

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2025. Т. 70, № 2

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2025. Т. 70, № 2

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

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

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

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

Главный редактор

Олег Юрьевич Баранов – Отделение биологических наук Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

- А. В. Кильчевский** (*заместитель главного редактора*) – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
М. Е. Никифоров (*заместитель главного редактора*) – Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь
Т. В. Смирнова (*ведущий редактор журнала*) – Издательский дом «Беларуская навука» Минск, Республика Беларусь
З. М. Алещенкова – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
И. Д. Волотовский – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
А. Е. Гончаров – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

- В. В. Демидчик** – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, 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

Редакционный совет

- В. Ф. Багинский** – Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь
- А. Баршевский** – Даугавпилский университет, Даугавпилс, Латвийская Республика
- В. Е. Гайдук** – Брестский государственный университет имени А. С. Пушкина, Брест, Республика Беларусь
- Ю. Ю. Дгебуадзе** – Институт проблем экологии и эволюции имени 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 имени К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
- В. Олех-Пясэцка** – Варшавский университет естественных наук, Варшава, Республика Польша
- О. Н. Пугачев** – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- А. И. Рапопорт** – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвийская Республика
- И. А. Тихонович** – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Адрес редакции:

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

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2025. Т. 70, № 2.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *Т. В. Смирнова*

Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 09.04.2025. Выход в свет 25.04.2025. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 68 экз. Заказ 73.

Цена номера: индивидуальная подписка – 14,48 руб., ведомственная подписка – 33,64 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, 2025

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2025, vol. 70, no. 2

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

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

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

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

Editor-in-Chief

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

Tatsiana V. Smirnova (*Leading Editor*) – Publishing House “Belaruskaya Navuka”, Minsk, Republic of Belarus

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

Vadim V. Demidchik – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, 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

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 – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany 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 Latvia
Yuri Yu. Dgebuadze – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Vasiliy E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus
Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazov 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, Republic of Latvia
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, 2025, vol. 70, no. 2.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *T. V. Smirnova*
Computer imposition *Yu. A. Aheichyk*

Sent for press 09.04.2025. Output 25.04.2025. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 68 copies. Order 73.
Number price: individual subscription – 14.48 byn., departmental subscription – 33.64 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: 40, F. Skorina Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE “Publishing House “Belaruskaya Navuka”,
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2025

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

ЗМЕСТ

Доманская И. Н., Артемчук Я. Н., Гордиенко С. С., Молчан О. В., Кабашникова Л. Ф. Активность фотосинтетических мембран в инфицированных <i>Fusarium oxysporum</i> растениях огурца (<i>Cucumis sativus</i> L.) при разной доле синего светодиодного освещения	95
Чижик О. В., Мазур Т. В., Кардаш Е. Б. Влияние элиситоров на физиолого-биохимические показатели вегетативных органов брусники обыкновенной	108
Никифоров М. Е., Дашевская Л. О., Гомель К. В., Волнистый А. А., Шагова Т. Г., Кайгородова Л. И., Белявский Д. А., Жалова Д. А., Гецевич Ю. С. Определение видов птиц Беларуси с помощью нейросетевого анализа вокализаций: особенности подготовки данных и обучения модели (на англ. яз.)	118
Молчан В. О., Гомель К. В., Никифоров М. Е. Гибриды волка и собаки в Беларуси: идентификация и оценка частоты встречаемости	125
Муратова А. А., Охремчук А. Э., Валентович Л. Н. Особенности структурно-функциональной организации генома бактерии <i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i> 8 – возбудителя угловатой пятнистости листьев огурца	135
Гузова Е. В., Гавричков А. А., Ильюшёнок И. Н., Романовская Т. В., Лиховец М. А., Скакун В. В., Яцков Н. Н., Гринев В. В. Влияние сохраняемых интронов на кодирующий потенциал молекул РНК в лейкозных клетках человека	146
Кулеш В. Ф., Гигиняк Ю. Г. Размножение сибирского шримса <i>Exopalaemon modestus</i> (Heller) из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан) в аквакультуре	161
Скуратович Е. Г., Сливинска К. Первая регистрация бранхиобделлиды <i>Branchiobdella pentadonta</i> Whitman, 1882 (Annelida) в Беларуси	169

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

CONTENTS

Domanskaya I. N., Artemchuk Y. N., Gordienko S. S., Molchan O. V., Kabashnikova L. F. Activity of photosynthetic membranes in <i>Fusarium oxysporum</i> -infected cucumber (<i>Cucumis sativus</i> L.) plants under different proportions of blue LED illumination	95
Chizhik O. V., Mazur T. V., Kardash E. B. Elicitor's influence on the physiological and biochemical indexes of the <i>Vaccinium vitis idaea</i> L. vegetative organs	108
Nikiforov M. E., Dashevskaya L. O., Homel K. V., Valnisty A. A., Shagova T. G., Kaigorodova L. I., Belyavsky D. A., Zhalova D. A., Getsevich Yu. S. Belarusian bird acoustic recognition: data preparation and model training process	118
Molchan V. O., Homel K. V., Nikiforov M. E. Wolf-dog hybrids in Belarus: identification and rate estimation ...	125
Muratova A. A., Akhremchuk A. E., Valentovich L. N. Special aspects of structural and functional organization of the genome of <i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i> 8: a causative agent of angular leaf spot of cucumber	135
Huzava K. V., Gavrichkov A. A., Ilyushonak I. M., Ramanouskaya T. V., Likhavets M. A., Skakun V. V., Yatskou M. M., Grinev V. V. Effect of retained introns on the coding potential of RNA molecules in human leukemia cells	146
Kulesh V. F., Hihiniak Yu. G. Reproduction of Siberian shrimp <i>Exopalaemon modestus</i> (Heller) from the Kapchagai reservoir (Republic of Kazakhstan) in aquaculture	161
Skuratovich E. G., Śliwińska K. First record of <i>Branchiobdella pentadonta</i> Whitman, 1882 (Annelida) in Belarus	169

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.4:635.63:577.352.38

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-95-107>

Поступила в редакцию 21.11.2024

Received 21.11.2024

И. Н. Доманская¹, Я. Н. Артемчук¹, С. С. Гордиенко¹, О. В. Молчан², Л. Ф. Кабашникова¹¹Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь²Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь**АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАН В ИНФИЦИРОВАННЫХ
FUSARIUM OXYSPORUM РАСТЕНИЯХ ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS* L.)
ПРИ РАЗНОЙ ДОЛЕ СИНЕГО СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ**

Аннотация. Исследовано влияние LED-освещения с разной долей (20 и 60 %) синего света (СС) и разной длительности на функционирование фотосистем (ФС) в здоровых и инфицированных грибом *Fusarium oxysporum* (*Fus. oxy.*) листьях огурца. Длительный световой режим (25 дней) с высокой долей СС, 60 % и последующее заражение *Fus. oxy.* подавляло функциональную активность ФСII относительно белого света (БС), что выразилось в значительном снижении максимальной флуоресценции временно закрытых реакционных центров ФСII (F_m), эффективного квантового выхода фотохимических реакций (F_v/F_m), максимальной квантовой эффективности ФСII ($Y(II)$), а также в изменении характера перераспределения поглощенной световой энергии. Это привело к снижению интенсивности фотохимической конверсии (qP), количества открытых реакционных центров ФСII (qL) и скорости транспорта электронов через ФСII (ETR(II)). При 7-дневной экспозиции растений в разных световых условиях основные изменения параметров ФСII наблюдались только в инфицированных листьях, сформированных в режиме СС, 60 %.

Выращивание растений на БС и СС, 20 % лишь незначительно изменяло вклад потока электронов на донорной и акцепторной сторонах ФСI в инфицированных листьях огурца, не затронув уровень окисленности P700 и квантовый выход фотохимических реакций. Заражение растений, выращенных длительное время на СС, 60 %, вызывало 10-кратное снижение квантового выхода фотохимических реакций ФСI и существенное повышение нефотохимической диссипации энергии на донорной и акцепторной сторонах ФСI. Стрессовое воздействие патогена усиливало также подавляющий эффект СС, 60 % при короткой экспозиции, что нашло свое отражение в существенном уменьшении таких показателей, как квантовый выход ФСI ($Y(I)$) и эффективность переноса электронов в электрон-транспортной цепи ФСI (ETR(I)).

Полученные результаты могут быть использованы как методическая основа для создания энергосберегающих светодиодных светильников, оптимизированных для выращивания растений огурца в закрытом грунте, а также для контроля степени заражения растений на ранних стадиях фузариоза.

Ключевые слова: огурец, LED-освещение, синий свет, фотосистема I, фотосистема II, *Cucumis sativus* L., *Fusarium oxysporum*

Для цитирования: Активность фотосинтетических мембран в инфицированных *Fusarium oxysporum* растениях огурца (*Cucumis sativus* L.) при разной доле синего светодиодного освещения / И. Н. Доманская, Я. Н. Артемчук, С. С. Гордиенко [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 95–107. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-70-2-95-107>

Irina N. Domanskaya¹, Yana N. Artemchuk¹, Sofya S. Gordienko¹, Olga V. Molchan², Lyudmila F. Kabashnikova¹¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus²V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus**ACTIVITY OF PHOTOSYNTHETIC MEMBRANES IN *FUSARIUM OXYSPORUM*-INFECTED CUCUMBER (*CUCUMIS SATIVUS* L.) PLANTS UNDER DIFFERENT PROPORTIONS OF BLUE LED ILLUMINATION**

Abstract. The effect of LED illumination with different proportions of blue light (BL, 20 and 60 %) and different durations on the functionality of photosystems (PS) in healthy and infected with the fungus *Fusarium oxysporum* (*Fus. oxy.*) cucumber leaves was studied. Long-term exposure (25 days) to a light regime with a high share of BL, 60 % and subsequent infection with *Fus. oxy.*, suppressed the functional activity of PSII relative to white light (WL), which was reflected in a significant decrease in the maximum fluorescence of temporarily closed PSII reaction centers (F_m), the effective quantum yield of photochemical reactions (F_v/F_m), the maximum quantum efficiency of PSII ($Y(II)$), as well as in changes to the nature of the redistribution of absorbed light energy. This resulted in a decline in the intensity of photochemical conversion (qP), the number of open PSII reaction centers (qL) and the rate of electron transport through PSII (ETR(II)). During a 7-day exposure

of plants to different light conditions, the main changes in PSII parameters were observed only in infected leaves formed in the BL, 60 %.

Growing on WL and BL, 20 % only slightly changed the contribution of the electron flow on the donor and acceptor sides of PSI in infected cucumber leaves, without affecting the level of P700 oxidation and the quantum yield of photochemical reactions. Infection of plants grown for a long time on BL, 60 % caused a 10-fold decrease in the quantum yield of photochemical reactions of PSI and a significant increase in non-photochemical energy dissipation on the donor and acceptor sides of PSI. The stress effect of the pathogen also enhanced the suppressive effect of BL, 60 % at short exposure, which was reflected in a significant decrease of such parameters as the quantum yield of PSI (Y(I)) and the efficiency of electron transfer in the electron transport chain of PSI (ETR(I)).

The results obtained can be used as a methodological basis for the development of energy-saving LED light sources optimized for growing cucumber plants in closed soil, as well as for monitoring the degree of infection of plants in the early stages of *Fusarium* infection.

Keywords: cucumber, LED lighting, blue light, photosystem I, photosystem II, *Cucumis sativus* L., *Fusarium oxysporum*

For citation: Domanskaya I. N., Artemchuk Ya. N., Gordienko S. S., Molchan O. V., Kabashnikova L. F. Activity of photosynthetic membranes in *Fusarium oxysporum*-infected cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants under different proportions of blue LED illumination. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 95–107 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-70-2-95-107>

Введение. Свет является одним из основных факторов внешней среды, контролирующих рост и развитие растений. При этом значение имеет не только его интенсивность, но и спектральный состав. Чтобы свет определенной длины волны был воспринят растением, необходимо наличие фоторецепторов – пигмент-белковых комплексов, способных поглощать свет определенной области спектра. Существуют три известных класса фоторецепторов: фитохромы – обнаруживают свет в красном/дальнем красном (600–700 нм) диапазоне; криптохромы (CRY) – фоторецепторы синего света (~420–450 нм); фототропины – обнаруживают свет в синем и ультрафиолетовом (УФ) (320–500 нм) диапазонах [1]. Установлены три гена, которые кодируют белки CRY: CRY1, CRY2 и CRY3. Два из трех типов криптохромов являются основными: CRY1 и CRY2 [2, 3]. CRY1 – это рецептор УФ-А и синего света (СС), участвующий в реакции растений на УФ-В-радиацию [2], которая приводит к окислительному повреждению фотосинтетического аппарата [3]. Анализ экспрессии генов выявил регуляторную роль CRY2 в ответе на действие УФ-В [4, 5]. CRY2, напротив, деградирует даже при слабом освещении и участвует в фотопериодизме [3]. Криптохромы, поглощая специфическую синюю часть спектра и УФ, представляют часть фоторегуляторной системы растений, отвечающей за адаптацию фотосинтетического аппарата растений. Так, CRY1 участвует в ответной реакции *Arabidopsis thaliana* на свет высокой интенсивности [6, 7] и устойчивости ФСII к ультрафиолету [8]. Недавно была обнаружена гораздо большая разница по устойчивости к УФ-В у растений дикого типа и мутанта *Arabidopsis th.* CRY1CRY2, выращенных на СС, по сравнению с растениями, выращенными на белом свете (БС). При этом у таких растений CRY1CRY2 с СС регистрировали большее ингибирование активности ФСII и скорости фотосинтеза по сравнению с диким типом [5].

