., Кулагина Т. Г., Дубарь Д. А., 09.08.2023	<a href="https://www.inaturalist.org/observations/177551030">https://www.inaturalist.org/observations/177551030</a> , гербарий MSKH
Оз. Беянец (Bel)	Витебская обл., Россонский р-н, д. Лисно, 5,4 км к северо-востоку	56.060783 N, 28.479969 E	Литоральная зона озера, совместно с <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	Мялик А. Н., Дубарь Д. А., 24.08.2023	<a href="https://www.inaturalist.org/observations/180023600">https://www.inaturalist.org/observations/180023600</a> , гербарий MSKH
Оз. Свитязь (Sv)	Гродненская обл., Новогрудский р-н, д. Валевка, 3,0 км к юго-юго-востоку	53.435170 N, 25.906113 E	Литоральная зона озера, совместно с <i>Isoetes lacustris</i> L., <i>Littorella uniflora</i> (L.) Aschers.	Мялик А. Н., Дубарь Д. А., Гулис А. Л., 19.07.2023	<a href="https://www.inaturalist.org/observations/173807725">https://www.inaturalist.org/observations/173807725</a> , гербарий MSKH
Оз. Бредно (Br)	Витебская обл., Россонский р-н, 2 км к северо-востоку от д. Доброплесы	55.996672 N, 28.478440 E	Литоральная зона озера, совместно с <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	Мялик А. Н., Дубарь Д. А., 24.08.2023	<a href="https://www.inaturalist.org/observations/180024860">https://www.inaturalist.org/observations/180024860</a> , гербарий MSKH

<sup>1</sup> Официально зарегистрированный акроним гербария в Index Herbariorum.

Таблица 2. Праймеры, используемые в исследовании

Table 2. Primers used in the study

Праймер	Оптимальная температура отжига Ta, °C	Последовательность (5'-3')	Праймер	Оптимальная температура отжига Ta, °C	Последовательность (5'-3')
2389	50,0	ACATCCTTCCCA	2232	55,4	AGAGAGGCTCGGATACCA
2373	51,0	GAACCTGCTCCGATGCCA	2390	56,4	GCAACAACCCCA
2277	52,0	GGCGATGATACCA	2273	56,5	GCTCATCATGCCA
2376	52,0	TAGATGGCACCA	2394	56,5	GAGCCTAGGCCA
2375	52,5	TCGCATCAACCA	2220	57,0	ACCTGGCTCATGATGCCA
2377	53,0	ACGAAGGGACCA	2242	57,0	GCCCCATGGTGGGCGCCA
2378	53,0	GGTCCTCATCCA	2076	59,2	GCTCCGATGCCA
2383	53,0	GCATGGCCTCCA	2271	60,0	GGCTCGGATGCCA
2374	53,5	CCCAGCAAACCA	2415	61,0	CATCGTAGGTGGGCGCCA
2095	53,7	GCTCGGATACCA	2078	62,8	GCGGAGTCGCCA
2083	54,6	CTTCTAGCGCCA	2399	63,0	AAACTGGCAACGGCGCCA
2237	55,0	CCCCTACCTGGCGTGCCA	2080	63,3	CAGACGGCGCCA
2239	55,0	ACCTAGGCTCGGATGCCA	2081	65,0	GCAACGGCGCCA
2272	55,0	GGCTCAGATGCCA	2270	65,0	ACCTGGCGTGCCA
2077	55,1	CTCACGATGCCA	2079	65,2	AGGTGGGCGCCA

Для изучения генетической структуры исследуемых популяций выделяли ДНК из промытых в дистиллированной воде и предварительно высушенных в силикагеле листьев с помощью набора реагентов «ДНК-Экстран-3» («Синтол», Россия). Качество и количество выделенной ДНК проверяли с помощью NanoPhotometer Pearl Implen GmbH (Мюнхен, Германия). В исследовании использовали 30 iPBS-праймеров (табл. 1) [10], ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 25–50 нг ДНК, 5 мкл готовой смеси для ПЦР ScreenMix («Евроген», Россия), 1 мМ праймера для 12–13 п. н. праймеров или 0,6 мМ для 18 п. н. праймеров и воду.

Программа ПЦР состояла из 1 цикла при 95 °C в течение 5 мин; 38 циклов при 95 °C в течение 15 с, отжиг при 50–65,2 °C (в зависимости от праймера) в течение 60 с, элонгацию при 68 °C

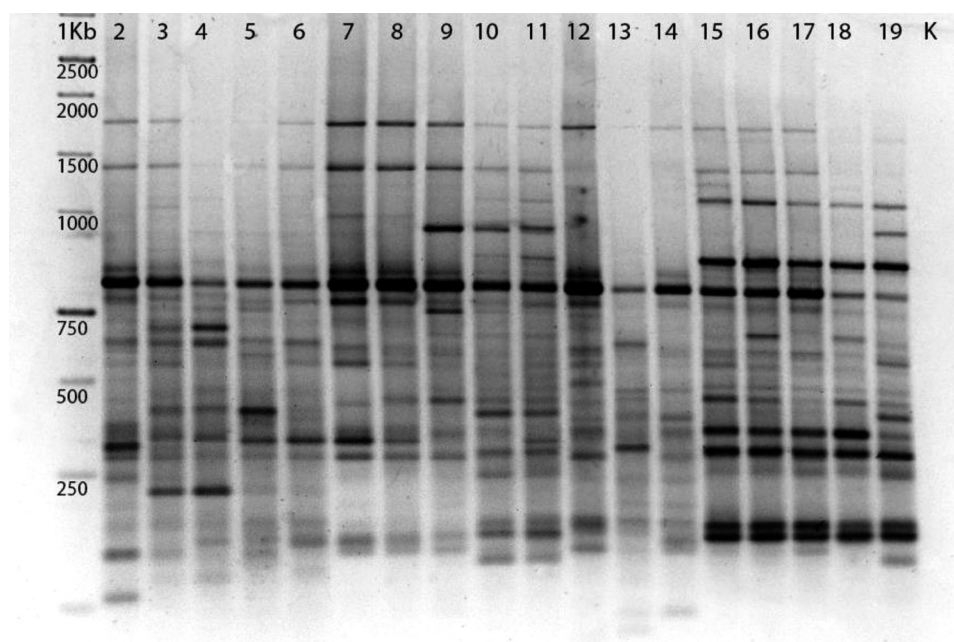


Рис. 2. Результаты ПЦР с использованием 2270 iPBS-праймера. Дорожки: 2–6 – популяция OzB, 7–11 – популяция Bel, 12–14 – популяция Sv, 15–19 – популяция Br, 20 – контроль, первая дорожка – маркер молекулярного веса 1 Кб

Fig. 2. PCR results using 2270 iPBS primer. Lanes: 2–6 – Lake Belye population (OzB), 7–11 – Belyanets population (Bel), 12–14 – Svityaz population (Sv), 15–19 – Bredno population (Br), 20 – control, first lane – 1 Kb molecular weight marker



в течение 90 с. Финальная элонгация проводилась при 72 °С в течение 8 мин. Амплификацию проводили в программируемом терморегуляторе C1000 Touch Thermal Cycler (MJ Research Inc., Bio-Rad Laboratories, США), электрофорез – при напряжении в 65 В на протяжении 4,5 ч в 1,8%-м агарозном геле. Для окрашивания геля использовали бромид этидия в течение 30 мин, а визуализировали с помощью системы UV Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Результаты исследований показали, что для оценки генетического разнообразия и генетической дифференциации *L. dortmanna* подходящими оказались 10 маркеров из 30 используемых (2373, 2242, 2076, 2271, 2415, 2078, 2080, 2081, 2270, 2079). Результаты ПЦР с использованием маркера 2270 представлены на рис. 2.

Для установления оптимальных температур отжига праймеров проведена градиентная ПЦР с образцами *L. dortmanna*. Полученные значения представлены в табл. 3.

Таблица 3. Оптимальные температуры отжига праймеров после оптимизации  
Table 3. Optimal primer annealing temperatures after optimization

Праймер	Оптимальная температура отжига Ta, °С	Последовательность (5'-3')	Праймер	Оптимальная температура отжига Ta, °С	Последовательность (5'-3')
2373	48,4	GAACCTTGCTCCGATGCCA	2078	63,9	GCGGAGTCGCCA
2242	55,2	GCCCCATGGTGGGCGCCA	2080	60,4	CAGACGGCGCCA
2076	57,0	GCTCCGATGCCA	2081	61,6	GCAACGGCGCCA
2271	59,4	GGCTCGGATGCCA	2270	61,0	ACCTGGCGTGCCA
2415	62,6	CATCGTAGGTGGGCGCCA	2079	62,4	AGGTGGGCGCCA

Для отобранных iPBS-маркеров установлены такие показатели, как количество полиморфных локусов, их доля и мера информационного полиморфизма (PIC) (табл. 4).

Таблица 4. Характеристика отобранных iPBS-маркеров  
Table 4. Characteristics of selected iPBS markers

iPBS-маркер	Кол-во локусов	Кол-во полиморфных локусов		Мера информационного полиморфизма (PIC)
		<i>n</i>	%	
2373	24	20	83,33	0,32
2242	25	24	96,00	0,32
2076	25	22	88,00	0,33
2271	15	12	80,00	0,4
2415	14	12	85,71	0,38
2078	34	30	88,24	0,31
2080	37	35	94,59	0,35
2081	37	35	94,59	0,35
2270	29	26	89,66	0,35
2079	33	32	96,97	0,35
Среднее	27,30	24,80	89,71	0,35

Для каждого праймера получено от 14 до 37 локусов (среднее количество 27,30) и от 12 до 35 полиморфных локусов (среднее количество 24,80). В среднем на набор праймеров получено 89,71 % полиморфных локусов. Максимальное значение меры информационного полиморфизма (PIC) получено для маркера 2415 (0,38), а минимальное – для маркера 2078 (0,31). Все маркеры из табл. 4 обладают высоким уровнем PIC, поэтому были использованы нами для изучения генетического разнообразия *L. dortmanna*.

**Результаты и их обсуждение.** На основе данных, полученных с использованием молекулярных маркеров 2373, 2242, 2076, 2271, 2415, 2078, 2080, 2081, 2270 и 2079, для каждой популяции *L. dortmanna* рассчитаны следующие показатели: доля полиморфных ампликонов (P), эффективное (Ne) и наблюдаемое (Na) число аллелей, информационный индекс Шеннона (I), генное разнообразие Нея (He). Вышеперечисленные параметры, а также общее генетическое разнообразие (Ht),

генетическое разнообразие в популяциях (Hs), уровень подразделенности популяций (Gst), поток генов между популяциями (Nm) рассчитаны для всех локусов четырех изученных популяций.

Полученные данные (табл. 5) показали, что наибольшая доля полиморфных локусов обнаружена в популяции Bel (39,78%), а наименьшая – в популяции Br (28,67 %). В исследованных популяциях Na варьируется от 1,29 в популяции Br до 1,39 в популяции Bel. Максимальное эффективное число аллелей (1,26) обнаружено в популяции Bel. На основании значений Ne и I для популяции Bel выявлено наибольшее генетическое разнообразие среди всех исследованных, тогда как наименьшим уровнем по данным показателям выделяется популяция Br. Обе отмеченные популяции находятся в северной части Беларуси – на территории Россонского района Витебской области. Генетическое разнообразие популяций Sv и OzB, расположенных в центральной и южной частях Беларуси, оказалось несколько ниже, чем у популяции Bel.

Таблица 5. Параметры генетического разнообразия популяций *Lobelia dortmanna* L.  
Table 5. Parameters of genetic diversity of the studied populations of *Lobelia dortmanna* L.

Параметр	Модельная популяция				Общее для популяций
	OzB	Bel	Sv	Br	
Доля полиморфных локусов, %	37,99	39,78	32,62	28,67	92,11
Na	1,38 ± 0,03	1,39 ± 0,03	1,33 ± 0,03	1,29 ± 0,03	1,92 ± 0,02
Ne	1,24 ± 0,02	1,26 ± 0,02	1,23 ± 0,02	1,18 ± 0,02	1,55 ± 0,02
He	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,32 ± 0,02
I	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,48 ± 0,01
Ht	–				0,32 ± 0,002
Hs	–				0,13 ± 0,001
Gst	–				0,59
Nm	–				0,35

При анализе генетической изменчивости изученных популяций для всех локусов были рассчитаны: Na, Ne, He, I и доля полиморфных локусов, которые составили 1,92; 1,55; 0,32; 0,48 и 92,11 % соответственно. Разнообразие генов в популяциях (Hs = 0,13) оказалось меньше общего генетического разнообразия (Ht = 0,32). Уровень Gst среди изученных популяций составил 0,59. Эти данные указывают на то, что большинство генетических вариаций встречается между популяциями. Nm для популяций *L. dortmanna* составил 0,35, что свидетельствует о низком уровне обмена генами между ними. Поскольку данный показатель оказался меньше единицы, то, согласно «теории эволюции со смещающимся равновесием», это свидетельствует о нарушении обмена генами между популяциями изучаемого вида [11]. Выявленная особенность согласуется с крайне низкой численностью вида на территории Беларуси, а также с изолированностью белорусских популяций как от основного фрагмента ареала, так и между собой. Расстояние между тремя основными локалитетами *L. dortmanna* (оз. Белое – оз. Свитязь – озера Россонского района) составляет 130 и 320 км соответственно.

Полученные результаты AMOVA указывают на то, что большая часть общей изменчивости (54 %) является межпопуляционной, а меньшая часть (46 %) – внутривидовой. Однако, учитывая небольшую разбежку между данными показателями, для сохранения генофонда *L. dortmanna* в Беларуси необходима охрана всех известных мест произрастания данного вида. Разница между индивидами в популяциях была статистически значимой ( $p < 0,001$ ). Полученное значение PhiPT (0,540) указывает на высокий уровень генетической дифференциации популяций (табл. 6).

Таким образом, с учетом состояния численности и жизнеспособности модельных популяций, их положения относительно европейского фрагмента ареала вида, а также выявленного генетического разнообразия белорусских популяций *L. dortmanna* можно выделить некоторые особенности данного вида (табл. 7), которые могут быть учтены при разработке стратегии его сохранения в долгосрочной перспективе.

Данные табл. 7 показывают, что наиболее высоким генетическим разнообразием Нея (0,15) отличается популяция *L. dortmanna* из оз. Беянец Россонского района. Она является самой

Т а б л и ц а 6. Результаты AMOVA для популяций *Lobelia dortmanna* L.

Table 6. AMOVA results for *Lobelia dortmanna* L. populations

Генетическая дифференциация	Источник изменчивости					Доля в вариации, %
	Число степеней свободы (df)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	Дисперсия	PhiPT	
Общая	17	851,2	—	56,68	0,540*	—
Между популяциями	3	486,56	162,19	30,63		0,54
Внутри популяций	14	364,67	26,05	26,05		0,46

\* Различия достоверны при  $p < 0,001$ .

Т а б л и ц а 7. Особенности генетического разнообразия популяций *Lobelia dortmanna* L. в Беларуси

Table 7. Features of genetic diversity of *Lobelia dortmanna* L. populations in Belarus

Модельная популяция	Площадь локалитета, м <sup>2</sup>	Удаленность от границы сплошного ареала, км	He	I
OzB	1100	600 (атлантикoeвропейский фрагмент)	0,14	0,21
Bel	250	250 (фенноскандинавский фрагмент)	0,15	0,22
Sv	6200	550 (атлантикoeвропейский фрагмент)	0,13	0,19
Br	1700	250 (фенноскандинавский фрагмент)	0,10	0,15

северной в Беларуси и в то же время наиболее близкой к южной границе ареала вида, которая находится в 250 км к северу. Однако расположенная рядом популяция Br характеризуется значительно более низким уровнем генетической гетерогенности ( $He = 0,10$ ). В то же время популяции Sv и OzB, гораздо более удаленные от основного фрагмента ареала *L. dortmanna*, характеризуются значительно более высоким уровнем генетической гетерогенности по показателю Heя – 0,13 и 0,14 соответственно. Таким образом, у *L. dortmanna* не выявлено взаимосвязи между положением популяции в пределах ареала и уровнем ее генетического разнообразия, что противоречит распространенной теории о генетической обедненности изолированных популяций [5].

Важными данными, позволяющими пересмотреть сложившиеся приоритеты в охране отдельных популяций исчезающих видов, является отсутствие взаимосвязи между численностью растений в популяциях и уровнем их генетического разнообразия. Уже отмеченная ранее популяция Bel, для которой выявлен самый высокий уровень гетерогенности, характеризуется самой малой в Беларуси численностью растений и занимаемой площадью. Локалитет популяции Br, площадь которого превышает 1 700 м<sup>2</sup>, оказался наиболее генетическим обедненным. Таким образом, для сохранения генофонда *L. dortmanna* в Беларуси необходима строгая охрана всех известных популяций независимо от их численности, площади и уровня жизнестойкости растений.

Учитывая, что исследованные популяции *L. dortmanna* находятся в островных локалитетах вдали от основного ареала данного вида, наряду с оценкой их генетической гетерогенности важно выявить их генетическую обособленность. Составленная матрица парных генетических сходств и расстояний Heя (табл. 8) показывает генетические различия между исследованными популяциями.

Представленные данные демонстрируют, что наименьшее значение генетического расстояния Heя (0,22) наблюдалось между популяциями OzB и Sv, а наибольшее (0,46) – между популяциями OzB и Br, что согласуется с их географическим положением. Результаты анализа ward.D2 (рис. 3), основанного на данных матрицы расстояния Heя, также подтверждают эти данные.

Представленная дендрограмма показывает, что популяции Sv и OzB являются наиболее генетически близкими между собой среди всех изученных. Они значительно удалены от популяций Bel и Br (также генетически родственных), расположенных на крайнем севере Беларуси, что

Т а б л и ц а 8. Матрица парных генетических сходств (над диагональю) и расстояний Heя (под диагональю)

Table 8. Matrix of pairwise genetic similarities (above the diagonal) and Nei's distances (below the diagonal)

Популяция	OzB	Bel	Sv	Br
OzB	—	0,73	0,80	0,63
Bel	0,31	—	0,71	0,73
Sv	0,22	0,34	—	0,66
Br	0,46	0,31	0,41	—

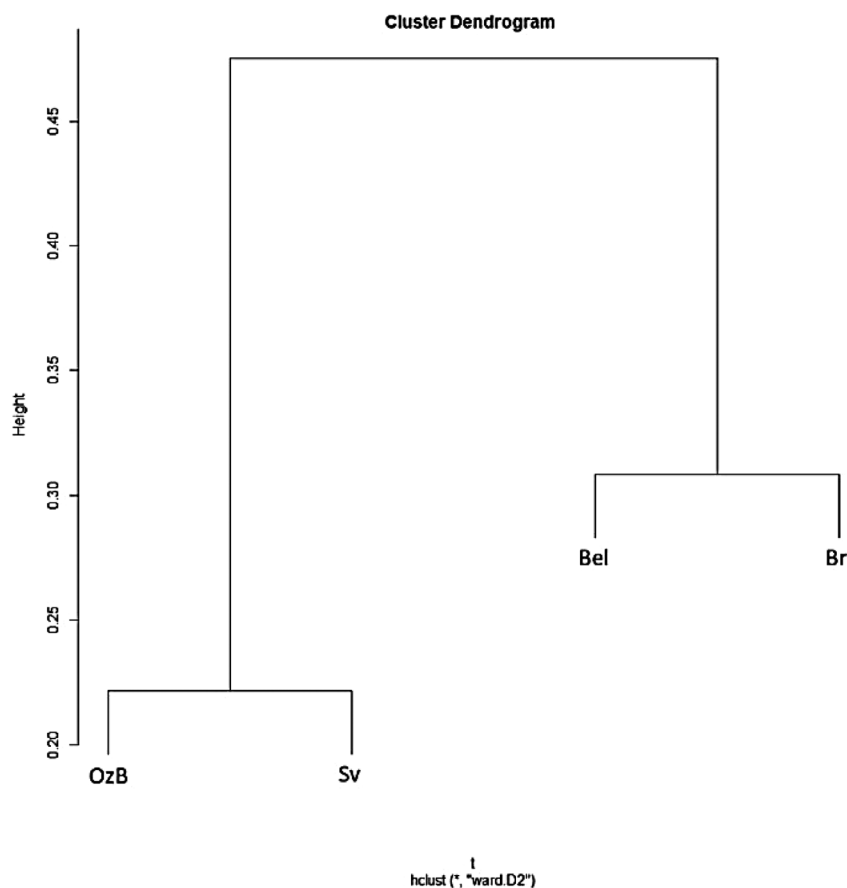


Рис. 3. Дендрограмма на основе генетического расстояния Нея, показывающая взаимосвязь между изученными популяциями *Lobelia dortmanna* L.

Fig. 3. Dendrogram based on Nei's genetic distance showing the relationship between the studied populations of *Lobelia dortmanna* L.

связано с историей развития флоры страны в голоцене. Вероятно, популяции OzB (Припятское Полесье) и Sv (южные склоны Новогрудской возвышенности) генетически родственны с популяциями *L. dortmanna* из Атлантической Европы (южные побережья Балтийского и Северного морей), поскольку проникли на территорию Беларуси после деградации Сожского оледенения. Соответственно, они являются более древними и имеют генетическое родство с атлантикоевропейским фрагментом ареала *L. dortmanna*. Популяции из Россонского района (озера Беянец и Бредно), вероятно, родственны популяциям из фенноскандинавского фрагмента ареала *L. dortmanna*, поскольку их положение находится к северу от южной границы Поозерского (Weichselian glaciation) оледенения. Появление данных популяций на территории северной части Беларуси приходится на ранний голоцен и связано с миграцией комплекса североатлантических видов (*Isoetes lacustris* L., *Leymus arenarius* (L.) Hochst. и др.) [13]. Таким образом, выявленная взаимосвязь между изученными популяциями *L. dortmanna* на основе генетического расстояния Нея согласуется с положением модельных популяций относительно общего ареала вида в Европе (рис. 4), а также соответствует истории развития растительного покрова данной территории в голоцене.