Научной основой новых биотехнологий защиты является выяснение механизмов стрессового ответа растений при инфицировании фитопатогеном. Патогены (вместе с травоядными насекомыми) представляют собой разрушительную угрозу для выживания и размножения культур. В процессе эволюции у растений выработались универсальные защитные механизмы для противостояния этим биотическими стрессорам [9]. В частности, они развили сложные защитные системы устойчивости против широкого спектра патогенов, часто именуемые в литературе иммунитетом растений [10]. Центральное место в этих системах занимает сложный обмен сигналами между хлоропластом и ядром. Предполагается, что для генерации иммуногенных сигналов растения должны отключать системы устойчивости к стрессу, в частности те, которые управляют образованием активных форм кислорода (АФК), в то время как патоген стремится повторно активировать эти системы для достижения вирулентности. Тем самым фитопатоген заставляет растение-хозяина подавлять иммуногенные сигналы хлоропластов и побуждает их к неадекватному иммунному ответу [9]. Патогены нарушают функцию хлоропластов как транскрипционно (секретируя эффекторы, которые изменяют экспрессию генов растений-хозяев, взаимодействуя с каскадами защитных киназ, транскрипционными факторами или самими промоторами), так и посттранскрипционно (доставляя эффекторы, которые проникают в хлоропласт или изменяют

локализацию растительных белков для модификации активности хлоропластов). Эти механизмы способствуют перестройке протеома хлоропластов и исходящих из них иммуногенных сигналов таким образом, что происходит беспрепятственное проникновение патогенной инфекции по растению [9].

Подобно культивируемым клеткам млекопитающих, воздействие синего и ультрафиолетового света стимулирует выработку АФК в алейроновых протопластах ячменя, что приводит к гибели клеток [11]. Точно так же свет запускает наработку избытка свободных радикалов порфирина, ответственного за гибель клеток растений кукурузы, мутантных по гену, кодирующему фермент уропорфириноген декарбоксилазу [12]. У *Arabidopsis th.* конститутивная гибель клеток, вызванная ответом на грибковые токсины или вирусные инфекции, зависит от света [13–16].

В исследованиях А. J. De Lussa с соавт. [17] были изучены антимикробные свойства светодиодов СС (470 нм) против бактерий с пищевым фотосенсибилизатором эритрозином или без него. Аликвоты *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus atrophaeus* или *Pseudomonas aeruginosa* подвергали воздействию источника 1 (0,2 мВт/см²) или источника 2 (80 мВт/см²) на чашках с питательным агаром, которые облучали немонахроматическим или монахроматическим СС (0–300 Дж/см²) соответственно. Инокулированные контрольные чашки инкубировали 48 ч и подсчитывали колонии. Также были определены противогрибковые свойства СС в сочетании с эритрозином в отношении конидий *Penicillium digitatum* и *Fusarium graminearum*. Авторы сделали вывод, что СС смертелен для бактерий и мицелиальных грибов, хотя эффективность его действия зависит от однородности света, уровня энергии и вида микроорганизмов.

В выяснении механизмов прямого действия СС на фитопатогенные микроорганизмы, а также роли фоторецепторов (и особенно криптохромов) в формировании устойчивости растений к патогенному заражению еще остается много вопросов. Относительно участия криптохромов в регуляции иммунного ответа растений полученные в настоящее время результаты весьма противоречивы. Показано, что мутанты *Arabidopsis th.* по криптохрому CRY1 не проявляли устойчивости к инфицированию *Pseudomonas syringae* или *Botrytis cinerea*. При этом L. Wu и H. Q. Yang [18] обнаружили более высокую устойчивость мутанта *Arabidopsis th.* CRY1 к инфицированию *Pseudomonas syringae*.

Одним из опаснейших патогенов являются грибы рода *Fusarium*, вызывающие фузариозы – болезни множества культурных растений. Ущерб, наносимый сельскому хозяйству этими грибами, огромен, поэтому снижение уровня заболеваемости растений (особенно в закрытом грунте) является важнейшим резервом увеличения продуктивности культур и повышения качества урожая. Опыты с мутантами *Arabidopsis th.*, дефицитными по CRY1, показали, что 77 генов, чувствительных к свету, регулируются с помощью CRY1 [6], при этом высокочувствительный к облучению фенотип показал фотоинактивацию ФСII, о чем свидетельствовало снижение максимального квантового выхода флуоресценции хлорофилла (Хл).

Цель данного исследования – прижизненное изучение функциональной активности фотосинтетических мембран в растениях огурца, выращенных при полноспектральном LED-освещении с разным соотношением и продолжительностью действия СС, а затем инфицированных грибным патогеном *Fus. oxu*.

Объекты и методы исследования. Эксперименты проведены с зелеными растениями огурца (*Cucumis sativus* L) сорта Кустовой, выращенными с фотопериодом 14 ч свет/10 ч темнота, при температуре 24 °С и влажности 65 % в грунте на основе торфа «Универсальный» (Terra Vita). Использовали LED-светильники, включающие все диапазоны физиологически активной радиации (от 400 до 800 нм) в различном соотношении. Растения огурца в стадии открытых семядольных листьев переносили на светодиодное освещение с разным соотношением и продолжительностью действия СС. Вариант «СС, 60 %» имел плотность потока фотонов (PPF) около 60 %, красный свет (КС) + дальний КС – 30 %, зеленый свет (ЗС) – 10 % при соотношении СС/КС = 3,7 (рис. 1, б). В варианте «СС, 20 %» доля СС составила 20 % от суммарного светового потока с добавлением источников КС + дальнего КС (70 %) и ЗС (10 %) при соотношении СС/КС = 0,32 (рис. 1, с). Контролем служили растения огурца, выращенные под белыми LED-светильниками (вариант «БС»), где доля СС (по PPF) составляла 27 % при соотношении СС/КС = 1,1 (рис. 1, а).

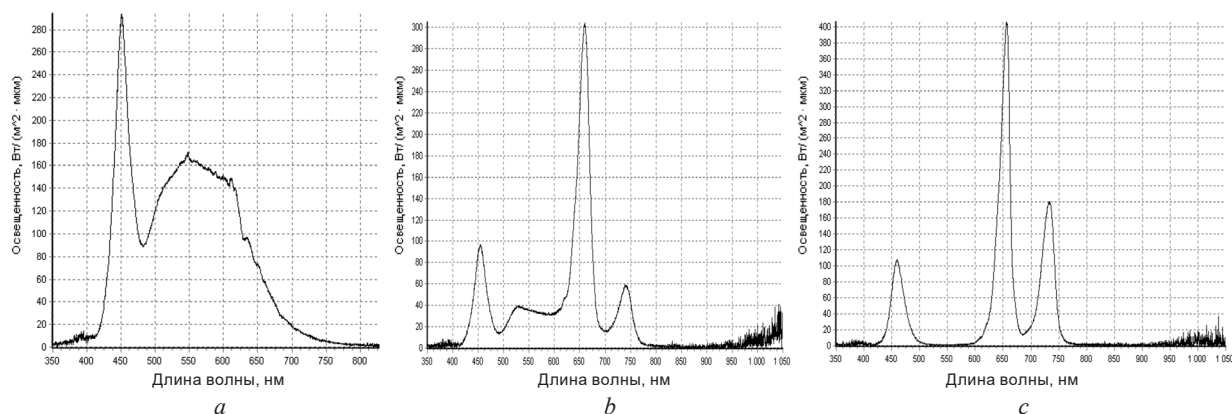


Рис. 1. Спектры излучения светодиодных светильников: *a* – вариант «БС»; *b* – «СС, 60 %»; *c* – «СС, 20 %»

Fig. 1. Emission spectra of LED lamps: *a* – option “WL”; *b* – “BL, 60 %”; *c* – “BL, 20 %”

Интенсивность света для всех трех вариантов освещения составляла примерно $100 \text{ мкмоль квантов/м}^2 \cdot \text{с}$. Патогенный гриб *Fus. oxu.* предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение двух недель. Искусственное инфицирование грибным патогеном *Fus. oxu.*, вызывающим фузариозное увядание огурцов, проводили путем опрыскивания растений суспензией спор (10^{-6} спор/мл) из расчета 5 мл/1 растение. Анализ листьев 1-го яруса проводили через 72 ч после заражения. Контролем служили растения трех вариантов, обработанные дистиллированной водой.

Активность ФСИ и ФСИИ определяли с помощью метода импульсно-модулируемой флуоресцентной спектроскопии (pulse-amplitude modulated fluorometry, PAM), позволяющей проводить прижизненную регистрацию кинетической кривой индукции флуоресценции Хл *a*. Измерения проводили на флуориметре Dual-PAM-100 (Heinz Walz, Германия) по методу [19, 20] Листья огурца предварительно адаптировали к темноте в течение 20 мин. Затем возбуждали фоновую флуоресценцию Хл (F_0) измерительным светом низкой интенсивности ($0,04 \text{ мкмоль квантов/м}^2 \cdot \text{с}$, 460 нм), модулированным с частотой 20 Гц. При включении актиничного света ($125 \text{ мкмоль квантов/м}^2 \cdot \text{с}$, 635 нм) интенсивность флуоресценции достигала максимальной величины F_m , затем снижалась за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному путям. Применение вспышки насыщающего света ($10\,000 \text{ мкмоль квантов/м}^2 \cdot \text{с}$, 635 нм) на фоне действия актиничного света приводило к увеличению интенсивности флуоресценции с величины F_0 до F_m' . После вспышки насыщающего света выключался актиничный свет и включался источник дальнего КС, возбуждающий только ФСИИ. При этом пул переносчиков электронов быстро и полностью окислялся. Величина флуоресценции достигала значения F_0' . По полученным значениям F_0 , F_0' , F_m , F_m' и F рассчитывали величину максимального (потенциального) квантового выхода фотохимических реакций ФСИИ – F_v/F_m ; величину эффективного квантового выхода ФСИИ – $Y(II)$; квантовые выходы нерегулируемого ($Y(NO)$) и регулируемого ($Y(NPQ)$) нефотохимического тушения флуоресценции Хл; коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции Хл (q_N) и NPQ, коэффициент фотохимического тушения флуоресценции Хл (q_P), показатель доли открытых реакционных центров (q_L) [20, 21]. Рассчитывали эффективность функционирования электрон-транспортной цепи или скорости транспорта электронов (ETR) по [21].

Прижизненные измерения фотохимической активности ФСИ проводили на флуориметре Dual-PAM-100 с двухволновым (830/875 нм) модулем регистрации флуоресценции P700 (реакционного центра ФСИ) согласно [20, 22]. Рассчитывали параметры фотохимической активности ФСИ: эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ETR ФСИ, величину P_m , характеризующую максимальную флуоресценцию P700, эффективный квантовый выход ФСИ – $Y(I)$ и параметры квантовых выходов нефотохимического тушения ФСИ – $Y(ND)$ и $Y(NA)$, характеризующие донорные ($Y(ND)$) и акцепторные ($Y(NA)$) свойства P700 [20]. В настоящее время параметры флуоресценции Хл рассчитываются автоматически, физический смысл каждого описан в литературе [23].

Для статистической обработки данных использовали стандартные пакеты программ Excel 2016, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [24]. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Различия по сравнению с контролем считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Эксперименты проведены на растениях огурца, которые были сформированы при LED-освещении различного спектрального состава (БС; СС, 20 % и СС, 60 %), а затем инфицированы грибом *Fus. oxu*. Использовали два варианта светодиодного освещения: длительное (25 дней) и короткое (7 дней). В первом варианте выращивали растения огурца на полихроматическом свете с разной долей квантов СС (20 и 60 %) с самого начала появления настоящих листьев до 25 дней, затем на 3 сут переносили на БС, предварительно инфицировав листья первого и второго ярусов патогенным грибом *Fus. oxu*. Во втором варианте растения огурца до 18 дней растили на БС с последующим переносом на LED-освещение с разными дозами СС (20 и 60 %) на 7 дней, после чего инфицировали патогенным грибом и помещали под БС светодиодных ламп на 3 сут. На рис. 2, а, б хорошо видно, что растения трех вариантов четко различаются по такому морфометрическому показателю, как общая длина. Известное из литературы увеличение высоты растений под влиянием СС наблюдали как при длительном, так и при коротком периоде роста под синими LED-светильниками с разными долями СС, что, вероятно, связано с отсутствием в них полноценной фитохромной системы, принимающей участие в регуляции ростовых процессов, либо опосредовано действием фототропинов, запускающих реакцию фототропизма [25]. Листья огурца в разных вариантах опыта отличались также по площади листовой пластинки и показателю удельной поверхностной плотности листа (УППЛ) [данные не приведены].