С помощью анализа РСоА выявлено, что на первые три компоненты главных координат приходится 59,6 % всей вариации (рис. 5). Как и ожидалось, популяции Bel и Sv максимально близки и находятся в правом нижнем квадранте. Популяции Bel и Br также генетически родственны между собой (по данным генетического расстояния Нея), однако первая из них находится в верхнем квадранте, а вторая – в нижнем левом. Из этого следует, что данные популяции, несмотря на ожидаемое генетическое родство, характеризуются определенным различием. Данная особенность не согласуется с тем, что популяции Bel и Br находятся в одной группе озер и расстояние между ними не превышает 7 км.



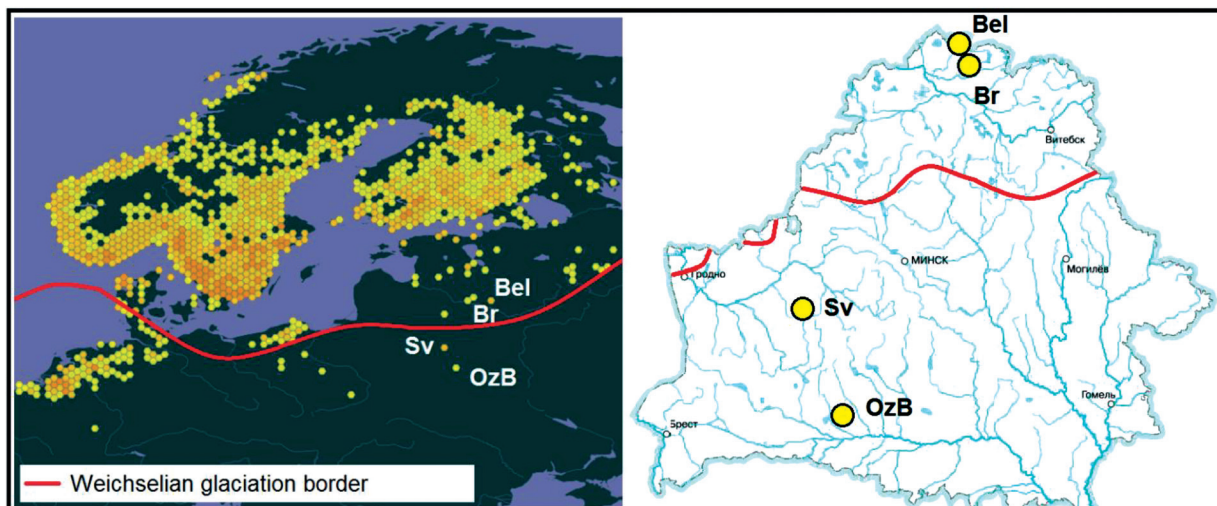


Рис. 4. Положение изученных популяций в ареале *Lobelia dortmanna* L.  
 Fig. 4. Position of the studied populations in the range of *Lobelia dortmanna* L.

Principal Coordinates (PCoA)

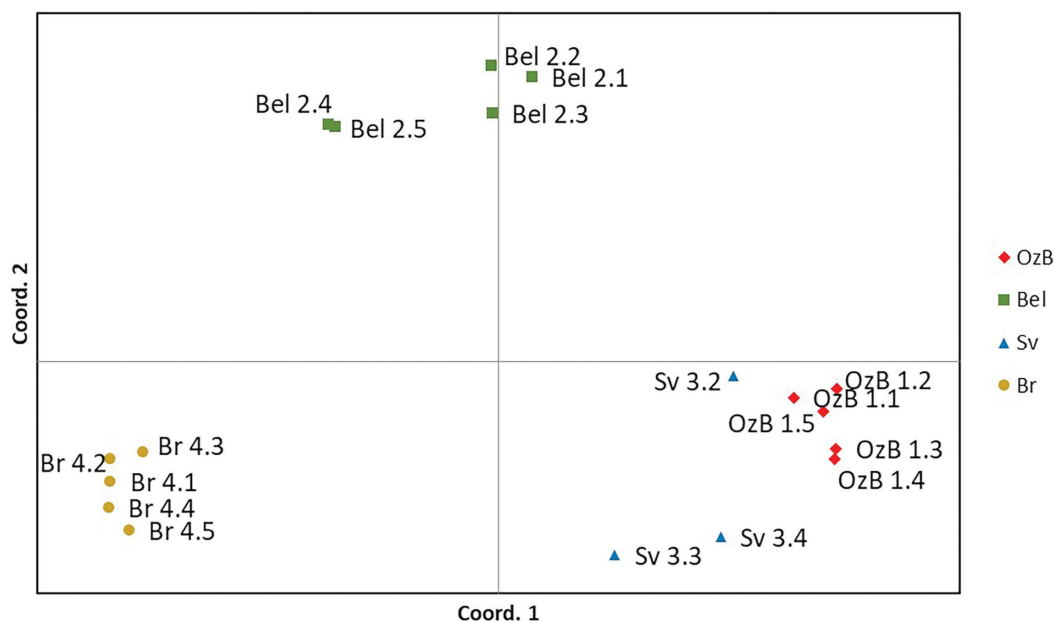


Рис. 5. Распределение исследованных популяций *Lobelia dortmanna* L. на первых двух главных координатах (PCoA)  
 Fig. 5. Distribution of the studied populations of *Lobelia dortmanna* L. on the first two principal coordinates (PCoA)

Таким образом, представленные данные подтверждают генетическую разнородность белорусских популяций *L. dortmanna*, что свидетельствует не только о их научно-познавательной ценности, но и о важном значении в сохранении генофонда исследуемого вида в пределах Центральной и Восточной Европы. Сохранение вида в настоящее время обеспечивается тем, что все изученные популяции находятся в пределах охраняемых природных территорий – заказников республиканского значения. Кроме того, *L. dortmanna* относится к характерным видам редкого биотопа олигомезотрофных озер с сообществами погруженных гидрофитов [12], которые, в свою очередь, являются популярными объектами отдыха и рыбной ловли. Соответственно, несмотря на низкие показатели генетического разнообразия популяций и их невысокую адаптационную способность,

именно повышенная рекреационная нагрузка должна рассматриваться как преобладающий фактор в исчезновении данного вида.

**Заключение.** В результате проведенных исследований с использованием молекулярных iPBS-маркеров выполнена оценка генетического разнообразия популяций *L. dortmanna*, расположенных в островных локалитетах на значительном удалении от основного ареала данного вида. Анализ популяционной генетической структуры демонстрирует, что межпопуляционное генетическое разнообразие у данного вида незначительно выше (54 %), чем внутривидовое (46 %). Низкий уровень потока генов между популяциями, а также невысокие показатели генетического разнообразия не указывают на их изолированность и регрессивное состояние. С этим связана необходимость строгой охраны максимально большего числа известных местообитаний вида для обеспечения сохранности генофонда *L. dortmanna* в долгосрочной перспективе.

Данные кластерного анализа популяций *L. dortmanna* демонстрируют их разделение на две генетически разрозненные группы, географическое положение которых подтверждает их генетическую связь с разными фрагментами ареала вида в Европе, а также согласуется с историей развития флоры региона в голоцене.

При разработке стратегии сохранения вида необходимо учитывать выявленные особенности генетической структуры популяций *L. dortmanna*, которые заключаются в отсутствии взаимосвязи между генетическим разнообразием популяций, их положением в пределах ареала, а также численностью и жизненностью растений в них.

В целом анализ полученных данных показывает, что для *L. dortmanna* характерно невысокое генетическое разнообразие отдельных популяций, их изолированность и обедненность. В связи с этим благоприятный прогноз существования вида в условиях дикой природы возможен только при сохранности подходящих природных биотопов (олигомезотрофных озер с сообществами погруженных гидрофитов) и ограничении рекреационной нагрузки на них.

### Список использованных источников

1. Расселение Лобелии Дортмана на Витебщине / И. М. Морозов [и др.] // Охраняемые природные территории и объекты Белорусского Поозерья: современное состояние, перспективы развития: материалы III Междунар. науч. конф., Витебск, 16–17 декабря 2009 г. / редкол.: А. М. Дорофеев (отв. ред.) [и др.]; Витеб. гос. ун-т им. П. М. Машерова [и др.]. – Витебск, 2009. – С. 148–150.
2. Власов, Б. П. Особенности уникальных озер Беларуси как формирующая основа ресурсов реликтовых видов *Isoetes L.* и *Lobelia dortmanna L.* // Вестн. БГУ. Сер. 2. Химия. Биология. География. – 2014. – № 1. – С. 62–67.
3. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / М-во природ. ресурс. и охраны окруж. среды Респ. Беларусь, Нац. акад. наук Беларуси; гл. редкол.: Л. И. Хоружик (предс.) [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларусь. энцикл., 2015. – 445 с.
4. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? / R. Leimu [et al.] // J. Ecol. – 2006. – Vol. 94, N 5. – P. 942–952. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01150.x>
5. Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil / A. L. de Wallau John [et al.] // Genet. Mol. Biol. – 2019. – Vol. 42, N 1. – P. 108–119. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0314>
6. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe / M. Szczecińska [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 3. – P. e0151730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730>
7. Samantaray, S. Evaluation of genetic diversity in *Chlorophytum borivilianum* (Santp. and Fernan.) using molecular markers: An endangered medicinal plant / S. Samantaray, U. Ngangkham // Active ingredients from aromatic and medicinal plants / ed. H. A. El-Shemy. – 2017. <https://doi.org/10.5772/66536>
8. *Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) в Вологодской области / Д. А. Филиппов [и др.] // Вестн. СПбГУ. Сер. 3. Биология. – 2016. – Вып. 1. – С. 84–99.
9. Reasons for the dramatic loss of *Lobelia dortmanna*, a keystone plant species of softwater lakes in the Northern Hemisphere / S. R. Nielsen [et al.] // Freshwater Biol. – 2023. – Vol. 68, N 10. – P. 1673–1684. <https://doi.org/10.1111/fwb.14149>
10. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 121, N 8. – P. 1419–1430. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2>
11. Wright, S. Random drift and shifting balance theory of evolution / S. Wright // Biomathematics / ed. K. Krickeberg [et al.]. – Berlin [et al.], 1970. – Vol. 1: Mathematical topics in population genetics / ed. K. Kenichi. – P. 1–31. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-46244-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-46244-3_1)
12. Редкие биотопы Беларуси / А. В. Пугачевский [и др.]. – Минск: Альтиора – Живые краски, 2013. – 234 с.
13. Козловская, Н. В. Флора Белоруссии, закономерности ее формирования, научные основы использования и охраны / Н. В. Козловская. – Минск: Наука и техника, 1978. – 126 с.

## References

1. Morozov I. M., Torbenko A. B., Vysotskii Yu. I., Lebedeva Yu. I. Settlement of *Lobelia dortman* in the Vitebsk region. *Okhranyaemye prirodnye territorii i ob'ekty Belorusskogo Poozer'ya: sovremennoe sostoyanie, perspektivy razvitiya: materialy III Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, Vitebsk, 16–17 dekabrya 2009 goda* [Protected natural areas and objects of the Belarusian Poozerie: current state, development prospects: materials of the III International scientific conference, Vitebsk, December 16–17, 2009]. Vitebsk, 2009, pp. 148–150 (in Russian).
2. Vlasov B. P. Features of the unique lakes of Belarus as the forming basis for the resources of relict species *Isoetes* L. and *Lobelia dortmanna* L. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2: Khimiya. Biologiya. Geografiya* [Bulletin of the Belarusian State University. Series 2: Chemistry. Biology. Geography], 2014, no. 1, pp. 62–67 (in Russian).
3. Kachanovskii I. M., Nikiforov M. E., Parfenov V. I., Borodin O. I., Pugachevskii A. V., Baichorov V. M., Gapienko O. S., Giryayev A. S., Evdaseva T. P. *Red Book of the Republic of Belarus. Plants: rare and endangered species of wild plants. 4th ed.* Minsk, Belaruskaya Entsyklopedyya Publ., 2015. 445 p. (in Russian).
4. Leimu R., Mutikainen P., Koricheva J., Fischer M. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, 2006, vol. 94, no. 5, pp. 942–952. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01150.x>
5. de Wallau John A. L., Mäder G., Fregonezi J. N., Freitas L. B. Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 2019, vol. 42, no. 1, pp. 108–119. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0314>
6. Szczecińska M., Sramko G., Wołosz K., Sawicki J. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 3, P. e0151730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730>
7. Samantaray S., Ngangkham U. Evaluation of genetic diversity in *Chlorophytum borivilianum* (Santp. and Fernan.) using molecular markers: An endangered medicinal. *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*, 2017. <https://doi.org/10.5772/66536>
8. Filippov D. A., Bobrov Yu. A., Chkhobadze A. B., Levashov A. N. *Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) in the Vologda region. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3. Biologiya* [Bulletin of Saint Petersburg University. Series 3. Biology], 2016, vol. 1, pp. 84–99 (in Russian).
9. Nielsen S. R., Martinsen K. T., Pedersen O., Baastrup-Spohr L. Reasons for the dramatic loss of *Lobelia dortmanna*, a keystone plant species of softwater lakes in the Northern Hemisphere. *Freshwater Biology*, 2023, vol. 68, no. 10, pp. 1673–1684. <https://doi.org/10.1111/fwb.14149>
10. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retro-transposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, vol. 121, no. 8, pp. 1419–1430. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2>
11. Wright S. Random drift and shifting balance theory of evolution. *Biomathematics. Vol. 1: Mathematical topics in population genetics*. Berlin, Heidelberg, New York, 1970, pp. 1–31. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-46244-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-46244-3_1)
12. Pugachevskii A. V., Vershitskaya I. N., Ermokhin M. V., Stepanovich I. M., Sozinov O. V., Sakovich A. A., Rudakovskii I. A., Kulak A. V., Zhuravlev D. V. *Rare biotopes of Belarus*. Minsk, Al'tiora – Zhivye kraski Publ., 2013. 234 p. (in Russian).
13. Kozlovskaya N. V. *Flora of Belarus, patterns of its formation, scientific principles of use and protection*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1978. 126 p. (in Russian).

## Информация об авторах

Мялик Александр Николаевич – канд. биол. наук, заведующий сектором. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [aleksandr-myalik@yandex.ru](mailto:aleksandr-myalik@yandex.ru)

Гудная Наталья Владимировна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [N.Samakhvalava@cbg.org.by](mailto:N.Samakhvalava@cbg.org.by)

Кулагина Татьяна Геннадьевна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [T.Shlapakova@cbg.org.by](mailto:T.Shlapakova@cbg.org.by)

Дубарь Даниил Александрович – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [d.dubar@tut.by](mailto:d.dubar@tut.by)

Титок Владимир Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [V.Titok@cbg.org.by](mailto:V.Titok@cbg.org.by)

## Information about the authors

Aliaksandr M. Mialik – Ph. D. (Biol.), Head of the Sector. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov St., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [aleksandr-myalik@yandex.ru](mailto:aleksandr-myalik@yandex.ru)

Natallia U. Hudnaya – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov St., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [N.Samakhvalava@cbg.org.by](mailto:N.Samakhvalava@cbg.org.by)

Tatsiana G. Kulahina – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov St., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [T.Shlapakova@cbg.org.by](mailto:T.Shlapakova@cbg.org.by)

Daniil A. Dubar – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov St., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [d.dubar@tut.by](mailto:d.dubar@tut.by)

Vladimir V. Titok – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Chief Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov St., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [V.Titok@cbg.org.by](mailto:V.Titok@cbg.org.by)

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 592:502.175-027.21  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-340-352>

Поступила в редакцию 20.09.2023  
Received 20.09.2023

**В. М. Байчоров<sup>1</sup>, Ю. Г. Гигиняк<sup>1</sup>, М. Д. Мороз<sup>1</sup>, Е. А. Куликова<sup>1</sup>, Е. В. Корзун<sup>1</sup>,  
З. А. Мустафаяева<sup>2</sup>, Н. И. Лебедева<sup>2</sup>, Н. О. Титова<sup>3</sup>, У. Т. Мирзаев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт зоологии АН Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт рыбоводства, Янгиюль, Республика Узбекистан

## ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ КАЧЕСТВО ВОДЫ РЕЧНЫХ ЭКОСИСТЕМ ОСОБО ОХРАНЯЕМЫХ ПРИРОДНЫХ ТЕРРИТОРИЙ БЕЛАРУСИ И УЗБЕКИСТАНА

**Аннотация.** В последнее время наряду с определением физического и химического загрязнения поверхностных вод (особенно речных экосистем) все большее значение приобретает биологическая, и в первую очередь гидробиологическая, составляющая.

Целью настоящей работы являлась оценка экологического качества воды речных экосистем особо охраняемых природных территорий Беларуси и Узбекистана на основе изучения сообщества макрозообентоса.

На модельных станциях выявлены чужеродные, редкие для Беларуси и охраняемые в Европе, виды гидробионтов. На территории обоих государств отмечена высокая численность (от 30 до 80 %) реофильных видов отрядов Плесокотега, Еphemеротега и Трихотега, которые представляют три самые приоритетные индикаторные группы гидробионтов. Рассчитаны биотические индексы и определены классы чистоты воды рек Республиканского ландшафтного заказника «Средняя Припять» на территории Беларуси и Угам-Чаткальского государственного природного национального парка на территории Узбекистана. В соответствии с Водной рамочной директивой ЕС экологическое качество воды на изученных станциях на территории обоих государств можно отнести к классам с хорошей и высокой чистотой воды.

**Ключевые слова:** поверхностные воды, речные экосистемы, биотические индексы, макрозообентос, экологическое качество

**Для цитирования:** Экологическое качество воды речных экосистем особо охраняемых природных территорий Беларуси и Узбекистана / В. М. Байчоров [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 340–352. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-340-352>

**Vladimir M. Baitchorov<sup>1</sup>, Yuri G. Hihiniak<sup>1</sup>, Michael D. Moroz<sup>1</sup>, Alena A. Kulikova<sup>1</sup>, Yavor V. Korzun<sup>1</sup>,  
Zuri A. Mustafayeva<sup>2</sup>, Natalya I. Lebedeva<sup>2</sup>, Natalya O. Titova<sup>3</sup>, Ulugbek T. Mirzaev<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>Institute of Zoology of the Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

<sup>3</sup>Scientific Research Institute of Fish Farming, Yangiyul, Republic of Uzbekistan

## ECOLOGICAL QUALITY OF WATER OF RIVER ECOSYSTEMS OF SPECIALLY PROTECTED NATURAL TERRITORIES OF BELARUS AND UZBEKISTAN

**Abstract.** Recently, along with the determination of physical and chemical pollution in establishing the quality of surface waters and especially river ecosystems, the biological and, first of all, the hydrobiological component has become increasingly important. The purpose of this work was to assess the ecological quality of river ecosystems in specially protected natural areas of Belarus and Uzbekistan based on the study of the macrozoobenthos community.

Alien, rare for Belarus and protected in Europe, species of aquatic organisms were identified at the model stations. In the territory of the both states, a high abundance (from 30 to 80 %) of rheophilic species Plecoptera, Ephemeroptera and Trichoptera, which represent the three most priority indicator groups of aquatic organisms, was noted. Biotic indices were determined and the class of water purity of the rivers of the State landscape reserve “Srednyaya Pripyat” in Belarus and the Ugam-Chatkal State Natural National Park in the territory of Uzbekistan were calculated. In accordance with the EU Water Framework Directive, the ecological water quality at the studied sampling sites can be classified as good and high water purity classes in the territory of the both countries.

**Keywords:** surface water, river ecosystems, biotic indices, macrozoobenthos, environmental quality

**For citation:** Baitchorov V. M., Hihiniak Yu. G., Moroz M. D., Kulikova A. A., Korzun Ya. V., Mustafayeva Z. A., Lebedeva N. I., Titova N. O., Mirzaev U. T. Ecological quality of water of river ecosystems of specially protected natural territories of Belarus and Uzbekistan. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 340–352 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-340-352>



**Введение.** Качество поверхностных вод долгое время определялось гидрофизическими и гидрохимическими показателями, которые не дают прямого ответа на вопрос об экологическом состоянии водных экосистем. Биологический подход, изначально основанный на использовании данных о сапробности видов индикаторов [1–6], применен был лишь в случае значимого преобразования биотопа, а при фоновых значениях гидрофизических и гидрохимических показателей он мало эффективен. Поэтому в настоящее время все чаще используются индексы биологического разнообразия [7, 8]. В Беларуси для оценки качества воды речных экосистем применяют модифицированный индекс Вудивисса [9], который сочетает основные качества организмов-индикаторов и уровень биологического разнообразия (количество таксономических групп макрозообентосного сообщества). Беларусь и Узбекистан расположены в разных зоогеографических областях, но в то же время на территории обоих государств имеются речные системы, относящиеся как к равнинному, так и к горному типу. Несмотря на достаточно большое количество гидробиологических исследований речных экосистем Беларуси [10–14] и Узбекистана [15, 16], практически отсутствует биоиндикационная оценка изменения экологического качества рек на особо охраняемых природных территориях (ООПТ).