Для оценки состояния растения исследовали фотохимическую активность стрессочувствительной ФСII *in vivo* с помощью метода дифференциальной абсорбционной фотометрии (РАМ-флуориметрии) Хл а, позволяющей обнаружить нарушения первичных стадий фотосинтеза раньше визуальных последствий стресса [19–21]. Особенно важным обстоятельством является возможность непосредственного изучения параметров флуоресценции Хл в интактных листьях. В литературе описано, что одной из первичных мишеней действия биотических и абиотических факторов в цепи электронного транспорта является кислород-выделяющий комплекс ФСII [8, 26]. ФСII играет центральную роль на первых трех этапах фотосинтеза, в связи с чем показатели, отражающие эффективность работы ФСII, являются весьма существенными для

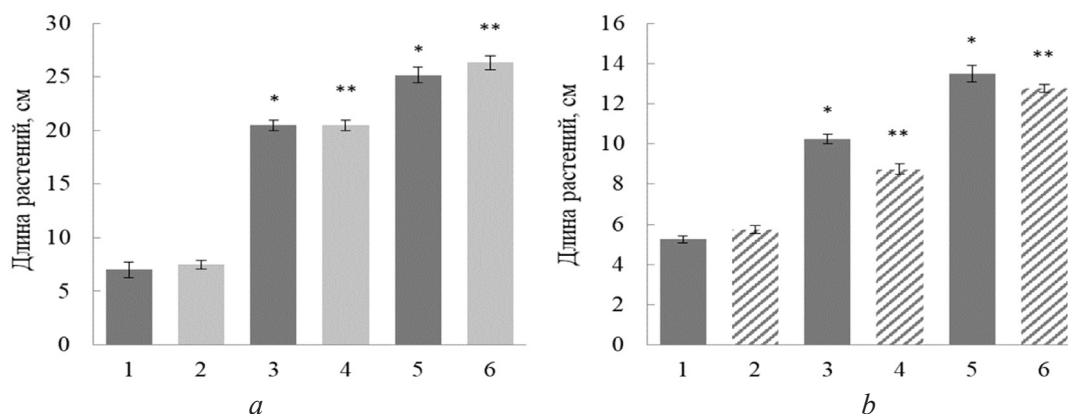


Рис. 2. Общая длина растений огурца, выращенных на БС; СС, 20 % и СС, 60 % в течение 25 (а) и 7 дней (б), а затем инфицированных *Fus. oxu*: 1 – БС – контроль (без обработки); 2 – контроль, зараженный *Fus. oxu*; 3 – СС, 20 %; 4 – СС, 20 % + *Fus. oxu*; 5 – СС, 60 %; 6 – СС, 60 % + *Fus. oxu*. * – достоверные различия между средними значениями вариантов 1, 3, 5 при $p < 0,05$; ** – достоверные различия между средними значениями вариантов 2, 4, 6 при $p < 0,05$

Fig. 2. Total length of cucumber plants grown on WL; BL, 20 % and BL, 60 % for 25 (a) and 7 days (b) and infected with *Fus. oxu*: 1 – WL – control (no treatment); 2 – control infected with *Fus. oxu*; 3 – BL, 20 %; 4 – BL, 20 % + *Fus. oxu*; 5 – BL, 60 %; 6 – BL, 60 % + *Fus. oxu*. * – significant differences between the mean values of options 1, 3, 5 at $p < 0.05$; ** – significant differences between the mean values of options 2, 4, 6 at $p < 0.05$

оценки всего аппарата фотосинтеза. В табл. 1 представлены абсолютные значения параметров переменной флуоресценции Хл, отражающие эффективность работы ФСII в листьях огурца, выращенных на БС; СС, 20 % и СС, 60 % с начала прорастания семян до 25 дней, а затем инфицированных патогеном.

Зарегистрирован приблизительно одинаковый уровень показателя F_m (вызванная насыщающим светом максимальная флуоресценция временно закрытых реакционных центров ФСII) для всех контрольных растений огурца и зараженных грибом образцов в вариантах с БС и СС, 20 %. Величина F_m , сниженная на 75 % относительно своего контроля в варианте «СС, 60 % + *Fus. oxy.*», свидетельствует о стрессовом состоянии ФСII. Показатель F_v/F_m отражает максимальную квантовую (потенциальную) эффективность ФСII, значения которой снижаются при повреждении фотосинтетической функции по разным причинам. Хорошо видно, что в здоровых листьях отсутствуют достоверные изменения потенциального квантового выхода фотохимических реакций (F_v/F_m) во всех вариантах опыта. Инфекция не изменила это соотношение в вариантах «БС + *Fus. oxy.*» и «СС, 20 % + *Fus. oxy.*», однако достоверно снизила F_v/F_m у растений, выращенных на СС, 60 %, на 36 % по сравнению с соответствующим контролем.

Одной из основных характеристик ФСII-комплексов является параметр $Y(II)$ или эффективный квантовый выход, характеризующий соотношение числа квантов, используемых в фотохимических превращениях, к общему числу поглощенных квантов в ФСII. В литературе [27] описана линейная зависимость между показателем $Y(II)$ и скоростью фиксации углекислого газа в процессе фотосинтеза. Как следует из табл. 1, параметр $Y(II)$ практически не изменяется в здоровых растениях, выращенных на LED-освещении с низкой (20 %) и высокой (60 %) долей СС, а также в вариантах «БС + *Fus. oxy.*» и «СС, 20 % + *Fus. oxy.*». $Y(II)$ уменьшается почти в 15 раз относительно своего контроля в листьях огурца, выращенных на СС, 60 % и подвергнутых фузариозному заражению, что свидетельствует о катастрофическом снижении эффективности трансформации энергии поглощенных квантов света в фотохимические реакции фотосинтеза. Закономерным является обнаруженное снижение скорости транспорта электронов через ФСII в таких образцах. Этот процесс описывается параметром $ETR(II)$, который в варианте опыта «СС, 60 % + *Fus. oxy.*» был уменьшен на 94 % по сравнению со своим контролем, что хорошо характеризует понятие «стрессовое состояние растения». В литературе существуют многочисленные данные о снижении потока электронов через ФСII в листьях 6 генотипов картофеля в условиях засухи [28], а также в растениях ячменя *Hordeum vulgare* в таких стрессовых условиях, как азотный дефицит [29] или при засолении [30].

Таблица 1. Абсолютные значения параметров РАМ-флуориметрии ФСII в листьях огурца, выращенных на БС; СС, 20 % и СС, 60 % в течение 25 дней, до и после инфицирования *Fus. oxy.*

Table 1. Absolute values of the parameters of PC II fluorimetry in cucumber leaves grown on WL; BL, 20 % and BL, 60 % for 25 days, before and after infection with *Fus. oxy.*

Параметр	Вариант					
	БС, контроль	БС + <i>Fus. oxy.</i>	СС, 20 %, контроль	СС, 20 % + <i>Fus. oxy.</i>	СС, 60 %, контроль	СС, 60 % + <i>Fus. oxy.</i>
F	1,33 ± 0,05	1,28 ± 0,03	1,17 ± 0,02	1,31 ± 0,05	1,20 ± 0,04	1,03 ± 0,13
F_m, F_m'	4,57 ± 0,02	4,80 ± 0,05	3,98 ± 0,13	4,84 ± 0,03	4,66 ± 0,04	1,14 ± 0,12*
F_v/F_m	0,81 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,52 ± 0,01*
$Y(II)$	0,66 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,66 ± 0,02	0,69 ± 0,01	0,69 ± 0,03	0,04 ± 0,02*
$Y(NO)$	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,88 ± 0,03*
$Y(NPQ)$	0,049 ± 0,003	0,037 ± 0,002	0,081 ± 0,004	0,041 ± 0,003	0,051 ± 0,002	0,079 ± 0,003
NPQ	0,186 ± 0,006	0,149 ± 0,003	0,312 ± 0,004	0,162 ± 0,003	0,378 ± 0,004	0,092 ± 0,001*
qP	0,84 ± 0,01	0,88 ± 0,04	0,85 ± 0,02	0,88 ± 0,06	0,88 ± 0,05	0,09 ± 0,002*
$ETR(II)$	36,5 ± 0,4	38,6 ± 0,3	36,5 ± 0,2	38,1 ± 0,5	38,1 ± 0,9	2,45 ± 0,90*
qN	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,15 ± 0,06	0,19 ± 0,03	0,12 ± 0,02*
qL	0,52 ± 0,05	0,59 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,05 ± 0,02*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 * обозначены достоверные различия между средними значениями при $p < 0,05$.

Еще одно существенное различие между листьями, выращенными на СС, 60 % и инфицированными *Fus. oxu.*, и всеми остальными вариантами связано с коэффициентами qP (показатель фотохимического тушения возбуждения Хл в антенных комплексах ФСII) и qL (количество открытых реакционных центров ФСII), которые также были значительно снижены в результате сочетанного длительного действия СС, 60 % и фузариозной инвазии. Физический смысл параметров qP и qL идентичен, но в их основу положены разные модели организации пигментной антенны ФСII в гранах хлоропластов [25]. Значительное снижение этих двух коэффициентов в варианте «СС, 60 % + *Fus. oxu.*» указывает на ингибирование процессов, поддерживающих электронный транспорт, что и подтверждается уменьшением параметра ETR(II).

Таким образом, длительное выращивание растений огурца на СС, 60 % практически с начала прорастания с последующим грибным инфицированием привело к подавлению фотосинтетической активности листьев, что выразилось в значительном снижении основных параметров функционирования ФСII: максимальной флуоресценции временно закрытых реакционных центров ФСII (F_m), эффективного квантового выхода фотохимических реакций (F_v/F_m), максимальной квантовой эффективности ФСII ($Y(II)$), скорости транспорта электронов через ФСII (ETR(II)), коэффициента фотохимического тушения возбуждения Хл в антенных комплексах ФСII (qP) и количества открытых реакционных центров ФСII (qL).

Следующая серия экспериментов была выполнена на растениях огурца, формирование которых происходило 18 дней при БС, затем в течение 7 сут при СС (20 или 60 %), после чего они были заражены грибом *Fus. oxu.* Особенности работы ФСII в условиях короткого светодиодного освещения также изучались по данным индукции флуоресценции Хл. Сравнительные данные о структурно-функциональном состоянии ФСII в условиях патогенного заражения относительно здоровых листьев приведены в табл. 2. Как и при длительном LED-освещении, основные изменения функциональной активности ФСII в этом эксперименте наблюдались в инфицированных листьях, сформированных в режиме СС, 60 %. Хорошо видно, что параметры фоновой флуоресценции ФСII адаптированных к темноте листьев (F_0) во всех вариантах контроля практически не различаются. Снижение максимального уровня флуоресценции (F_m) ФСII относительно контроля зарегистрировано в инфицированных листьях, выросших на БС и СС, 60 % (на 18 и 31 % соответственно) (табл. 2). Эффективный квантовый выход фотохимии ФСII и эффективность переноса электронов (ETR(II)) достоверно снижались (на 33 и 34 % соответственно) в листьях огурца, выросших на СС, 60 % (рис. 3, а, б). Уменьшение эффективного квантового выхода фотохимии ФСII, а также и ETR(II) в ФСII в литературе связывают с увеличением Q_b -невосстанавливающих реакционных центров этой фотосистемы [31].

Возможной причиной снижения эффективности переноса электронов ETR(II) в ФСII и, соответственно, $Y(II)$ под действием гриба *Fus. oxu.* на 30 % в варианте «СС, 60 % + *Fus. oxu.*» могут

Таблица 2. Абсолютные значения параметров ПАМ-флуориметрии ФСII в листьях огурца, выращенных на СС, 20 % и СС, 60 % в течение 7 дней, до и после инфицирования *Fus. oxu.*

Table 2. Absolute values of PAM fluorimetry parameters of PSII in cucumber leaves grown on BL, 20 % and BL, 60 % for 7 days, before and after infection with *Fus. oxu.*

Параметр	Вариант					
	БС, контроль	БС + <i>Fus. oxu.</i>	СС, 20 %, контроль	СС, 20 % + <i>Fus. oxu.</i>	СС, 60 %, контроль	СС, 60 % + <i>Fus. oxu.</i>
F_0	1,64 ± 0,03	1,50 ± 0,1	1,55 ± 0,1	1,65 ± 0,06	1,46 ± 0,06	1,68 ± 0,13
F_m, F_m'	5,02 ± 0,02	4,08 ± 0,05	4,84 ± 0,13	5,25 ± 0,03	5,08 ± 0,03	3,49 ± 0,3*
F_v/F_m	0,82 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,82 ± 0,01	0,81 ± 0,003	0,83 ± 0,001	0,78 ± 0,02
$Y(II)$	0,61 ± 0,1	0,53 ± 0,11	0,62 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,42 ± 0,08*
$Y(NO)$	0,32 ± 0,01	0,46 ± 0,08	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,49 ± 0,08*
$Y(NPQ)$	0,05 ± 0,003	0,12 ± 0,03	0,05 ± 0,004	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,004*
NPQ	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,29 ± 0,05	0,23 ± 0,01	0,19 ± 0,02
qP	0,77 ± 0,01	0,70 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,77 ± 0,01	0,79 ± 0,03	0,53 ± 0,05*
ETR(II)	33,8 ± 0,3	28,6 ± 1,2	34,1 ± 1,7	32,8 ± 0,1	34,4 ± 1,8	22,9 ± 4,5*
qN	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,26 ± 0,40	0,26 ± 0,04	0,19 ± 0,01*
qL	0,40 ± 0,2	0,42 ± 0,10	0,42 ± 0,05	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,22 ± 0,04*

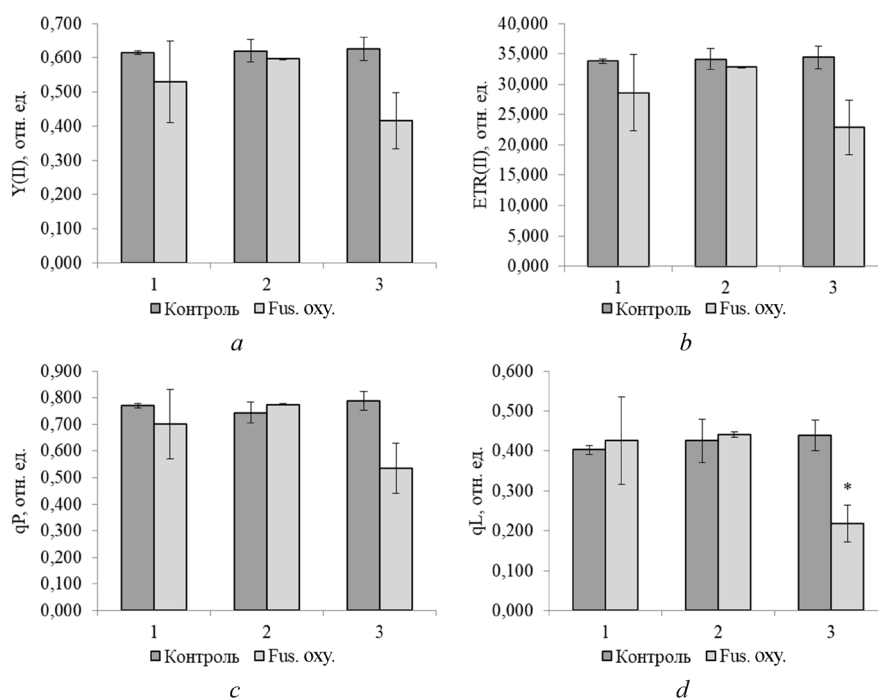


Рис. 3. Параметры функциональной активности ФСII (*a* – квантовый выход ($Y(II)$); *b* – эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ($ETR(II)$); *c* – коэффициент фотохимического тушения флуоресценции Хл в антенных комплексах (qP); *d* – количество открытых реакционных центров (qL)) в листьях огурца, выращенных на БС (1), СС, 20 % (2) и СС, 60 % (3) в течение 7 дней, до и после инфицирования грибом *Fus. oxy.*

Fig. 3. Parameters of the functional activity of PSII (*a* – quantum yield ($Y(II)$); *b* – efficiency of the electron transport chain ($ETR(II)$); *c* – coefficient of photochemical quenching of Chl fluorescence in antenna complexes (qP); *d* – number of open reaction centers (qL)) in cucumber leaves grown on WL (1), BL, 20 % (2) and BL, 60 % (3) for 7 days, before and after infection with the *Fus. oxy.*

быть изменения, происходящие в белковых комплексах реакционного центра ФСII, так как параметры $ETR(II)$ и $Y(II)$ не связаны с активацией дополнительных диссипационных механизмов. Еще одно различие между вариантом «СС, 60 % + *Fus. oxy.*» и всеми остальными вариантами обнаруживается в коэффициенте qP , сниженном на 32 %, и коэффициенте qL , сниженном на 50 %, что свидетельствует об уменьшении доли открытых реакционных центров ФСII или дезактивации процессов, поддерживающих электронный транспорт, и хорошо согласуется с описанным выше снижением $ETR(II)$ на 34 % (рис. 3, *b–d*).