Цель работы – определение экологического качества воды речных экосистем разного типа в границах особо охраняемых природных территорий Беларуси и Узбекистана.

Задачи исследования: выявление видового состава таксономических групп макрозообентоса, расчет биотических индексов и классов чистоты речных экосистем на территории ООПТ Беларуси и Узбекистана.

Настоящее исследование соответствует рекомендациям Водной рамочной директивы ЕС [17] и Водного кодекса Республики Беларусь [18] в соответствии с ТКП «Правила определения экологического (гидробиологического) статуса речных экосистем» [9].

**Материалы и методы исследования.** Полевые исследования были выполнены в летний период 2022 г. Материалом для настоящей работы послужил комплекс макрозообентоса равнинных речных экосистем Припятского Полесья заказника «Средняя Припять» на территории Беларуси и горных рек на территории Угам-Чаткальского государственного природного национального парка (УЧГПНП) Бостанлыкского района Ташкентской области Узбекистана. На территории Беларуси состав макрозообентоса был определен на 14 станциях отбора проб, на территории Узбекистана – на 17 станциях отбора проб 5 основных рек и их притоков УЧГПНП. Модифицированный индекс Вудивисса использовали в соответствии с ТКП «Правила определения экологического (гидробиологического) статуса речных экосистем» [9, 19, 20].

*Отбор гидробиологических проб.* Отбор проб осуществляли методом траления в прибрежной части реки при помощи стандартного гидробиологического сачка. Методика отбора проб проведена согласно Европейскому протоколу AQEM и стандарту ISO 7828. Кроме того, на каменистых грунтах и в местах развития макрофитов производили выемку камней и коряг с их последующим осмотром и отбором животных. Отобранные пробы макрозообентосных объектов фиксировали 96%-м спиртом или 4%-м формалином.

*Расчет биотических индексов.* Для биологического анализа загрязненных вод по составу донных животных наиболее простым и достаточно удобным представляется разработанный для р. Трент в Англии метод Вудивисса [8, 21], в основе которого – уменьшение биологического разнообразия фауны в условиях загрязнения и последовательное исчезновение из водоема разных групп животных по мере увеличения загрязнения. Используемый нами модифицированный биотический индекс Вудивисса [9] предполагает сбор только качественных проб, без учета обилия животных, и допускает определение животных до уровня таксономических групп, которые являются основными индикаторами экологического качества водных экосистем. В связи с тем, что алгоритмы расчета индекса Вудивисса в разных литературных источниках различаются, в табл. 1 нами приводится матрица для расчета модифицированного биотического индекса Вудивисса.

Как видно из табл. 1, самые высокие биоиндикационные свойства у представителей отрядов Plecoptera (веснянки), Ephemeroptera (поденки), Trichoptera (ручейники).

Существует много систем оценки качества поверхностных вод. В табл. 2 приведены интеркалিবровка значений индекса Вудивисса, характеристика и цветовое отображение класса чистоты

Т а б л и ц а 1. Расчет модифицированного биотического индекса Вудивисса согласно ТКП «Правила определения экологического (гидробиологического) статуса речных экосистем» [9]

Table 1. Calculation of the Extended biotic index according to the TCP “Rules for determining the ecological (hydrobiological) status of river ecosystems” [9]

Индикаторные таксоны	Кол-во таксонов	Кол-во таксономических групп				
		0–5	6–13	14–21	22–29	30 и более
Отр. Plecoptera, род <i>Heptagenia</i>	>1 1	–	–	8 7	9 8	10 9
Отр. Ephemeroptera, за исключением сем. Baetidae и Caenidae	>1 1	–	6 5	7 6	8 7	9 8
Отр. Trichoptera, отр. Ephemeroptera (только сем. Baetidae и Caenidae)	>1 1	–	5 4	6 5	7 6	8 7
Сем. Gammaridae, отр. Odonata, <i>Aphelocheirus aestivalis</i>	1	3	4	5	6	7
Класс Hirudinea, <i>Asellus aquaticus</i>	1	2	3	4	5	–
Класс Oligochaeta, сем. Chironomidae	1	1	2	3	–	–
Присутствуют виды-полисапробы	1	0	1	–	–	–

Т а б л и ц а 2. Система оценки качества воды (национальная и по рекомендациям Водной рамочной директивы ЕС [9, 17, 18]) на основе модифицированного биотического индекса Вудивисса

Table 2. Water quality assessment system (national and according to the recommendations of the EU water framework directive [9, 17, 18]) based on the Extended biotic index

Индекс Вудивисса	Класс чистоты	Характеристика качества воды		Цветовое обозначение
		Беларусь	Директива ЕС	
10-8	1	Очень чистая	Высокое	Синий
7-5	2	Чистая	Хорошее	Зеленый
4-3	3	Умеренно загрязненная	Невысокое	Желтый
2-1	4	Загрязненная	Низкое	Оранжевый
1-0	5	Грязная	Плохое	Красный
0	6	Очень грязная		

воды в соответствии с системой, применяемой в Беларуси, и системой, приближенной к рекомендациям Водной рамочной директивы ЕС.

**Результаты и их обсуждение. Заказник «Средняя Припять».** Идентификация видового состава макрозообентоса для оценки экологического качества воды рек заказника «Средняя Припять» была выполнена для 14 станций отбора проб (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Видовой состав и уровень идентификации таксономических групп макрозообентоса для расчета значений модифицированного индекса Вудивисса на станциях отбора проб заказника «Средняя Припять»

Table 3. Species composition and level of identification of taxonomic groups of macrozoobenthos for calculation of values of the modified Woodiwiss index at sampling sites in the reserve “Srednyaya Pripyat”

Видовой состав и уровень идентификации таксономических групп	Кол-во особей в пробе, экз.													
	Ст. 1	Ст. 2	Ст. 3	Ст. 4	Ст. 5	Ст. 6	Ст. 7	Ст. 8	Ст. 9	Ст. 10	Ст. 11	Ст. 12	Ст. 13	Ст. 14
<b>Nematoda</b> (до класса)														
<b>Tricladidae</b> (до рода)														
<b>Oligochaeta</b> (без Naididae) (до класса)														
<i>Stylaria lacustris</i> (Linnaeus, 1767)								4						
<i>Oligochaeta</i> gen. spp.	12	3	4		2		2	16	2	3	6	2		6
<b>Naididae</b> (до семейства)														
<b>Hirudinea</b> (до рода)														
<i>Glossiphonia complanata</i> (Linnaeus, 1758)														1
<i>Glossiphonia heteroclita</i> (Linnaeus, 1761)	1							4						



Видовой состав и уровень идентификации таксономических групп	Кол-во особей в пробе, экз.													
	Ст. 1	Ст. 2	Ст. 3	Ст. 4	Ст. 5	Ст. 6	Ст. 7	Ст. 8	Ст. 9	Ст. 10	Ст. 11	Ст. 12	Ст. 13	Ст. 14
<b>Plecoptera (до рода)</b>														
<b>Ephemeroptera (до рода), за исключением сем. Baetidae и Caenidae</b>														
<i>Heptagenia fuscogrisea</i> (Retzius, 1783)					5									
<i>Leptophlebia marginata</i> (Linnaeus, 1767)													1	
<b>Heteroptera (до рода)</b>														
<i>Nepa cinerea</i> Linnaeus, 1758	3	1			1									
<i>Ilyocoris cimicoides</i> (Linnaeus, 1758)			4	2	3	5	1	5		3	1			4
<i>Plea minutissima</i> Leach, 1817	2		1					4						1
<i>Cymatia coleoptrata</i> (Fabricius, 1777)						4		7						
<i>Sigara falleni</i> (Fieber, 1848)		1									1			
<i>Sigara striata</i> (Linnaeus, 1758)									1					
<i>Gerris lacustris</i> (Linnaeus, 1758)					1									
<b>Lepidoptera (до рода)</b>														
<i>Cataclysta lemnata</i> (Linnaeus, 1758)											2			
<i>Parapoynx stratiotata</i> (Linnaeus, 1758)														1
<b>Coleoptera (до рода)</b>														
<i>Haliphus fluviatilis</i> Aubé, 1836	1							1	5					
<i>Haliphus fulvus</i> (Fabricius, 1801)			5				4							
<i>Haliphus</i> sp.		1												
<i>Peltodytes caesus</i> (Duftschmid, 1805)		1												
<i>Noterus</i> sp.			1										1	
<i>Hygrotus inaequalis</i> (Fabricius, 1777)		1												
<i>Hygrotus versicolor</i> (Schaller, 1783)						1								
<i>Hyphydrus ovatus</i> (Linnaeus, 1761)							1							
<i>Ilybius fuliginosus</i> (Fabricius, 1792)														1
<i>Laccophilus hyalinus</i> (De Geer, 1774)	12	4			3				4			1		8
<i>Laccophilus minutus</i> (Linnaeus, 1758)										3			1	
<i>Copelatus haemorrhoidalis</i> (Fabricius, 1787)						1								
<i>Rhantus suturalis</i> (MacLeay, 1825)						1			1	1		1		
<i>Graphoderes bilineatus</i> (De Geer, 1774)						1								
<i>Dytiscidae</i> gen. spp.	1						2			2				
<i>Anacaena lutescens</i> (Stephens, 1829)	1												1	
<i>Cymbiodyta marginella</i> (Fabricius, 1792)				2										
<i>Enochrus affinis</i> (Thunberg, 1794)										2				
<i>Enochrus coarctatus</i> (Gredler, 1863)											3			
<i>Enochrus ochropterus</i> (Marshall, 1802)													1	
<i>Helochares obscurus</i> (Müller, 1776)		1	7	3		4				1		1	5	
<i>Hydrobius fuscipes</i> (Linnaeus, 1758)	1			3	1						8	4	7	
<i>Hydrochara caraboides</i> (Linnaeus, 1758)													1	
<i>Laccobius</i> sp.											3			
<i>Hydrophilidae</i> gen. spp.			12				3			2				
<i>Helophorus minutus</i> Fabricius, 1775				1					1					
<i>Hydrochus elongatus</i> (Schaller, 1783)	1			1										
<i>Hydrochus ignicollis</i> Motschulsky, 1860											1			
<i>Dryops griseus</i> (Erichson, 1847)	1			2								1		
<i>Donacia</i> sp.		1										1		
<i>Scirtidae</i> gen. spp.			2					7						
<b>Trichoptera, отр. Ephemeroptera (только сем. Baetidae и Caenidae) (до рода)</b>														
<i>Centroptilum luteolum</i> (Müller, 1776)					2									
<i>Cloeon dipterum</i> (Linnaeus, 1758)			38			16				37				