Влияние воздействия абиотических и биотических факторов на работу и структуру фотосинтетического аппарата исследуется давно, но большая часть работ посвящена изучению ФСII. Относительно ФСI существовало мнение, что она меньше реагирует на стрессовые факторы. В литературе описано, что при тепловом воздействии активируется циклический перенос электронов через ФСI [32, 33], а также возможны повреждения пигмент-белкового комплекса ФСI в результате фотоингибирования на акцепторной стороне ФСI и образования АФК [34].

Недавно была проведена оценка редокс-состояния P700 растений томата при сопряженном воздействии повышенной температуры и поражении *Fus. oxy.* методом дифференциальной абсорбционной фотометрии, которая показала нарушение в функционировании ФСI как под влиянием тепловой обработки, так и при заражении растений патогенным грибом *Fus. oxy.* при их сочетанном действии [35]. В нашей работе использованы параметры переменной флуоресценции при измерении поглощения пигмента P700 с помощью метода импульсно-модулируемой флуоресцентной спектроскопии, которые несут сходную информацию о ФСI (состояние донорной и акцепторной сторон, квантовые выходы и т. д.). Данные, зарегистрированные в зеленых листьях огурца, выросших на БС; СС, 20 % и СС, 60 % в течение 25 дней без обработки и после 3-суточной грибной инвазии, представлены в табл. 3. Длительное выращивание здоро-

вых растений на СС, 60 % привело к снижению максимального уровня флуоресценции (P_m), характеризующего максимальную флуоресценцию P700, на 35 % по сравнению с контрольными листьями на БС. Стрессовые условия 3-суточной атаки *Fus. oxu.* вызвали почти 10-кратное уменьшение уровня сигнала P700 (параметр P_m) по отношению к соответствующему здоровому контролю. Анализ параметров, характеризующих фотохимическую активность ФЦИ в варианте «СС, 60 % + *Fus. oxu.*» (квантовый выход ФЦИ ($Y(I)$) и эффективность переноса электронов в электрон-транспортной цепи ФЦИ (ETR(I))), показал их значительную редукцию (8,7 и 12,2 % соответственно) по сравнению с контролем. В таких листьях практически полностью нарушено функционирование донорной ($Y(ND)$) и акцепторной ($Y(NA)$) сторон ФЦИ. При длительном (25 дней) выращивании растений огурца в режиме СС, 20 % не обнаружено таких значительных изменений параметров функционирования ФЦИ ни в здоровых растениях, ни в фузариозных образцах (табл. 3).

Таблица 3. Абсолютные значения параметров ПАМ-флуориметрии ФЦИ в листьях огурца, выращенных на БС; СС, 20 % и СС, 60 % в течение 25 дней, а затем инфицированных патогенным грибом *Fus. oxu.*

Table 3. Absolute values of PAM fluorimetry parameters of PSI in cucumber leaves grown on WL; BL, 20 % and BL, 60 % for 25 days, and then infected with the pathogenic fungus *Fus. oxu.*

Параметр	Вариант					
	БС, контроль	БС + <i>Fus. oxu.</i>	СС, 20 %, контроль	СС, 20 % + <i>Fus. oxu.</i>	СС, 60 %, контроль	СС, 60 % + <i>Fus. oxu.</i>
P_m	$1,90 \pm 0,01$	$1,49 \pm 0,03$	$1,34 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,03^*$
$Y(I)$	$0,78 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,01^*$
ETR(I)	$43,2 \pm 0,02$	$43,7 \pm 0,02$	$39,9 \pm 0,04$	$41,6 \pm 0,01$	$45,6 \pm 0,04$	$5,55 \pm 0,03^*$
$Y(ND)$	$0,09 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,07^*$
$Y(NA)$	$0,12 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,01^*$

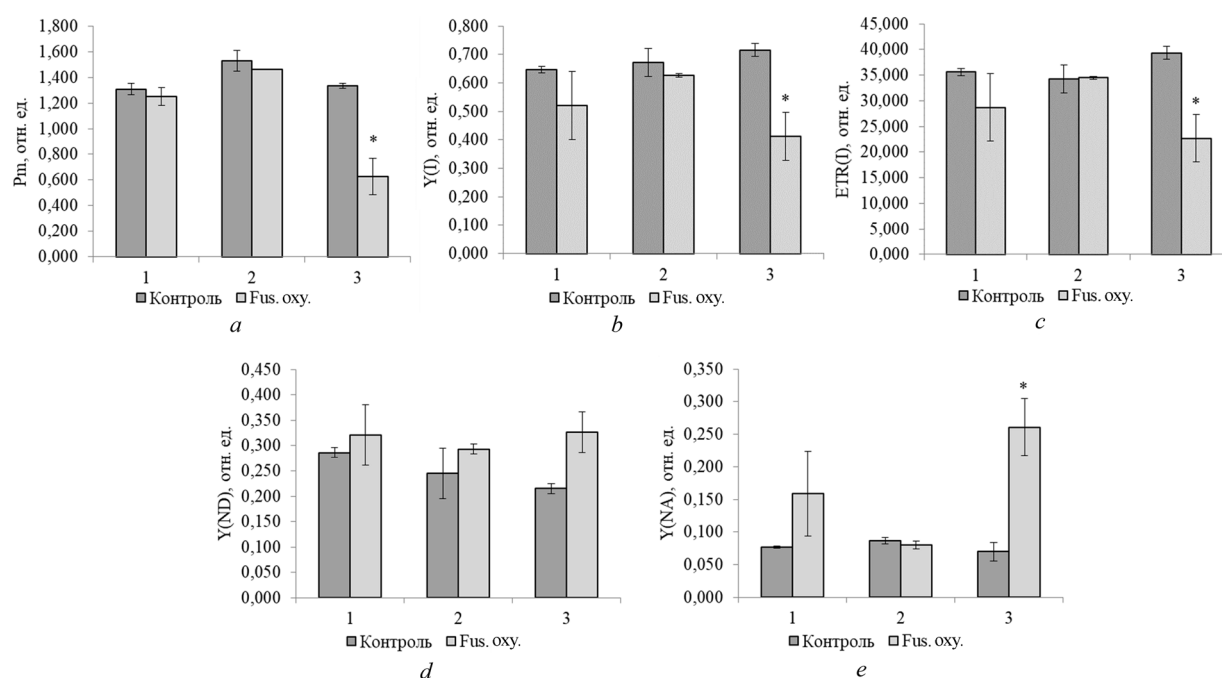


Рис. 4. Параметры функциональной активности ФЦИ (a – максимальная флуоресценция временно закрытых реакционных центров P700 (P_m); b – квантовый выход ($Y(I)$); c – эффективность функционирования электрон-транспортной цепи (ETR(I)); d – функционирование донорной стороны ($Y(ND)$); e – функционирование акцепторной стороны ($Y(NA)$) в листьях огурца, выращенных на БС (1), СС, 20 % (2) и СС, 60 % (3) в течение 7 дней, до и после инфицирования грибом *Fus. oxu.*

Fig. 4. Parameters of functional activity of PSI (a – maximum fluorescence of temporarily closed reaction centers P700 (P_m); b – quantum yield ($Y(I)$); c – efficiency of functioning of the electron transport chain (ETR(I)); d – functioning of the donor side ($Y(ND)$); e – functioning of the acceptor side ($Y(NA)$) in cucumber leaves grown at WL (1), BL, 20 % (2) and BL, 60 % (3) for 7 days, before and after infection with the fungus *Fus. oxu.*

Как и при рассмотрении функционирования ФСII, основные изменения в активности ФСI происходили при длительном LED-освещении инфицированных листьев, выращенных на СС, 60 %. Однако и в варианте с 7-дневной экспозицией на СС, 20 % зарегистрировано достоверное уменьшение эффективности функционирования электрон-транспортной цепи ФСI и квантового выхода ФСI (на 42 % по каждому параметру) в листьях огурца после 3-суточной инвазии патогенного гриба (рис. 4). Также в инфицированных листьях огурца наблюдали значительное изменение в функционировании как донорной (Y(ND)), так и акцепторной (Y(NA)) сторон ФСI, особенно выраженное при выращивании на СС, 60 % (рис. 4). Увеличение Y(NA) в таких листьях может быть следствием нарушения работы цикла Кальвина вплоть до полной остановки функционирования [21]. Таким образом, показано, что при выращивании растений огурца в течение 7 дней в режиме СС, 60 % достоверные изменения коснулись степени окисленности P700, квантового выхода ФСI Y(I), эффективности функционирования электрон-транспортной цепи ФСI и нефотохимической диссипации энергии на донорной стороне ФСI. Отметим, что наиболее выраженные изменения функциональной активности ФСI (как и для ФСII) зарегистрированы в инфицированных листьях огурца, сформированных в режиме длительного действия СС, 60 %.

Заключение. В результате исследования и анализа показателей, отражающих эффективность работы ФСI и ФСII, были выявлены особенности функционирования фотосинтетических мембран огурца в условиях полихроматического LED-освещения с различным соотношением синего и красного диапазонов, а также рассмотрена продолжительность выращивания растений в таких условиях. Существенным стрессовым фактором для листьев огурца стало их 3-суточное инфицирование патогенным грибом *Fus. oxu*. Установлено, что разрушающее влияние фитопатогена в растениях огурца, выращенных длительное время (25 дней) на СС, 60 %, проявляется в подавлении функциональной активности ФСII хлоропластных мембран, что выразилось в значительном снижении максимальной флуоресценции временно закрытых реакционных центров ФСII (F_m), эффективного квантового выхода фотохимических реакций (F_v/F_m), максимальной квантовой эффективности ФСII (Y(II)), а также в изменении характера перераспределения поглощенной световой энергии, что привело к снижению интенсивности фотохимической конверсии (qP), количества открытых реакционных центров ФСII (qL) и скорости транспорта электронов через ФСII (ETR(II)). При 7-дневной экспозиции растений в разных световых условиях основные изменения параметров ФСII наблюдались только в инфицированных листьях, сформированных в режиме СС, 60 %.

Анализ кинетики окисления/восстановления P700 показал, что в листьях огурца, сформированных на БС и СС, 20 %, после инфицирования фитопатогеном лишь незначительно изменился вклад потока электронов на донорной и акцепторной сторонах ФСI, не затронув уровень окисленности P700 и квантовый выход фотохимических реакций. Существенные изменения зарегистрированы для растений огурца, выращенных в режиме СС, 60 % и зараженных *Fus. oxu*. При инокуляции фитопатогеном растений, длительное время выращенных на СС, 60 %, обнаружено 10-кратное снижение квантового выхода фотохимических реакций ФСI и существенное увеличение нефотохимической диссипации энергии на донорной и акцепторной сторонах ФСI. Стрессовое воздействие патогена усиливало подавляющий эффект выращивания растений огурца на СС, 60 % в течение 7 дней, что вызывало существенное снижение таких показателей, как квантовый выход ФСI (Y(I)) и эффективность переноса в электрон-транспортной цепи ФСI (ETR(I)).

В результате проведенного исследования выявлены механизмы модификации функциональной активности фотосинтетических мембран под действием LED-освещения с повышенной долей СС, а также определены оптимальные параметры соотношения синего и красного диапазонов света в полноспектральных композициях светодиодного освещения для выращивания растений огурца. Полученные результаты могут быть использованы в качестве методической основы для создания энергосберегающих светодиодных светильников, оптимизированных для выращивания растений огурца в закрытом грунте, а также для контроля степени заражения растений на ранних стадиях фузариоза, когда внешние признаки увядания еще отсутствуют.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг. подпрограммы 1 «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» «Изучить влияние синего LED-освещения на молекулярно-мембранные механизмы взаимодействия грибных патогенов рода *Fusarium* с растительными клетками».

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the State Program of Scientific Research “Biotechnology-2” for 2021–2025, Subprogram 1 “Molecular and Cellular Biotechnology-2” “To study the effect of blue LED illumination on the molecular membrane mechanisms of interaction of fungal pathogens of the genus *Fusarium* with plant cells”.

Список использованных источников

1. Casal, J. J. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants / J. J. Casal // Photochemistry and Photobiology. – 2007. – Vol. 71, N 1. – P. 1–11. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)0710001pcppii2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0710001pcppii2.0.co2)
2. Voitsekhovskaja, O. V. Phytochromes and other (Photo)Receptors of information in plants / O. V. Voitsekhovskaja // Russian Journal of Plant Physiology. – 2019. – Vol. 66. – P. 351–364. <https://doi.org/10.1134/s1021443719030154>
3. D’Amico-Damiao, V. Cryptochrome-related abiotic stress responses in plants / V. D’Amico-Damiao, R. F. Carvalho // Frontiers in Plant Science. – 2018. – Vol. 9. – Art. 1897. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01897>
4. Banerjee, R. Plant blue-light receptors / R. Banerjee, A. Batschauer // Planta. – 2005. – Vol. 220. – P. 498–502. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1418-z>
5. Влияние дефицита криптохромов 1 и 2 на фотосинтетическую активность и про-антиоксидантный баланс в листьях растений *Arabidopsis thaliana* при действии УФ-В / А. Ю. Худякова, В. Д. Креславский, А. Н. Шмарев [и др.] // Физиология растений. – 2022. – Т. 69, № 2. – С. 207–215.
6. Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for cryptochromes in the response of *Arabidopsis* to high irradiance / T. Kleine, P. Kindgren, C. Benedict [et al.] // Plant Physiology. – 2007. – Vol. 144, N 3. – P. 1391–1406. <https://doi.org/10.1104/pp.107.098293>
7. Lin, C. The cryptochromes / C. Lin, T. Todo // Genome biology. – 2005. – Vol. 6, N 5. – Art. 220. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-5-220>
8. Impact of UV-B radiation on the photosystem II activity, pro-/antioxidant balance and expression of light-activated genes in *Arabidopsis thaliana* hy4 mutants grown under light of different spectral composition / A. Yu. Khudyakova, V. D. Kreslavski, A. N. Shmarev [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2019. – Vol. 194. – P. 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.003>
9. Sowden, R. G. The role of chloroplasts in plant pathology / R. G. Sowden, S. J. Watson, P. Jarvis // Essays in Biochemistry. – 2018. – Vol. 62, N 1. – P. 21–39. <https://doi.org/10.1042/ebc20170020>
10. Jones, J. D. G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // Nature. – 2006. – Vol. 444. – P. 323–332. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
11. Bethke, P. C. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species / P. C. Bethke, R. L. Jones // The Plant Journal. – 2001. – Vol. 25, N 1. – P. 19–29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.00930.x>
12. A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize / G. Hu, N. Yalpani, S. P. Briggs, G. S. Johal // The Plant Cell. – 1998. – Vol. 10, N 7. – P. 1095–1105. <https://doi.org/10.2307/3870714>
13. Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death1 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense / P. Brodersen, M. Petersen, H. M. Pike [et al.] // Genes and development. – 2002. – Vol. 16, N 4. – P. 490–502. <https://doi.org/10.1101/gad.218202>
14. Vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues / S. Lorrain, B. Lin, M. C. Auriac [et al.] // The Plant Cell. – 2004. – Vol. 16, N 8. – P. 2217–2232. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022038>
15. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways / T. Asai, J. M. Stone, J. E. Heard [et al.] // The Plant Cell. – 2000. – Vol. 12, N 10. – P. 1823–1835. <https://doi.org/10.2307/3871195>
16. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade / Y. Liu, D. Ren, Sh. Pike [et al.] // The Plant Journal. – 2007. – Vol. 51, N 6. – P. 941–954. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2007.03191.x>
17. Blue light (470 nm) effectively inhibits bacterial and fungal growth / A. J. De Lucca, C. Carter-Wientjes, K. A. Williams, D. Bhatnagar // Letters in applied microbiology. – 2012. – Vol. 55, N 6. – P. 460–466. <https://doi.org/10.1111/lam.12002>
18. Wu, L. Cryptochrome 1 is implicated in promoting R protein-mediated plant resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* / L. Wu, H. Q. Yang // Molecular plant. – 2010. – Vol. 3, N 3. – P. 539–548. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp107>
19. Krause, G. H. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics / G. H. Krause, E. Weis // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 1991. – Vol. 42, N 1. – P. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
20. New flux parameters for the determination of Q_A redox state and excitation fluxes / D. M. Kramer, G. Johnson, O. Kiirats, G. E. Edwards // Photosynthesis Research. – 2004. – Vol. 79. – P. 209–218. <https://doi.org/10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d>
21. A state of PSI and PSII photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant / M. S. Makarenko, N. V. Kozel, A. V. Usatov [et al.] // OnLine Journal of Biological Sciences. – 2016. – Vol. 16, N 4. – P. 193–198. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2016.193.198>
22. Креславский, В. Д. Последствие теплового шока на индукцию флуоресценции и низкотемпературные спектры флуоресценции листьев пшеницы / В. Д. Креславский, М. С. Христин // Биофизика. – 2003. – Т. 48, № 5. – С. 865–872.
23. Dual-PAM-100. Measuring System for Simultaneous Assessment of P700 and Chlorophyll Fluorescence: Instrument Description and Instructions for Users. – 2nd ed. – 2009. – URL: <https://www.htsperu.com.pe/download/Manual-de-Dual-PAM-100.7WDGupiZObTOUCgT71xZ97gSK4ZzWfXY.pdf> (date of access: 09.02.2025).
24. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск: Вышэйш. шк., 1973. – 320 с.
25. Briggs, W. R. Phototropins 1 and 2 versatile plant blue-light receptors / W. R. Briggs, J. M. Christie // Trends in Plant Science. – 2002. – Vol. 7, N 5. – P. 204–210. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02245-8](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02245-8)

26. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений / В. Н. Гольцев, Х. М. Каладжи, М. Паунов [и др.] // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 3. – С. 881–907.
27. Baker, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo* / N. R. Baker // Annual Review of Plant Biology. – 2008. – Vol. 59. – P. 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
28. Potato Response to Drought Stress: Physiological and Growth Basis / T. Gervais, A. Creelman, X.-Q. Li [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – Art. 698060. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.698060>
29. Nitrogen deficiency in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induces molecular and metabolic adjustments that trigger aphid resistance / G. Comadira, B. Rasool, B. Karpinska [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2015. – Vol. 66, N 12. – P. 3639–3655. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv276>
30. Influence of salinity stress on PSII in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes, probed by chlorophyll-a fluorescence / M. S. Akhter, Noreen S., Mahmood S. [et al.] // Journal of King Saud University – Science. – 2021. – Vol. 33, N 1. – Art. 101239. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101239>
31. Huang, W. Stimulation of cyclic electron flow during recovery after chilling-induced photoinhibition of PSII / W. Huang, S. B. Zhang, K. F. Cao // Plant Cell Physiology. – 2010. – Vol. 51. – N 11. – P. 1922–1928. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq144>
32. Zhang, R. Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress / R. Zhang, T. D. Sharkey // Photosynthesis research. – 2009. – Vol. 100. – P. 29–43. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9420-8>
33. OCO-2 advances photosynthesis observation from space via solar-induced chlorophyll fluorescence / Y. Sun, C. Frankenberg, J. D. Wood [et al.] // Science. – 2017. – Vol. 358, N 6360. – Art. eaam5747. <https://doi.org/10.1126/science.aam5747>
34. Responses of the photosynthetic electron transport reactions stimulate the oxidation of the reaction center chlorophyll of photosystem I, P700, under drought and high temperatures in rice / S. Wada, Takagi D., Miyake Ch. [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, N 9. – P. 2068. <https://doi.org/10.3390/ijms20092068>
35. Пшибытко, Н. Л. Оценка редокс-состояния P700 растений томата при сопряженном воздействии повышенной температуры и поражении *Fusarium oxysporum* методом дифференциальной абсорбционной фотометрии с использованием технологии насыщающих импульсов света / Н. Л. Пшибытко // Журнал прикладной спектроскопии. – 2024. – Т. 91, № 1. – С. 56–64.

References

1. Casal J. J. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 2007, vol. 71, no. 1, pp. 1–11. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)0710001pcppii2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0710001pcppii2.0.co2)
2. Voitsekhovskaja O. V. Phytochromes and other (Photo)Receptors of information in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2019, vol. 66, pp. 351–364. <https://doi.org/10.1134/s1021443719030154>
3. D'Amico-Damiao V., Carvalho R. F. Cryptochrome-related abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, art. 1897. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01897>
4. Banerjee R., Batschauer A. Plant blue-light receptors. *Planta*, 2005, vol. 220, pp. 498–502. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1418-z>
5. Khudyakova A. Yu., Kreslavskii V. D., Shmarev A. N., Shirshikova G. N., Lyubimov V. Yu., Kosobryukhov A. A. The effect of cryptochrome 1 and 2 deficiency on photosynthetic activity and pro-antioxidant balance in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants under the action of UV-B1. *Fiziologiya rastenii* [Plant Physiology], 2022, vol. 69, no. 2, pp. 207–215 (in Russian).
6. Kleine T., Kindgren P., Benedict C., Hendrickson L., Strand A. Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for cryptochrome1 in the response of *Arabidopsis* to high irradiance. *Plant Physiology*, 2007, vol. 144, no. 3, pp. 1391–1406.
7. Lin C., Todo T. The cryptochromes. *Genome biology*, 2005, vol. 6, no. 5, art. 220. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-5-220>
8. Khudyakova A. Yu., Kreslavski V. D., Shmarev A. N., Lyubimov V. Yu., Shirshikova G. N., Pashkovskiy P. P., Kuznetsov V. V., Suleyman I. Allakhverdiev Impact of UV-B radiation on the photosystem II activity, pro-/antioxidant balance and expression of light-activated genes in *Arabidopsis thaliana* hy4 mutants grown under light of different spectral composition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, vol. 194, pp. 14–20.
9. Sowden R. G., Watson S. J., Jarvis P. The role of chloroplasts in plant pathology. *Essays in Biochemistry*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 21–39. <https://doi.org/10.1042/ebc20170020>
10. Jones J. D. G., Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*, 2006, vol. 444, pp. 323–332. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
11. Bethke P. C., Jones R. L. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal*, 2001, vol. 25, no. 1, pp. 19–29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00930.x>
12. Hu G., Yalpani H., Briggs S. P., Johal G. S. A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *The Plant Cell*, 1998, vol. 10, no. 7, pp. 1095–1105. <https://doi.org/10.2307/3870714>
13. Brodersen P., Petersen M., Pike H. M., Olszak B., Skov S., Ødum N., Jørgensen L. B., Brown R. E., Mundy J. Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death1 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes and development*, 2002, vol. 16, no. 4, pp. 490–502. <https://doi.org/10.1101/gad.218202>
14. Lorrain S., Lin B., Auriac M. C., Kroj T., Saindrenan P., Nicole M., Balagué C., Roby D. Vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *The Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 8, pp. 2217–2232. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022038>
15. Asai T., Stone J. M., Heard J. E., Kovtun Y., Yorgey P., Sheen J., Ausubel F. M. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *The Plant Cell*, 2000, vol. 12, no. 10, pp. 1823–1835. <https://doi.org/10.2307/3871195>
16. Liu Y., Ren D., Pike S., Pallardy S., Gassmann W., Zhang S. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal*, 2007, vol. 51, no. 6, pp. 941–954. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03191.x>
17. De Lucca A. J., Carter-Wientjes C., Williams K. A., Bhatnagar D. Blue light (470 nm) effectively inhibits bacterial and fungal growth. *Letters in applied microbiology*, 2012, vol. 55, no. 6, pp. 460–466. <https://doi.org/10.1111/lam.12002>
18. Wu L., Yang H. Q. Cryptochrome 1 is implicated in promoting R protein-mediated plant resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 2010, vol. 3, no. 3, pp. 539–548. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp107>

19. Krause G. H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, vol. 42, no. 1, pp. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
20. Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G. E. New flux parameters for the determination of Q_A redox state and excitation fluxes. *Photosynthesis Research*, 2004, vol. 79, pp. 209–218. <https://doi.org/10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d>
21. Makarenko M. S., Kozel N. V., Usatov A. V., Gorbachenko O. F., Averina N. G. A state of PSI and PSII photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 2016, vol. 16, no. 4, pp. 193–198. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2016.193.198>
22. Kreslavskii V. D., Khristin M. S. Aftereffect of heat shock on fluorescence induction and low-temperature fluorescence spectra of wheat leaves. *Biophysika* [Biophysics], 2003, vol. 48, no. 5, pp. 865–872 (in Russian).
23. *Dual-PAM-100. Measuring System for Simultaneous Assessment of P700 and Chlorophyll Fluorescence: Instrument Description and Instructions for Users. 2nd ed.* 2009. Available at: <https://www.htsperu.com.pe/download/Manual-de-Dual-PAM-100.7WDGupiZObTOUCgT71xZ97gSK4ZzWFXy.pdf> (accessed 09.02.2025).
24. Rokitskii P. F. *Biological statistics*. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 320 p. (in Russian).
25. Briggs W. R., Christie J. M. Phototropins 1 and 2 versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, 2002, vol. 7, no. 5, pp. 204–210. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02245-8](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02245-8)
26. Goltsev V. N., Kalaji H. M., Paunov M., Bába W., Horacek T., Mojski J., Kociel H., Allakhverdiev S. I. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2016, vol. 63, no. 6, pp. 869–893. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050058>
27. Baker N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, vol. 59, pp. 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
28. Gervais T., Creelman A., Li X.-Q., Bizimungu B., De Koeyer D., Dahal K. Potato Response to Drought Stress: Physiological and Growth Basis. *Frontiers in Plant Science*, 2021, vol. 12, art. 698060. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.698060>
29. Comadira G., Rasool B., Karpinska B., Morris J., Verrall S. V., Hedley P. E., Foyer C. H., Hancock R. D. Nitrogen deficiency in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induces molecular and metabolic adjustments that trigger aphid resistance. *Journal of Experimental Botany*, 2015, vol. 66, no. 12, pp. 3639–3655. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv276>
30. Akhter M. S., Noreen S., Mahmood S., Athar H. R., Ashraf M., Alsahli A. A., Ahmad P. Influence of salinity stress on PSII in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes, probed by chlorophyll-a fluorescence. *Journal of King Saud University – Science*, 2021, vol. 33, no. 1, art. 101239. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101239>
31. Huang W., Zhang S. B., Cao K. F. Stimulation of cyclic electron flow during recovery after chilling-induced photoinhibition of PSII. *Plant Cell Physiology*, 2010, vol. 51, no. 11, pp. 1922–1928. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq144>
32. Zhang R., Sharkey T. D. Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress. *Photosynthesis research*, 2009, vol. 100, pp. 29–43. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9420-8>
33. Sun Y., Frankenberg C., Wood J. D., Schimel D. S., Jung M., Guanter L., Drewry D. T., Verma M., Porcar-Castell A., Griffis T. J., Gu L., Magney T. S., Köhler P., Evans B., Yuen K. OCO-2 advances photosynthesis observation from space via solar-induced chlorophyll fluorescence. *Science*, 2017, vol. 358, no. 6360, art. eaam5747. <https://doi.org/10.1126/science.aam5747>
34. Wada S., Takagi D., Miyake Ch., Makino A., Suzuki Yu. Responses of the photosynthetic electron transport reactions stimulate the oxidation of the reaction center chlorophyll of photosystem I, P700, under drought and high temperatures in rice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, vol. 20, no. 9, p. 2068. <https://doi.org/10.3390/ijms20092068>
35. Pshibytko N. L. Assessment of P700 Redox State of Tomato Plants Under Conjugated Influence of Elevated Temperature and *Fusarium Oxysporum* Infection by the Method of Differential Absorption Photometry Using Technology of Saturating Light Pulse. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii* [Journal of Applied Spectroscopy], 2024, vol. 91, no. 1, pp. 56–64 (in Russian).