Окончание табл. 3

Видовой состав и уровень идентификации таксономических групп	Кол-во особей в пробе, экз.													
	Ст. 1	Ст. 2	Ст. 3	Ст. 4	Ст. 5	Ст. 6	Ст. 7	Ст. 8	Ст. 9	Ст. 10	Ст. 11	Ст. 12	Ст. 13	Ст. 14
<i>Cloeon simile</i> Eaton, 1870	7						6	12			7	2	8	
<i>Baetis vernus</i> Curtis, 1834														2
<i>Caenis horaria</i> Linnaeus, 1758	1										3	1	4	13
<i>Caenis robusta</i> Eaton, 1884			18				1	14	4		2			
<i>Hydropsyche pellucidula</i> (Curtis, 1834)	2													
<i>Neureclipsis bimaculata</i> (Linnaeus, 1761)	2													
<i>Anabolia</i> sp.	6	6			27					2	88	74	30	
<i>Chaetopteryx</i> sp.												4	12	1
<i>Limnephilus flavicornis</i> (Fabricius, 1787)					1					1				
<i>Limnephilus rhombicus</i> (Linnaeus, 1758)	7	33	2			2		21			3	1		4
<i>Phacopteryx brevipennis</i> (Curtis, 1834)														1
<i>Athripsodes aterrimus</i> (Stephens, 1836)	2		1											
<i>Triaenodes bicolor</i> (Curtis, 1834)								8			1			
<i>Hydroptila</i> sp.		1								4				
<b>Diptera (до семейства)</b>														
<i>Ceratopogonidae</i> gen. spp.		1				1	1	2	1	2			1	2
<i>Chironomidae</i> gen. spp.	52	11	34	26	2	3	14	7	8	42	67	3	12	11
<i>Culicidae</i> gen. spp.								1						
<i>Simuliidae</i> gen. spp.				51			7							
<i>Tabanidae</i> gen. spp.										1				2
<i>Tipulidae</i> gen. spp.			1											

Примечание. Станции отбора проб (Ст.): 1 – р. Ясельда (н. п. Кудричи, Пинский р-н); 2 – р. Стырь (н. п. Гольцы, Пинский р-н); 3 – р. Ветлица (н. п. Лядец, Столинский р-н); 4 – р. Горынь (н. п. Хорск, Столинский р-н); 5 – р. Случь (н. п. Логвощи, Житковичский р-н); 6 – р. Ствига (н. п. Озераны, Житковичский р-н); 7 – р. Припять (н. п. Черничи, Житковичский р-н); 8 – р. Скрипница (н. п. Кольцо, Житковичский р-н); 9 – Микашевичский канал (н. п. Гряда, Лунинецкий р-н); 10 – Ситнецкий канал (н. п. Ситнеца, Лунинецкий р-н); 11 – р. Лань (н. п. Островно, Лунинецкий р-н); 12 – р. Смердь (н. п. Лахва, Лунинецкий р-н); 13 – р. Цна (н. п. Кожан-Городок, Лунинецкий р-н); 14 – р. Бобрик (н. п. Березцы, Пинский р-н).

На основании видового состава таксономических групп и их индикаторной значимости рассчитаны значения модифицированного индекса Вудивисса на изученных станциях отбора проб заказника «Средняя Припять» (табл. 4).

Таблица 4. Экологическое качество воды на станциях отбора проб заказника «Средняя Припять»

Table 4. Ecological water quality at sampling sites in the reserve “Srednyaya Pripyat”

№ ст.	Река, населенный пункт	Координаты	N	EVI	Класс чистоты
1	р. Ясельда, н. п. Кудричи, Пинский р-н	N 52.137867, E 26.393133	30	8	1
2	р. Стырь, н. п. Гольцы, Пинский р-н	N 52.0853, E 26.5517	25	7	2
3	р. Ветлица, н. п. Лядец, Столинский р-н	N 52.080233, E 27.09000	25	7	2
4	р. Горынь, н. п. Хорск, Столинский р-н	N 52.108533, E 27.266667	15	5	2
5	р. Случь, н. п. Логвощи, Житковичский р-н	N 52 079167, E 27 82545	17	6	2
6	р. Ствига, н. п. Озераны, Житковичский р-н	N 52.0426, E 27.842833	18	6	2
7	р. Припять, н. п. Черничи, Житковичский р-н	N 52.079125, E 27.823867	21	6	2
8	р. Скрипница, н. п. Кольцо, Житковичский р-н	N 52.12625, E 27.863133	29	7	2
9	Микашевичский канал, н. п. Гряда, Лунинецкий р-н	N 52.188367, E 27.377233	15	5	2
10	Ситнецкий канал, н. п. Ситнеца, Лунинецкий р-н	N 52.1845, E 27.3607	23	7	2
11	р. Лань, н. п. Островно, Лунинецкий р-н	N 52.210817, E 27.241833	21	6	2
12	р. Смердь, н. п. Лахва, Лунинецкий р-н	N 52.20115, E 27.103867	17	6	2
13	р. Цна, н. п. Кожан-Городок, Лунинецкий р-н	N 52.20145, E 27.010583	22	7	2
14	р. Бобрик, н. п. Березцы, Пинский р-н	N 52.192367, E 26.611567	31	8	1

Примечание. N – общее количество таксономических групп, EVI – модифицированный индекс Вудивисса.

Из табл. 4 видно, что экологическое качество воды на всех станциях отбора проб заказника «Средняя Припять» остается на хорошем и высоком уровнях класса чистоты.

**Угам-Чаткальский государственный природный национальный парк** был создан в 1990 г. на горных отрогах Западного Тянь-Шаня с целью сохранения горно-арчовых лесов, экосистем и редких видов животных и растений. В Узбекистане исследования водной биоты, в том числе макрозообентоса, выполнены на охраняемой территории горной и предгорной зон УЧГПНП в летний период 2022 г. Отбор проб макрозообентоса произведен на пяти основных реках и их притоках: Пскем, Чаткал, Коксу, Угам и Чирчик, которые являются фоновыми (МБИ – очень чистые и чистые) водотоками и не испытывают существенного антропогенного влияния. Идентификация видового состава макрозообентоса для оценки экологического качества воды пяти основных рек УЧГПНП представлена в табл. 5.

Таблица 5. Видовой состав макрозообентоса основных рек Угам-Чаткальского государственного природного национального парка

Table 5. Species composition of macrozoobenthos of the main rivers of the Ugam-Chatkal State Natural National Park

Видовой состав и уровень идентификации таксономических групп	р. Пскем	р. Чаткал	р. Коксу	р. Угам	р. Чирчик (верховье)
<b>Plecoptera (до рода)</b>					
<i>Diura knowltoni</i> (Frison, 1937)		+			
<i>Eucapnopsis stigmatica transversa</i> Aubert, 1959				+	
<i>Eucapnopsis</i> sp.	+				
<i>Mesoperlina pecirkai</i> (Klapálek, 1921)	+				
<i>Nemoura flexuosa</i> Aubert, 1949		+			
<b>Ephemeroptera (до рода)</b>					
<i>Acentrella</i> sp.	+	+		+	
<i>Ameletus alexandrae</i> Brodsky, 1930	+		+	+	
<i>Baetis rhodani</i> (Pictet, 1843)	+	+	+	+	
<i>Baetis stipposus</i> Kluge, 1982				+	
<i>Baetis vardarensis</i> Ikonomov, 1962	+				
<i>Caenis hissari</i> Kluge, 1985				+	
<i>Cloeon</i> sp.				+	
<i>Ecdyonurus rubrofasciatus</i> Brodsky, 1930	+			+	
<i>Ephemerella (D.) cryptomeria</i> Imanishi, 1937	+	+		+	
<i>Ephemerella ignita</i> (Poda, 1761)	+			+	
<i>Epiorus</i> sp. 1		+			
<i>Heptagenia sulfurea</i> (Müller, 1776) sp. 1		+			
<i>Heptagenia sulfurea</i> sp. 2		+			
<i>Iron kirgizikus</i> Kustareva, 1984	+			+	
<i>Iron montanus</i> Brodsky, 1930	+				
<i>Iron sinespinosus</i>	+				
<i>Iron</i> sp.	+			+	
<i>Rhithrogena</i> sp.	+	+			
<b>Trichoptera (до рода)</b>					
<i>Agapetus</i> sp.	+			+	
<i>Branchycentrus</i> sp.	+			+	
<i>Dinartrium reductum</i> Martinov, 1915	+		+	+	
<i>Drusus</i> sp. 1		+			
<i>Hydropsyche ornatulla</i> McLachlan, 1878	+			+	
<i>Leptociridae</i> gen. sp.	+			+	
<i>Mystrophora altaica</i> Martinov, 1934			+	+	
Trichoptera sp.		+			

Продолжение табл. 5

Видовой состав и уровень идентификации таксономических групп	р. Пскем	р. Чаткал	р. Коксу	р. Угам	р. Чирчик (верховье)
<b>Diptera (до семейства)</b>					
<i>Chironomus</i> sp. 1		+			
<i>Chironomus</i> sp. 3		+			
<i>Chironomus</i> sp. 6		+			
<i>Chironomus</i> sp. 7		+			
<i>Chironomus plumosus</i> (Linnaeus, 1758)					+
<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meigen, 1818)			+		+
<i>Cricotopus silvestris</i> (Fabricius, 1794)				+	
<i>Cryptochironomus</i> sp.					+
<i>Eukiefferiella alpestris</i> Goetghebuer, 1934			+		+
<i>Eukiefferiella clypeata</i> (Kieffer, 1923)	+				
<i>Eukiefferiella</i> sp. ( <i>hospita</i> )	+				
<i>Eukiefferiella</i> sp. ( <i>popovae</i> ) Chernovskij, 1949?	+			+	
<i>Eukiefferiella similis</i> Goetghebuer, 1939	+				
<i>Eukiefferiella</i> sp. 2	+				
<i>Albabesmiya pecteniphora</i>	+		+		
<i>Antocha</i> sp.			+	+	
Athericidae sp.		+			
<i>Atherix basilica</i> Nagatomi, 1934		+			
<i>Atherix</i> sp.	+			+	
<i>Bezzia flavicornis</i> (Staeger, 1839)			+		
<i>Blepharocera fasciata</i> Westwood, 1842	+				
<i>Blepharocera</i> sp.				+	
<i>Chrysomelida</i> sp.		+			
<i>Chrysops</i> sp.				+	
<i>Deuterophlebia mirabilis</i> Edwards, 1922	+				
<i>Diamesa pancratovae</i> Makarchenko & Bulgakov, 1986	+				
<i>Diamesa</i> sp.					+
<i>Dicranomyia bimaculata</i> (Schummel, 1829)		+		+	
<i>Dicranomyia</i> sp.					+
<i>Heptagia</i> sp.	+				
<i>Lauteborniella</i> sp.	+				
<i>Melanochelia</i> sp.	+				
<i>Ochthera</i> sp.		+			
<i>Ortocladius</i> sp.	+			+	
<i>Oxycera</i> sp.				+	
<i>Rheotanytarsus exiguus</i> Johannsen, 1905		+			
<i>Simuliidae</i> gen. sp.	+	+		+	
<i>Syndiamesa</i> sp.	+				
<i>Tabanus</i> sp.		+			
<i>Tanytarsus exiguus</i> (Johannsen, 1905)					+
<i>Tanytarsus gr. mancus</i> V. D. Wulp					+
<i>Thienemanniella fusca</i> Kieffer, 1911				+	
<i>Tipula</i> sp.				+	
<b>Crustacea (до рода)</b>					
<i>Gammarus lacustris</i> G. O. Sars, 1864		+		+	+
<i>Ostracoda</i> sp.					+
<b>Coleoptera (до рода)</b>					
<i>Coleoptera</i> sp. 2 (imago)		+			
<i>Donacia crassipes</i> Fabricius, 1775		+			
<i>Dytiscus</i> sp. (larvae)		+			