Информация об авторах

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

Артемчук Яна Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yanaart222@gmail.com

Гордиенко Софья Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gordienko.sonya@inbox.ru

Молчан Ольга Викторовна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga_molchan@mail.ru

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

Information about the authors

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

Yana N. Artemchuk – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yanaart222@gmail.com

Sofya S. Gordienko – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gordienko.sonya@inbox.ru

Olga V. Molchan – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga_molchan@mail.ru

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

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 581.4:581.19
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-108-117>

Поступила в редакцию 11.10.2024
Received 11.10.2024

О. В. Чижик, Т. В. Мазур, Е. Б. Кардаш

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ЭЛИСИТОРОВ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Аннотация. Изучено влияние элиситоров (лактата хитозана, янтарной кислоты, экстракта хвои пихты) на физиолого-биохимические показатели при адаптации *ex vitro* растений брусники обыкновенной сорта ‘Red Pearl’. Определено содержание флавоноидов, оксикоричных кислот (ОКК), фенольных соединений (ФС), пигментов фотосинтеза, антиоксидантной активности (АОА) при адаптации *ex vitro* после обработок элиситорами. Впервые методом 2D-электрофореза на протеомных картах растений, обработанных элиситорами, выявлены белки защитного ответа (PR-белки). Определено, что при адаптации брусники сорта ‘Red Pearl’ наиболее эффективны обработки янтарной кислотой и лактатом хитозана. Подтверждена перспективность использования элиситоров в технологиях производства посадочного материала для стимулирования у растений физиологических процессов адаптации.

Ключевые слова: элиситоры, *Vaccinium vitis-idaea* L., фенольные соединения, оксикоричные кислоты, флавоноиды, антиоксидантная активность, протеомный анализ, 2D-электрофорез

Для цитирования: Чижик, О. В. Влияние элиситоров на физиолого-биохимические показатели вегетативных органов брусники обыкновенной / О. В. Чижик, Т. В. Мазур, Е. Б. Кардаш // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2 – С. 108–117. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-108-117>

Olga V. Chizhik, Tatyana V. Mazur, Elizaveta B. Kardash

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

ELICITOR'S INFLUENCE ON THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDEXES OF THE *VACCINIUM VITIS IDAEA* L. VEGETATIVE ORGANS

Abstract. The influence of elicitors (chitosan lactate, succinic acid, extract of *Abies* sp.) on the physiological and biochemical indexes of the *Vaccinium vitis idaea* L. cv. ‘Red Pearl’ was studied. The content of biologically active substances, pigments of photosynthesis, antioxidant activity during the adaptation process after treatment with elicitors was determined. For the first time in Belarus by the 2-D electrolysis method the PR-proteins of stress response after elicitors treatment were revealed. It was shown that during the *Vaccinium vitis idaea* L. adaptation the succinic acid and chitosan treatment are the most effective. It was confirmed that elicitors are perspective for the *Vaccinium vitis idaea* L. adaptation in the technologies of a planting material production.

Keywords: elicitors, *Vaccinium vitis-idaea* L., phenolic compounds, oxycinnamic acid, flavonoids, antioxidant activity, proteomic analysis, 2-D electrophoresis

For citation: Chizhik O. V., Mazur T. V., Kardash E. B. Elicitor's influence on the physiological and biochemical indexes of the *Vaccinium vitis idaea* L. vegetative organs. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 1, pp. 108–117 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-1-108-117>

Введение. С каждым годом повышаются требования к экологической безопасности растительной продукции, что очень важно для поддержания здорового образа жизни человека. В условиях интенсивного использования пестицидов становится обязательным учет возможных экологических последствий их применения. Вместе с тем следует обратить особое внимание на необходимость поиска эффективных и безопасных для окружающей среды и человека средств защиты растений.

В последние десятилетия в научной литературе появились работы, свидетельствующие о том, что в защите растений от различных стрессовых воздействий важная роль принадлежит элиситорам [1, 2].

Элиситоры – биотические или абиотические факторы, индуцирующие в растениях неспецифический комплекс защитных реакций (неспецифический адаптационный синдром), проявлением которого является кратковременная индукция неспецифической устойчивости [1, 2].

Элиситоры взаимодействуют со специальными белками-рецепторами, расположенными на мембране растительных клеток. Эти рецепторы способны распознавать молекулярную структуру элиситоров и запускать внутриклеточную защитную реакцию. Такая реакция приводит к усиленному синтезу вторичных метаболитов, которые уменьшают повреждения и повышают устойчивость к вредителям, патогенам или абиотическому стрессу [2–4]. Индуцированная неспецифическая устойчивость является одним из важнейших механизмов, обеспечивающих защиту растительного организма от различного рода деструктивных воздействий [5], что указывает на возможность использования элиситоров для повышения иммунитета растений (фитоиммунитета).

Биологический метод защиты растений перспективен для применения в закрытом и открытом грунте и не имеет альтернатив в организации экологического земледелия. При правильном применении он весьма эффективен и безвреден для человека и окружающей среды.

Выращивание растительной продукции – важное звено в обеспечении населения пищевыми ресурсами и сырьем для перерабатывающей промышленности. В связи с актуальностью растений рода *Vaccinium* стоит задача наработки качественного посадочного материала в короткие сроки и в промышленных масштабах. Результаты интродукции представителей семейства Вересковые (*Ericaceae*), начатой в 1980 г. в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси, легли в основу промышленного ягодоводства в республике [6].

Растения брусники сорта ‘Red Pearl’ были выращены с использованием технологии размножения *in vitro*, которая имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным размножением. Однако успех процесса адаптации культуры *in vitro* к условиям *ex vitro* связан с оптимизацией условий культивирования. Даже небольшие отклонения от оптимума приводят к резкому снижению приживаемости, скорости роста и ухудшению физиологического состояния регенерантов. Чтобы успешно получить качественный посадочный материал, необходимо изучить фундаментальные процессы, лежащие в основе роста и развития растений, а также установить возможные пути их регуляции. Поэтому исследования, направленные на повышение неспецифического иммунитета растений при стрессовых воздействиях (в частности, переход культуры из условий *in vitro* в условия защищенного грунта *ex vitro*), весьма актуальны.

Таким образом, в процессе поиска перспективных экологичных способов защиты сельскохозяйственных культур и создания безопасных для человека препаратов изучение влияния элиситоров на повышение неспецифической устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам является важным и научно значимым.

Исследования имеют и практическое значение: планируется применить органические элиситоры на стадии адаптации растений семейства *Ericaceae* к условиям *ex vitro*, что позволит получить большее количество высококачественного посадочного материала хозяйственно-ценных культур.

Цель работы – изучить влияние элиситоров различной природы на повышение неспецифической устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам с помощью естественных механизмов иммунитета.

Материалы и методы исследования. Объект исследования – брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.), сорт ‘Red Pearl’.

Обработки элиситорами (лактатом хитозана, янтарной кислотой, экстрактом хвои пихты) проводили путем опрыскивания надземной зеленой массы растений трижды каждые 14 дней. Контролем служили растения брусники, которые опрыскивали дистиллированной водой.

Лактат хитозана усиливает врожденный механизм защиты растений для борьбы с насекомыми, патогенными микроорганизмами и почвенными болезнями, ускоряет процесс фотосинтеза, способствует усилению роста растений, стимулирует поглощение питательных веществ. Применение этого биополимера в сельском хозяйстве поможет уменьшить нагрузку на окружающую среду, укрепить жизнеспособность семян, улучшить защитные свойства насаждений и увеличить урожайность [7].

Янтарная кислота для растений – это регулятор и умеренный активатор роста, стрессовый адаптоген. Она помогает растениям лучше и в полной мере усваивать питательные вещества и микроэлементы [8]. Важно отметить, что передозировка практически невозможна – растение усвоит только необходимое ему количество веществ [9].

Экстракт хвои пихты – природный инсектицид, который активизирует иммунитет, повышает устойчивость растений к болезням и вредителям и тем самым увеличивает урожайность. Элиситор получали по методике [10, 11]. Полученный экстракт использовали для опрыскивания без разведения.

Приготовление экстрактов всех исследуемых образцов проводили согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь (ГФ РБ) [12].

Общее содержание фенольных соединений (ФС) измеряли спектрофотометрическим методом с применением метода Фолина – Чокальтеу [13]. Для построения калибровочного графика в качестве стандарта была использована галловая кислота.

Определение содержания флавоноидов в экстрактах проводили в пересчете на лютеолин согласно ГФ РБ [14].

Определение содержания оксикоричных кислот (ОКК) в экстрактах всех исследуемых образцов проводили согласно [15].

Антиоксидантную активность (АОА) определяли по [16]. Для этого использовали 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфо кислоту) (АБТС) в виде диаммонийной соли (Sigma, степень чистоты 98 %).

Протеомный анализ. Выделение общей фракции клеточных белков из листовой ткани брусники обыкновенной проводили на основе методологии, разработанной S. Amme с соавт. [17] и D. Vincent с соавт. [18].

Фракции белков очищали от примесей с помощью набора реагентов 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare, США).

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) проводили с использованием автоматической станции PROTEAN i12 (Bio-Rad Laboratories, США) на иммобилизованных сухих стрипах ReadyStrip IPG Strips с иммобилизованным градиентом pH (pI 3–10 L) длиной 11 см (Bio-Rad).

После проведения ИЭФ IPG-стрипы уравнивали с буферными системами для вертикального электрофореза (ЭФ) белков в денатурирующих условиях в щелочной системе. Затем как 2-е направление 2D-электрофореза проводили вертикальный ЭФ белков в денатурирующих условиях в щелочной системе по методу U. K. Laemmli [19] на готовых гелях Criterion TGX Precast Midi Protein Gel в камере для ЭФ Criterion Cell (Bio-Rad). После ЭФ гели окрашивали красителем Oriole Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad). Окрашенные гели фотографировали, используя систему VersaDoc (Bio-Rad). Анализ протеомных карт проводили с помощью специализированного программного обеспечения PDQuest 2-D analysis software (Bio-Rad). Определение исследуемых белков по молекулярной массе (Мм) проводили, используя базу данных UniProt.

Результаты и их обсуждение. Изучено влияние лактата хитозана, янтарной кислоты, экстракта хвои пихты на ростовые параметры при адаптации в условиях *ex vitro* представителя семейства *Ericaceae* – брусники обыкновенной сорта 'Red Pearl'.

По сравнению с контрольными растениями, после обработок исследуемыми элиситорами наблюдался более быстрый прирост новых побегов, увеличение их средней длины, а также количества и размеров листьев (рис. 1). Следует отметить, что самые крупные размеры листовых пластинок зафиксированы при использовании янтарной кислоты, при обработке растений лактатом хитозана и экстрактом хвои пихты – чуть меньше.

Уже после первой обработки элиситорами все группы растений превосходили группу контроля по всем исследуемым показателям. Эта тенденция сохранилась и в дальнейшем – прирост надземной части увеличивался с каждой обработкой (рис. 2).

Для брусники сорта 'Red Pearl' наиболее эффективным элиситором, который повлиял на прирост новых побегов и их длину, явилась янтарная кислота. Следующим по результативности стал лактат хитозана. Среднее количество листьев на побеге было выше после обработки лактатом хитозана и экстрактом хвои пихты.

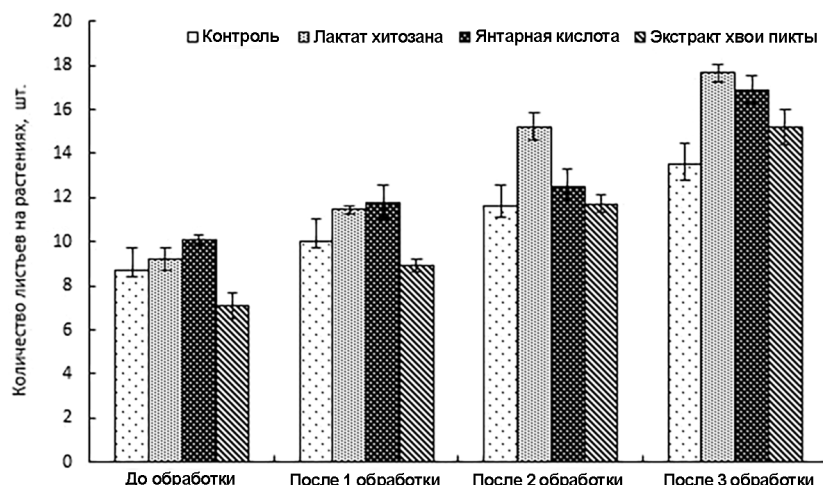


Рис. 1. Среднее количество листьев на растении *Vaccinium vitis-idaea* L. сорта 'Red Pearl'

Fig. 1. Average number of leaves on the *Vaccinium vitis-idaea* L. cv. 'Red Pearl' plant

Таким образом, проведенные исследования выявили стимулирующее воздействие всех используемых элиситоров на ростовые процессы, что подтверждает возможность их применения при адаптации брусники обыкновенной сортовой в технологиях производства растительной продукции.