Окончание табл. 5

Видовой состав и уровень идентификации таксономических групп	р. Пскем	р. Чаткал	р. Коксу	р. Угам	р. Чирчик (верховье)
<i>Esolus</i> sp.	+			+	
<i>Gyrinys</i> sp.			+		
<i>Hydrochara caraboides</i> (Linnaeus, 1758) (imago)		+			
<i>Hydroporus</i> sp. (larvae)		+			
<i>Platambus maculatus</i> (Linnaeus, 1758) (imago)		+			
<b>Mollusca</b> (до рода)					
<i>Lymnaea ovata</i> Draparnaud, 1805					+
<i>Lymnaea truncatula</i> (O. F. Müller, 1774)					+
<i>Physa acuta</i> (Draparnaud, 1805)					+
<i>Pisidium amnicum</i> (O. F. Müller, 1774)					+
<b>Hydrachnidae</b> (до семейства)					
<i>Hydrodroma</i> sp.		+			
<i>Lebertia lineata</i> Thor, 1906	+				
<b>Oligochaeta</b> (до класса)					
<i>Eiseniella tetraedra</i> (Savigny, 1826)					+
<i>Lumbriculus variegatus</i> (O. F. Müller, 1774)					+
<i>Nais behningi</i> Michaelsen, 1923			+		
<i>Nais elinguis</i> Müller, 1774					+
<i>Pristina</i> sp.					+
<i>Tubifex</i> sp.					+
<b>Nematoda</b> (до класса)					
<i>Nematoda</i> gen. sp.					+
<b>Turbellaria</b>					
<i>Polycelis</i> sp.	+			+	
<b>Количество НОТ</b>	<b>38</b>	<b>31</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>20</b>

Примечание. НОТ – низшие определяемые таксоны.

На основании видового состава таксономических групп и их индикаторной значимости рассчитаны значения модифицированного индекса Вудивисса на изученных реках УЧГПНП (табл. 6).

Таблица 6. Экологическое качество воды рек Угам-Чаткальского государственного природного национального парка

Table 6. Ecological water quality of the rivers of the Ugam-Chatkal State Natural National Park

№ ст.	Река	Координаты	N	EVI	Класс чистоты
1	р. Пскем, исток	N 41.981214, E 70.607586	29	9	1
2	р. Чаткал, ниже Чаткальской ГЭС	N 42.023333, E 70.350556	30	10	1
3	р. Коксу, выше гостиницы	N 41.6154, E 70.114322	11	6	2
4	р. Угам, выше п. Хумсан	N 41.710906, E 69.934972	29	9	1
5	р. Чирчик	–	18	5	2

Примечание. N – общее количество таксономических групп, EVI – модифицированный индекс Вудивисса.

Из табл. 6 видно, что экологическое качество воды на всех станциях отбора проб УЧГПНП остается на хорошем и высоком уровнях класса чистоты. Реки Пскем, Чаткал, Коксу, Угам и Чирчик (верховье) являются фоновыми водотоками, расположенными в горной и предгорной зонах на охраняемой территории УЧГПНП, поэтому не испытывают существенного антропогенного влияния.



**Заклучение.** Проведенные на территории заказника «Средняя Припять» исследования позволили выявить 121 НОТ, относящийся к трем типам беспозвоночных разных видов и форм: Mollusca – 21, Annelida – 8 и Arthropoda – 92.

Наибольшая численность макрозообентосных организмов была отмечена для р. Ясельда (331 экз.), наименьшая – для р. Ствига (67 экз.), средняя численность водных животных в изученных реках составила 152,9 экз.

Были выявлены следующие чужеродные виды: моллюск *Lithoglyphus naticoides* (C. Pfeiffer, 1828) и ракообразные *Chelicorophium curvispinum* Sars, 1895; *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894); *Echinogammarus ischnus* (Stebbing, 1898); *Obesogammarus crassus* (Sars, 1894) и *Limnomysis benedeni* Czerniavsky, 1882.

Обнаружены также охраняемые в Беларуси виды: жесткокрылый двуполосный подводень *Graphoderes bilineatus* (De Geer, 1774); стрекоза *Gomphus flavipes* Charpentier, 1825; дедка желтоногий. Охраняемыми и включенными в красные книги и красные списки ряда стран Европы оказались 11 видов: *Physa fontinalis* (Linnaeus, 1761); *Segmentina nitida* (O. F. Müller, 1774); *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758); *Calopteryx splendens* (Harris, 1782); *Platycnemis pennipes* (Pallas, 1771); *Gomphus flavipes* (Charpentier, 1825); *Orthetrum cancellatum* (Linnaeus, 1758); *Plea minutissima* (Leach, 1817); *Cymatia coleoptrata* (Fabricius, 1777); *Haliphus fulvus* (Fabricius, 1801); *Graphoderes bilineatus* (De Geer, 1774).

Из числа важнейших индикаторных групп на территории заказника «Средняя Припять» не были обнаружены представители веснянок (Plecoptera) как одной из наиболее значимых индикаторных групп. Поденки (Ephemeroptera), следующая по значимости группа макрозообентоса, отмечены для 2 станций отбора проб; ручейники (Trichoptera), третья по значимости индикаторная группа, – для 13 из 14 изученных станций.

На территории УЧГПНП водные сообщества макрозообентоса развиваются на обследованных участках умеренно хорошо и представлены холодноводными, высокогорными и реофильными видами организмов. В пробах макрозообентоса исследованных водотоков охраняемой территории УЧГПНП в летний сезон (июль 2022 г.) было отмечено всего 97 видов организмов из 73 родов, относящихся к 12 таксонам (отряд, класс, семейство). Экологическое состояние оценивается в основном как АБ (Ф) – фоновое экологическое состояние, при котором биоценозы находятся в состоянии метаболического и экологического прогресса и представлены комплексом видов, отражающих естественный (ненарушенный) генофонд региона.

Наибольшее биоразнообразие бентосных организмов в летний период было отмечено для рек Пскем (38 НОТ), Угам (33 НОТ) и Чаткал, ниже Чаткальской ГЭС (31 НОТ), а наименьшее – для р. Кокса, выше гостиницы (11 НОТ) и р. Чирчик, верховье (20 НОТ). Представители веснянок (Plecoptera) – наиболее значимая индикаторная группа – выявлены в первых трех реках, поденки (Ephemeroptera) и ручейники (Trichoptera) – в четырех, включая р. Кокса. Только в верховье р. Чирчик не выявлены наиболее значимые индикаторные группы организмов.

Как отмечалось выше, экологическое качество воды на всех станциях отбора проб (как белорусских, так и узбекских) остается на хорошем и высоком уровнях класса чистоты. Модифицированный индекс Вудивисса имеет значение 5 только для двух станций отбора проб на территории заказника «Средняя Припять» (Беларусь) и для одной на р. Чирчик (верховье, лето) УЧГПНП (Узбекистан). Река Чирчик имела наименьшее количество таксономических групп макрозообентоса и самое низкое значение модифицированного индекса Вудивисса. Это обусловлено отсутствием важных индикаторных групп – веснянок, поденок и ручейников, так как в этот момент происходит усиленный забор воды для сельскохозяйственных нужд и, как следствие, обмеление и прогрев водной массы (26–30 °С), повышение трофности и обеднение биоразнообразия бентофауны в целом.

Таким образом, универсальный характер модифицированного индекса Вудивисса для оценки экологического качества речных экосистем позволяет использовать его в сравнительных целях как для равнинных, так и для горно-предгорных речных экосистем.

**Благодарности.** Исследование выполнено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках научно-исследовательской работы «Оценить экологическое качество (экологический статус) речных экосистем и провести сравнительный анализ их состояния на основе биотических индексов с использованием индикаторных групп гидробионтов (макрозообентос) на особо охраняемых природных территориях в условиях Беларуси и Узбекистана» (договоры № B21UZBG-027 (Беларусь), № MRB-2021-545 (Узбекистан)).

**Acknowledgements.** The study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research as part of the research work “Assess the ecological quality (ecological status) of river ecosystems and carry out a comparative analysis of their state on the basis of biotic indices using indicator groups of hydrobionts (macrozoobenthos) in specially protected natural areas in the conditions of Belarus and Uzbekistan” (agreements No. B21UZBG-027 (Belarus), No. MRB-2021-545 (Uzbekistan)).