Чтобы изучить влияние обработок элиситорами на фотосинтезирующий аппарат исследуемых растений, в листьях образцов определяли содержание и сумму хлорофиллов *a*, *b*, а также сумму каротиноидов.

Показатели содержания хлорофиллов *a* и *b* во всех вариантах с применением элиситоров были выше, чем в контрольной группе. Сумма хлорофиллов *a* + *b* у растений брусники, обработанных лактатом хитозана, превышала контроль на 15 %, обработанных янтарной кислотой – на 13 %, экстрактом хвои пихты – на 9 %.

Суммы каротиноидов в листьях образцов, обработанных элиситорами, также были выше, чем в контроле: после обработки янтарной кислотой – на 16,5 %, лактатом хитозана – на 15,2 %, экстрактом хвои пихты – на 13,1 %.



Рис. 2. *Vaccinium vitis-idaea* L. сорта 'Red Pearl' после первой (верхний ряд) и третьей (нижний ряд) обработки элиситорами

Fig. 2. *Vaccinium vitis-idaea* L. cv. 'Red Pearl' after the first (top row) and after the third (bottom row) treatment of elicitors

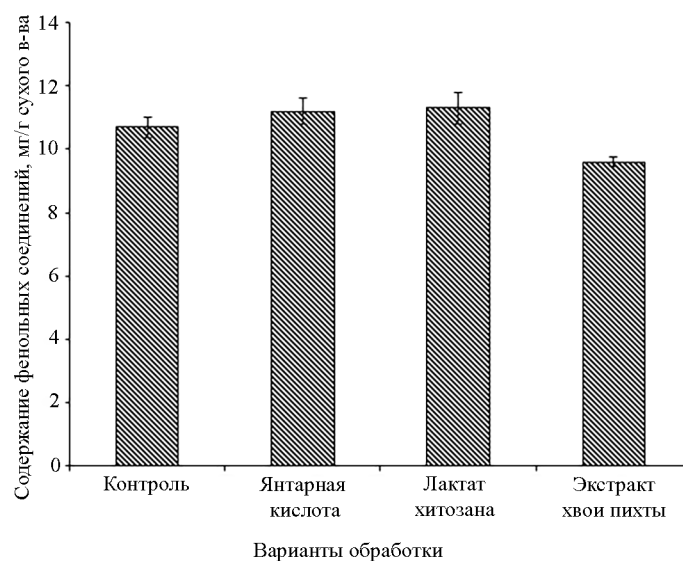


Рис. 3. Суммарное содержание ФС в листовых экстрактах *Vaccinium vitis-idaea* L. сорта 'Red Pearl' в зависимости от обработки элиситорами

Fig. 3. Total content of phenolic compounds in the leaf extracts of *Vaccinium vitis-idaea* L. cv. 'Red Pearl' after treatment with elicitors

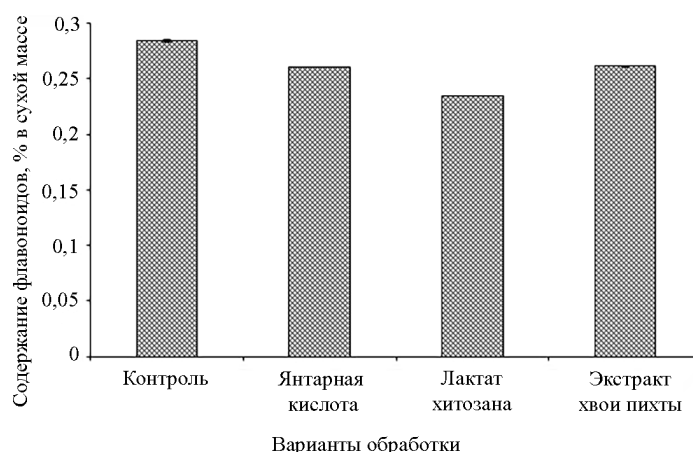


Рис. 4. Содержание флавоноидов в листовых экстрактах *Vaccinium vitis-idaea* L. сорта 'Red Pearl' в зависимости от обработки элиситорами

Fig. 4. Flavonoid content in the leaf extracts of *Vaccinium vitis-idaea* L. cv. 'Red Pearl' after treatment with elicitors

Таким образом, было показано, что обработка элиситорами оказывает заметное положительное влияние на фотосинтетический аппарат брусники [20].

Спустя месяц после обработок элиситорами в экстрактах брусники сорта 'Red Pearl' измеряли общее содержание ФС (рис. 3), флавоноидов (рис. 4) и ОКК (рис. 5).

Наибольшее количество ФС в экстрактах было отмечено при внекорневой обработке растворами лактата хитозана ($11,29 \pm 0,02$ мг/г сухого вещества) и янтарной кислоты ($11,23 \pm 0,02$ мг/г сухого вещества), а наименьшее – при обработке экстрактом хвои пихты ($9,61 \pm 0,06$ мг/г сухого вещества). Суммарное содержание ФС в листовых экстрактах контроля (без обработки) составило $10,69 \pm 0,02$ мг/г сухого вещества.

Количество флавоноидов (рис. 4) в экстрактах брусники сорта 'Red Pearl' при опрыскивании различными элиситорами во всех вариантах было практически одинаковым. В контрольном образце данный показатель составил $0,28 \pm 0,0009$ %, после обработки янтарной кислотой, а также в варианте обработки экстрактом хвои пихты – $0,26 \pm 0,0003$ % (на 7,14 % ниже, чем в контроле), после обработки хитозаном – $0,23 \pm 0,0002$ % (на 17,86 % ниже, чем в контроле).

По содержанию в экстрактах брусники ОКК наблюдалась схожая тенденция (рис. 5): во всех вариантах образцов количество ОКК уменьшилось по отношению к контролю. Минимальный показатель ОКК ($6,92 \pm 0,004$ ммоль/л) был отмечен в экстракте брусники, обработанной раствором лактата хитозана (на 17,52 % ниже, чем в контроле). После опрыскивания раствором янтарной кислоты и экстрактом хвои пихты снижение синтеза ОКК произошло приблизительно на 8 % (8,46 и 8,22 % соответственно).

Помимо определения общего содержания ФС, флавоноидов и ОКК, нами была проведена оценка антиоксидантных свойств экстрактов в системе с катион-радикалами АБТС+•. Из результатов, приведенных в таблице, видно, что АОА экстрактов брусники сорта 'Red Pearl' колебалась в пределах от 154,06 до 184,79 мкмоль тролокса/г сухих листьев после 1-й мин проведения реакции и от 209,59 до 243,80 мкмоль тролокса/г сухих листьев – после 6-й мин. Как на 1-й, так и на 6-й мин наибольшие значения АОА были зафиксированы в экстрактах контрольных растений, а наименьшие – при обработке растений брусники экстрактом хвои пихты: АОА снизилась на 16,6 % по отношению к контролю на 1-й мин эксперимента, а на 6-й мин – на 14 %.

Таким образом, во всех вариантах обработки отмечено незначительное снижение АОА по сравнению с контролем.

Наиболее эффективным средством защиты организма от патологического действия активных форм кислорода (АФК) и других радикальных продуктов являются антиоксидантные вещества фенольной природы, к которым относятся и флавоноиды. Их биологическая активность обусловлена наличием реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Антиоксидантное действие флавоноидов брусники, в частности кверцетина, содержащегося в листьях, проявляется в способности захватывать АФК и ингибировать ферменты, участвующие в генерации АФК [21].

В стрессовых условиях в растительном организме происходит увеличение синтеза вторичных метаболитов. Однако при обработке растений элиситорами в экстрактах из листовой ткани брусники обыкновенной наблюдали снижение количества ФС, флавоноидов и ОКК, а также АОА по сравнению с контролем, что свидетельствует об их положительном влиянии на рост и развитие растений.

Изменения в метаболизме, физиологических функциях и ростовых процессах любого растительного организма прежде всего связаны с изменениями в экспрессии генов. Поэтому при различных эпигенетических воздействиях изменение экспрессии генов будет проявляться в изменении белкового состава. В связи с этим мы впервые провели исследование протеомного состава листовой ткани брусники после обработки элиситорами.

Для достижения оптимальных результатов исследований в протеомике процедура пробоподготовки имеет решающее значение. Особенно это касается растительных тканей, которые содержат высокие уровни соединений, мешающих анализу. Необходимо отметить, что получение качественного образца для протеомных исследований усложняет и тот факт, что

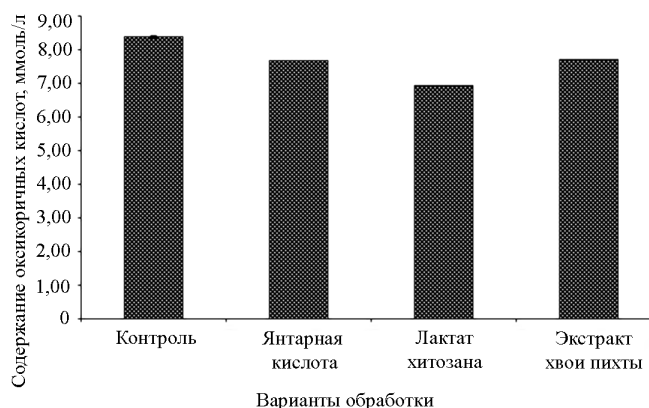


Рис. 5. Содержание ОКК в листовых экстрактах *Vaccinium vitis-idaea* L. сорта 'Red Pearl' в зависимости от обработки элиситорами

Fig. 5. Oxycinnamic acids content in the leaf extracts of *Vaccinium vitis-idaea* L. cv. 'Red Pearl' after treatment with elicitors

АОА листовых экстрактов *Vaccinium vitis-idaea* L. сорта 'Red Pearl' в зависимости от обработки элиситорами

Antioxidant activity of *Vaccinium vitis-idaea* L. leaf extracts of cv. 'Red Pearl' after treatment of elicitors

Обработка элиситорами	АОА, мкмоль тролокса/г сухих листьев	
	1-я мин эксперимента	6-я мин эксперимента
Контроль	184,79	243,80
Янтарная кислота	172,27	231,13
Лактат хитозана	171,17	230,91
Экстракт хвои пихты	154,06	209,59

многие растительные ткани не содержат достаточного количества белка, необходимого для анализа, и содержат различные концентрации вторичных метаболитов.

Проведен первичный сравнительный анализ общего протеома листовой ткани брусники обыкновенной сорта ‘Red Pearl’ после обработки элиситорами (лактатом хитозана, экстрактом хвои пихты и янтарной кислотой).

Показано, что белковые профили контрольного варианта и растений, обработанных различными элиситорами, характеризовались высокой степенью идентичности. При анализе полученных протеомных карт выявлено, что после обработки экстрактом хвои пихты заметных различий между опытом и контролем не наблюдается.

На рис. 6 представлены протеомные карты брусники обыкновенной сорта ‘Red Pearl’ без обработки (контроль) (рис. 6, *a*) и после обработки янтарной кислотой (рис. 6, *b*), лактатом хитозана (рис. 6, *c*).

При внекорневой обработке брусники янтарной кислотой (рис. 6, *b*) протеомные карты опыта и контроля (рис. 6, *a*) практически не имели различий. Однако на электрофореграмме после обработки янтарной кислотой наблюдали значительное усиление экспрессии белка с Мм 21,6 кДа, рI 9,8, предположительно, относящегося к классу белков PR-5, обладающих антигрибной активностью.

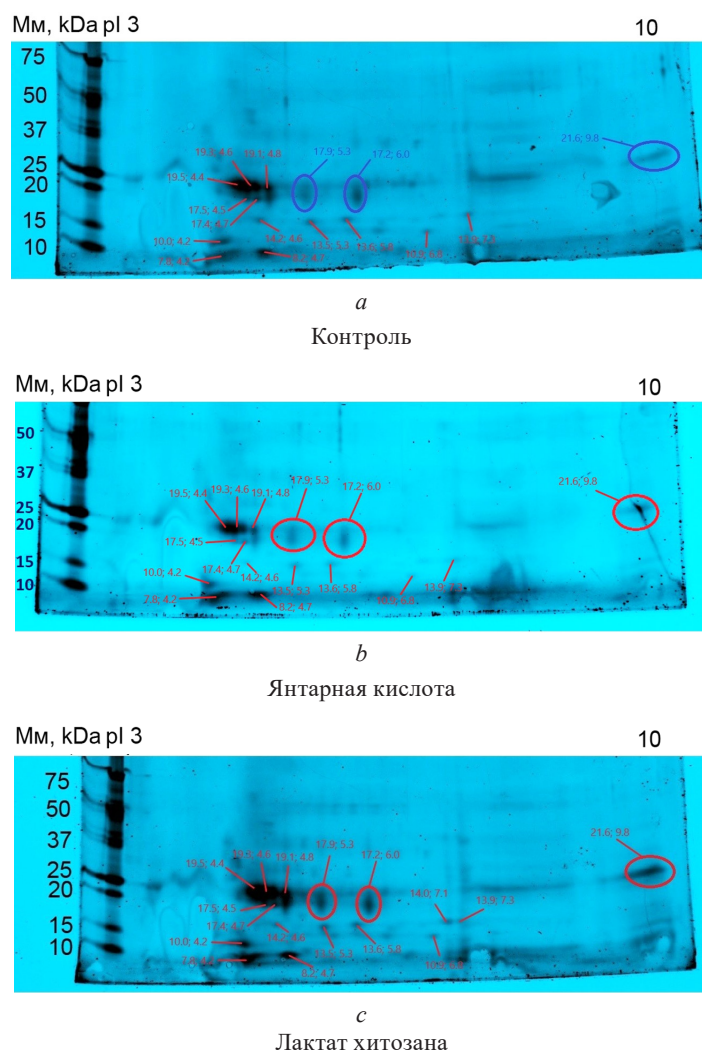


Рис. 6. Протеомные карты листовой ткани *Vaccinium vitis-idaea* L. сорта ‘Red Pearl’: контроль (*a*), обработка янтарной кислотой (*b*) и лактатом хитозана (*c*). Кругами отмечены белки, имеющие отличия по силе экспрессии

Fig. 6. Proteomic maps of *Vaccinium vitis-idaea* L. cv. ‘Red Pearl’ leaf tissue: control (*a*), succinic acid (*b*) and chitosan lactate treatment (*c*). Circles indicate proteins that demonstrate differences in expression strength

При обработке растений лактатом хитозана (рис. 6, с) заметно усилилась экспрессия низкомолекулярных кислых полипептидов с Мм 17,9 (pI 5,3) и 17,2 кDa (pI 6,0), а также основного белка с Мм 21,6 кDa, pI 9,8. Мы полагаем, что низкомолекулярные белки, отсутствующие на электрофореграмме контрольных растений, относятся к классу низкомолекулярных PR-белков защитного ответа (Мм 13–36 кDa), синтезирующихся в растениях в ответ на стресс.