### Список использованных источников

- Hassal, A. N. A microscopic examination of the water supplied to the inhabitants of London and the suburban districts / A. N. Hassal. – London: Samuel Highley, 1850. – 69 p.
- Knopp, H. Ein neuer Weg zur Darstellung biologischer Vorfluteruntersuchungen, erläutert an einem Gutelangsschnitt des Maines / H. Knopp // Wasserwirtschaft. – 1954. – Bd. 45. – S. 9–15.
- Knopp, H. Grundsätzliches zur Frage biologischer Vorfluterungen erläutert an einem Gutelangsschnitt des Mains / H. Knopp // Arch. Hydrobiol. – 1955. – Bd. 3/4, Suppl. 22. – S. 363–368.
- Liebmann, H. Handbuch der Frischwasser und Adwasserbiologie / H. Liebmann. – Munich: R. Oldenburg, 1951. – Bd. 1. – 539 S.
- Sládeček, V. System of water quality from the biological point of view / V. Sládeček. – Stuttgart: Schweizerbart, 1973. – 218 p.
- Zelinka, M. Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer / M. Zelinka, P. Marvan // Arch. Hydrobiol. – 1961. – Bd. 57, N 3. – S. 389–407.
- Shannon, C. E. A mathematical theory of communication / C. E. Shannon // Bell Syst. Tech. J. – 1948. – Vol. 27. – P. 379–423.
- Woodiwiss, F. S. The biological system of stream classification used by the Trent River board / F. S. Woodiwiss // Chem. Industry. – 1964. – Vol. 11. – P. 443–447.
- Охрана окружающей среды и природопользование. Аналитический контроль и мониторинг. Правила определения экологического (гидробиологического) статуса речных экосистем: ТКП 17.13-10-2013 (02120) (Рабочий проект, третья редакция). – Минск: Минприроды, 2017. – 13 с.
- Байчоров, В. М. Экологическое качество воды трансграничных рек Полесского региона (Беларусь – Украина) / В. М. Байчоров, Ю. Г. Гигиняк // Проблемы Полесья: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, сентябрь 2016 г. – Минск, 2016. – С. 76–79.
- Мороз, М. Д. Видовой состав водных беспозвоночных трансграничных водотоков между Беларусью и Литвой / М. Д. Мороз, В. М. Байчоров, Ю. Г. Гигиняк // Природ. ресурсы. – 2017. – № 1. – С. 47–53.
- Мороз, М. Д. Фауна водных беспозвоночных водотоков Национального парка «Беловежская пуца» / М. Д. Мороз, В. М. Байчоров, Ю. Г. Гигиняк // Журн. БГУ. Биология. – 2017. – № 3. – С. 68–75.
- Байчоров, В. М. Оценка экологического состояния речных экосистем от воздействия городских стоков на основе индикаторных групп макрозообентоса / В. М. Байчоров, Ю. Г. Гигиняк // Актуальные проблемы охраны животного мира в Беларуси и сопредельных регионах: материалы I Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 15–18 окт. 2018 г. / ред.: А. В. Кулак [и др.]. – Минск, 2018. – С. 44–49.
- Мороз, М. Д. Видовой состав водных беспозвоночных реки Виляя / М. Д. Мороз, В. М. Байчоров, Ю. Г. Гигиняк // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 401–408.
- Ҳарфи [Электронный ресурс] // Ўзбекистон миллий энциклопедияси. – Режим доступа: [https://n.ziyouz.com/books/uzbekiston\\_milliy\\_ensiklopediyasi/O'zbekiston%20Milliy%20Ensiklopediyasi%20-%20G%20harfi.pdf](https://n.ziyouz.com/books/uzbekiston_milliy_ensiklopediyasi/O'zbekiston%20Milliy%20Ensiklopediyasi%20-%20G%20harfi.pdf). – Дата доступа: 15.09.2024.
- Тальских, В. Н. Пространственные и временные сукцессии в разнотипных пресноводных биогеоценозах горных заповедников Центральной Азии / В. Н. Тальских // Тр. Чаткал. биосфер. гос. заповедника. – Ташкент, 2004. – Вып. 5. – С. 4–18.
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy // Offic. J. Eur. Commun. – 2000. – L 327. – P. 1–72.
- Водный кодекс Республики Беларусь [Электронный ресурс] // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – Режим доступа: <http://www.pravo.by/document/?guid=12551&p0=Hk1400149&p1=1>. – Дата доступа: 12.07.2023.
- Булгаков, Г. П. Принципы оценки качества текучих вод Узбекистана с помощью МБИ / Г. П. Булгаков // Тр. Среднеазиат. науч.-исслед. гидрометеорол. ин-та. – 1989. – Вып. 135 (216). – С. 13–21.
- Попченко, В. И. Мониторинг макрозообентоса / В. И. Попченко, Г. П. Булгаков, В. Н. Тальских // Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем / под ред. В. А. Абакумова. – СПб., 1992. – С. 64–103.
- Вудивис, Ф. Биотический индекс р. Трент. Макробиологические и биологические обследования / Ф. Вудивис // Научные основы контроля качества поверхностных вод по гидробиологическим показателям / ред. В. А. Абакумов. – Л., 1977. – С. 132–161.

## References

1. Hassal A. H. *A microscopic examination of the water supplied to the inhabitants of London and the suburban districts*. London, Samuel Highley, 1850. 69 p.
2. Knopp H. Ein neuer Weg zur Darstellung biologischer Vorfluteruntersuchungen, erläutert an einem Gütelangsschnitt des Maines. *Die Wasserwirtschaft*, 1954, vol. 45, pp. 9–15.
3. Knopp H. Grundsätzliches zur Frage biologischer Vorfluterungen erläutert an einem Gütelangsschnitt des Mains. *Archiv für Hydrobiologie*, 1955, Bd. 3/4, Suppl. 22, pp. 363–368.
4. Liebmann H. *Handbuch der Frischwasser und Adwasserbiologie*. Munich, 1951, Bd. 1. 539 p.
5. Sládeček V. *System of water quality from the biological point of view*. Stuttgart, Schweizerbart, 1973. 218 p.
6. Zelinka M., Marvan P. Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie*, 1961, Bd. 57, N 3, pp. 389–407.
7. Shannon C. E. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 1948, vol. 27, pp. 379–423.
8. Woodiwiss F. S. The biological system of stream classification used by the Trent River board. *Chemistry and Industry*, 1964, vol. 11, pp. 443–447.
9. *Environmental protection and nature management. Analytical control and monitoring. Rules for determining the ecological (hydrobiological) status of river ecosystems: TKP 17.13-10-2013 (02120) (Working draft, third edition)*. Minsk, Ministry of Natural Resources Publ., 2017. 13 p. (in Russian).
10. Baichorov V. M., Giginyak Yu. G. Ecological quality of water in transboundary rivers of the Polesie region (Belarus–Ukraine). *Problemy Poles'ya: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Minsk, sentyabr' 2016)* [Problems of Polesie: materials of the International scientific and practical conference, Minsk, September 2016]. Minsk, 2016, pp. 76–79 (in Russian).
11. Moroz M. D., Baichorov V. M., Giginyak Yu. G. The species composition of aquatic invertebrates of transboundary watercourses between Belarus and Lithuania. *Prirodnye resursy = Natural resources*, 2017, no. 1, pp. 47–53 (in Russian).
12. Moroz M. D., Baichorov V. M., Giginyak Yu. G. Fauna of aquatic invertebrate watercourses of the National Park “Belovezhskaya Pushcha”. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Journal of the Belarusian State University. Biology*, 2017, no. 3, pp. 68–75 (in Russian).
13. Baichorov V. M., Giginyak Yu. G. Assessment of the ecological state of river ecosystems from the impact of urban runoff based on indicator groups of macrozoobenthos. *Aktual'nye problemy okhrany zhitvotnogo mira v Belarusi i sopredel'nykh regionakh: materialy I Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, Minsk, Belarus', 15–18 oktyabrya 2018 goda* [Current challenges in Belarus and adjacent regions wildlife protection: materials of the I International scientific and practical conference, Minsk, Belarus, October 15–18, 2018]. Minsk, 2018, pp. 44–49 (in Russian).
14. Moroz M. D., Baichorov V. M., Giginyak Yu. G. Fauna of aquatic invertebrates of the Viliya river. *Vesti Natsyyanal'nai akademii nauk Belarusi. Seryya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 4, pp. 401–408 (in Russian).
15. Harfi. National encyclopedia of Uzbekistan. Available at: [https://n.ziyouz.com/books/uzbekiston\\_milliy\\_ensiklopediyasi/O'zbekiston%20Milliy%20Ensiklopediyasi%20-%20G%20harfi.pdf](https://n.ziyouz.com/books/uzbekiston_milliy_ensiklopediyasi/O'zbekiston%20Milliy%20Ensiklopediyasi%20-%20G%20harfi.pdf) (accessed 15.09.2024) (in Azerbaijan).
16. Tal'skikh V. N. Spatial and temporal succession in different types of freshwater biohydrocenoses of mountain reserves of Central Asia. *Trudy Chatkal'skogo biosfernogo gosudarstvennogo zapovednika* [Proceedings of the Chatkal Biosphere State Reserve]. Tashkent, 2004, iss. 5, pp. 4–18 (in Russian).
17. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Community*, 2000, L 327, pp. 1–72.
18. Water Code of the Republic of Belarus. *National legal Internet portal of the Republic of Belarus*. Available at: <http://www.pravo.by/document/?guid=12551&p0=Hk1400149&p1=1> (accessed 15.07.2023) (in Russian).
19. Bulgakov G. P. Principles for assessing the quality of flowing waters in Uzbekistan using MBI. *Trudy Sredneaziatskogo nauchno-issledovatel'skogo gidrometeorologicheskogo instituta* [Proceedings of the Central Asian Research Hydrometeorological Institute], 1989, vol. 135 (216), pp. 13–21 (in Russian).
20. Popchenko V. I., Bulgakov G. P., Tal'skikh V. N. Monitoring of macrozoobenthos. *Rukovodstvo po gidrobiologicheskomu monitoringu presnovodnykh ekosistem* [Guide to hydrobiological monitoring of freshwater ecosystems]. Saint Petersburg, 1992, pp. 65–103 (in Russian).
21. Vudivis F. Biotic index of the river. Trent. Macroinvertebrates and biological examination. *Nauchnye osnovy kontrolya kachestva poverkhnostnykh vod po gidrobiologicheskim pokazatelyam* [Scientific principles of surface water quality control based on hydrobiological indicators]. Leningrad. 1977, pp. 132–161 (in Russian).

## Информация об авторах

Владимир Мухтарович Байчоров – 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

## 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

*Юрий Григорьевич Гигиняк* – 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

*Михаил Дмитриевич Мороз* – 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

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

*Егор Викторович Корзун* – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natrinx109@gmail.com

*Зури Асановна Мустафаева* – мл. науч. сотрудник. Институт зоологии Академии наук Республики Узбекистан (ул. Богишамол, 232б, 100053, г. Ташкент, Республика Узбекистан). E-mail: zuri05@mail.ru

*Наталья Ивановна Лебедева* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт зоологии Академии наук Республики Узбекистан (ул. Богишамол, 232б, 100053, г. Ташкент, Республика Узбекистан). E-mail: n\_lebedeva60@mail.ru

*Наталья Олеговна Титова* – мл. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт рыбоводства (г. Янгиюль, Республика Узбекистан). E-mail: narcissus14.07.1990@mail.ru

*Улугбек Тураевич Мирзаев* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, зам. дир. по науке. Институт зоологии Академии наук Республики Узбекистан (ул. Богишамол, 232б, 100053, г. Ташкент, Республика Узбекистан). E-mail: umirzayev@gmail.com

*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

*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

*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

*Yahor 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: natrinx109@gmail.com

*Zuri A. Mustafayeva* – Junior Researcher. Institute of Zoology of the Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan (232b, Bogishamol Str., 100053, Tashkent, Republic of Uzbekistan). E-mail: zuri05@mail.ru

*Natalya I. Lebedeva* – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Zoology of the Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan (232b, Bogishamol Str., 100053, Tashkent, Republic of Uzbekistan). E-mail: n\_lebedeva60@mail.ru

*Natalya O. Titova* – Junior Researcher. Scientific Research Institute of Fish Farming (Yangiyul, Republic of Uzbekistan). E-mail: narcissus14.07.1990@mail.ru

*Ulugbek T. Mirzaev* – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher, Deputy Director for Science. Institute of Zoology of the Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan (232b, Bogishamol Str., 100053, Tashkent, Republic of Uzbekistan). E-mail: umirzayev@gmail.com