Белки с Мм 17,9 кDa (pI 5,3) и 17,2 кDa (pI 6,0) относятся к классу белков PR-10 (белки защитного ответа, которые вырабатываются в растениях в ответ на стрессовое воздействие). Белок с Мм 21,6 кDa и pI 9,8 может принадлежать к классу гидролаз, предположительно, это ксиланаза F1X (Мм 22 кDa) – фермент, индуцирующий биосинтез этилена и активирующий другие симптомы иммунного ответа. Также, исходя из рассчитанной молекулярной массы и значения pI, данный полипептид может относиться к группе перматинов (класс PR-5 белков), проявляющих антигрибную активность.

В дальнейшем для более точной идентификации выявленных белков иммунного ответа планируется провести масс-спектрометрический анализ.

Данные, полученные методом протеомного анализа, согласуются с данными по содержанию вторичных метаболитов и пигментов фотосинтеза (изменение их содержания после обработок элиситорами), что говорит об ответной реакции на молекулярном, метаболомном и физиологическом уровнях.

Заключение. В процессе роста и развития растения сталкиваются с большим количеством биотических и абиотических факторов стрессового воздействия. Для успешного приспособления к условиям окружающей среды в растительном организме происходит изменение путей вторичного метаболизма, в первую очередь индукция синтеза биологически активных веществ (БАВ) фенольной природы, которые обладают ярко выраженной АОА, что помогает растению успешно преодолевать стресс. Также физиологический статус растительного организма можно оценить по его протеомному составу. Анализ указанных показателей помогает определить адаптивный потенциал растения.

В наших исследованиях изучено влияние элиситоров (лактата хитозана, янтарной кислоты, экстракта хвои пихты) на изменение физиолого-биохимических показателей представителя семейства *Ericaceae* брусники обыкновенной сортовой при адаптации к условиям *ex vitro*. Определено влияние внекорневых обработок на габитус растений, на содержание пигментов фотосинтеза, флавоноидов, ОКК, ФС, АОА и протеомный состав. Показано стимулирующее действие лактата хитозана и янтарной кислоты на биометрические и биохимические показатели брусники сорта 'Red Pearl' (изменение количества хлорофиллов и каротиноидов, БАВ, общего габитуса растений).

Впервые в республике методом 2D-электрофореза подтверждено воздействие элиситоров на адаптивный потенциал витроплантов брусники – на протеомных картах растений после обработки элиситорами выявлены белки стрессового ответа.

Доказана перспективность использования элиситоров для стимулирования у растений физиологических процессов адаптации. Изменение исследованных морфолого-физиологических и биохимических показателей в ответ на обработку говорит об ответной реакции на молекулярном, метаболитном и физиологическом уровнях (системный ответ). Возрастание экспрессии PR-белков также свидетельствует о повышении фитоиммунитета растений, обработанных элиситорами.

Полученные данные имеют прикладное значение, поскольку выявление механизмов устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды открывает широкие перспективы для развития биотехнологий.

Результаты проведенных исследований демонстрируют перспективность применения элиситоров (модификаторов неспецифической устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам) в технологиях производства посадочного материала хозяйственно-ценных культур. Показано, что управление стрессоустойчивостью, включая невосприимчивость к патогенам, может быть осуществлено не только с помощью селекции, но и путем обработки растений БАВ, усиливающими синтез определенных гормонов и/или стимулирующих образование в растительных тканях антипатогенных веществ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Соколов, Ю. А. Элиситоры и их применение в растениеводстве / Ю. А. Соколов. – Минск: Беларус. навука, 2016. – 201 с.
2. Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence / A. Renelt, C. Colling, K. Hahlbrock [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 1993. – Vol. 44, N 258, Suppl. – P. 257–268.
3. Мохамед, Э. И. Оценка инсектицидной активности растений флоры Египта: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Мохамед Ибрагим Мохамед Эльсергани; Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева. – М., 2012. – 132 л.
4. Тарчевский, И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
5. Collins, A. R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols / A. R. Collins // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2005. – Vol. 81, N 1, Suppl. – P. 261–267. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.261s>
6. Чижик, О. В. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.): протеомные и молекулярно-генетические исследования / О. В. Чижик, А. Н. Юхимук, В. Н. Решетников // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 147–157.
7. Озерковская, О. Л. Хитозан как элиситор индуцированной устойчивости растений: Хитин, его строение и свойства. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / О. Л. Озерковская, Н. И. Васюкова, С. В. Зиновьева. – М.: Наука, 2002. – 345 с.
8. Коф, Э. М. Антистрессовые эффекты янтарной кислоты на растение / Э. М. Коф, Т. А. Борисова // *Регуляторы роста и развитие растений: тез. докл. 5 Междунар. конф., Москва, 29 июня–1 июля 1999 г.: в 2 т. / редкол.: В. С. Шевелуха [и др.]; Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева. – М., 1999. – Т. 1. – С. 97–108.*
9. Яковлева, В. Г. Ростостимулирующее действие экзогенной янтарной кислоты на растения / В. Г. Яковлева, Н. Н. Максютова // *Регуляторы роста и развитие растений: тез. докл. 5 Междунар. конф., Москва, 29 июня–1 июля 1999 г.: в 2 т. / редкол.: В. С. Шевелуха [и др.]; Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева. – М., 1999. – Т. 2. – С. 284.*
10. Леонова, М. В. Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учеб.-метод. пособие / М. В. Леонова, Ю. Н. Климочкин. – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2012. – 111 с.
11. Белокуров, С. С. Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного с высоким содержанием биологически активных веществ / С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 35–39.
12. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): Разработана на основе Европейской фармакопеи. В 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; под общ. ред. С. И. Марченко. – Молодечно: Тип. «Победа», 2016. – Т. 2: Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья. – 1368 с.
13. Analysis of antioxidative phenolic compounds in Artichoke (*Cynara scolymus* L.) / M. F. Wang, J. E. Simon, I. F. Aviles [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – Vol. 51, N 3. – P. 601–608. <https://doi.org/10.1021/jf020792b>
14. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – 429 с.
15. Bauer, N. Rosmarinic acid synthesis in transformed callus culture of *Coleus blumei* Benth / N. Bauer, D. Leljak-Levanic, S. Jevaska // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 2004. – Vol. 59, N 7–8. – P. 554–560. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-819>
16. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1999. – Vol. 26, N 9–10. – P. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
17. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes / S. Amme, T. Rutten, M. Melzer [et al.] // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5, N 10. – P. 2508–2518. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401274>
18. Vincent, D. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters / D. Vincent, M. D. Wheatley, G. R. Cramer // *Electrophoresis*. – 2006. – Vol. 27, N 9. – P. 1853–1865. <https://doi.org/10.1002/elps.200500698>
19. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
20. Вайновская, И. Ф. Влияние элиситоров на морфолого-физиологические параметры *Vaccinium vitis-idaea* L. при адаптации *ex vitro* / И. Ф. Вайновская, А. С. Круль, О. В. Чижик // *Теоретические и прикладные аспекты организации, проведения и использования мониторинговых наблюдений: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 95-летию со дня рождения члена-корреспондента НАН Беларуси Е. А. Сидоровича, 9–10 марта 2023 г. / Центр. ботан. сад НАН Беларуси; редкол.: Ж. А. Рупасова [и др.]. – Минск, 2023. – С. 143–145.*
21. Кочарян, Г. Г. Антиоксидантные свойства флавоноидов – кверцетина, морина, нарингина и рутина и их связывание с ДНК: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.04 / Кочарян Гаспар Грайрович; Ин-т химической физики им. А. Б. Налбандяна Нац. акад. наук Респ. Армения. – Ереван, 2016. – 114 л.

References

1. Sokolov Yu. A. *Elicitors and their application in crop production*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2016. 201 p. (in Russian).
2. Renelt A., Colling C., Hahlbrock K., Niirnerberger T., Parker J. E., Sacks W. R., Scheel D. Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence. *Journal of Experimental Botany*, 1993, vol. 44, no. 258, suppl., pp. 257–268.
3. Mokhamed E. I. *Assessment of the insecticidal activity of plants of the flora of Egypt*. Ph. D. Thesis. Moscow, 2012. 132 p. (in Russian).
4. Tarchevskii I. A. *Signaling systems of plant cells*. Moscow, Nauka Publ., 2002. 294 p. (in Russian).
5. Collins A. R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Journal of Clinical Nutrition*, 2005, vol. 81, no. 1, suppl., pp. 261–267. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.261s>
6. Chizhik O. V., Yukhimuk A. N., Reshetnikov V. N. High blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.): proteomic and molecular genetic studies. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 147–157 (in Russian).

7. Ozerkovskaya O. L., Vasyukova N. I., Zinov'eva S. V. *Chitosan as an elicitor of induced plant resistance: Chitin, its structure and properties. Chitin and chitosan. Preparation, properties and application*. Moscow, Nauka Publ., 2002. 345 p. (in Russian).
8. Kof E. M., Borisova T. A. Anti-stress effects of succinic acid on the plant. *Regulatory rosta i razvitie rastenii: tezisy dokladov pyatoi Mezhdunarodnoi konferentsii, Moskva, 29 iyunya–1 iyulya 1999 goda. Tom 1* [Plant growth regulators and development: abstracts of the reports of the fifth International Conference, Moscow, June 29–July 1, 1999. Vol. 1]. Moscow, 1999, pp. 97–108. (in Russian).
9. Yakovleva V. G., Maksyutova N. N. Growth-stimulating effect of exogenous succinic acid on plants. *Regulatory rosta i razvitie rastenii: tezisy dokladov pyatoi Mezhdunarodnoi konferentsii, Moskva, 29 iyunya–1 iyulya 1999 goda. Tom 2* [Plant growth regulators and development: abstracts of the reports of the fifth International Conference, Moscow, June 29–July 1, 1999. Vol. 2]. Moscow, 1999, p. 284 (in Russian).
10. Leonova M. V., Klimochkin Yu. N. *Extraction methods for the manufacture of medicines from plant raw materials*. Samara, Samara State Technical University, 2012. 111 p. (in Russian).
11. Belokurov S. S., Flisyuk E. V., Smekhova I. E. The choice of extraction method for obtaining extracts from fenugreek seeds with a high content of biologically active substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* [Development and registration of medicines.], 2019, vol. 8, no. 3, pp. 35–39 (in Russian).
12. *The State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: developed on the basis of the European Pharmacopoeia: Quality control of substances for pharmaceutical use and medicinal plant materials. Vol. 2*. Molodechno, Tipografiya “Pobeda” Publ., 2016. 1368 p. (in Russian).
13. Wang M. F., Simon J. E., Aviles I. F., He K., Zheng Q., Tadmor Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no. 3, pp. 601–608. <https://doi.org/10.1021/jf020792b>
14. Ermakov A. I., Arasimovich V. V., Yarosh N. P., Perushanskii Yu. V., Lukovnikova G. A., Ikonnikova M. I. *Methods of biochemical research of plants. 3rd ed.* Leningrad, Agropromizdat. Leningradskoe otделение Publ., 1987. 429 p. (in Russian).
15. Bauer N., Leljak-Levanic D., Jevaska S. Rosmarinic Acid Synthesis in Transformed Callus Culture of *Coleus blumei* Benth. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2004, vol. 59, no. 7–8, pp. 554–560. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-819>
16. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
17. Amme S., Rutten T., Melzer M., Sonnsman G., Vissers J. P. S., Schlesier B., Mock H. P. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 2005, vol. 5, no. 10, pp. 2508–2518. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401274>
18. Vincent D., Wheatley M. D., Cramer G. R. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, no. 9, pp. 1853–1865. <https://doi.org/10.1002/elps.200500698>
19. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
20. Vainovskaya I. F., Krul' A. S., Chizhik O. V. The effect of elicitors on the morphological and physiological parameters of *Vaccinium vitis-idaea* L. when adapting *ex vitro*. *Teoreticheskie i prikladnye aspekty organizatsii, provedeniya i ispol'zovaniya monitoringovykh nablyudenii: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, posvyashchennoi 95-letiyu so dnya rozhdeniya chlena-korrespondenta NAN Belarusi E. A. Sidorovicha (9–10 marta 2023 goda, Minsk)* [Theoretical and applied aspects of the organization, implementation and use of monitoring observations: Proceedings of the international scientific conference dedicated to the 95th anniversary of the birth of Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus E. A. Sidorovich (March 9–10, 2023, Minsk)]. Minsk, 2023, pp. 143–145 (in Russian).
21. Kocharyan G. G. *Antioxidant properties of flavonoids – quercetin, morin, naringin and rutin and their binding to DNA*. Ph. D. Thesis. Armenia, Yerevan, 2016. 114 p. (in Russian).

Інфармацыя аб аўторах

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

Мазур Татьяна Васильевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tmazur@inbox.ru

Кардаш Елизавета Борисовна – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kardaselizaeta@gmail.com

Information about the authors

Olga V. Chizhik – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chizhikolga17@gmail.com, chizhik@cbg.org.by

Tatyana V. Mazur – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tmazur@inbox.ru

Elizaveta B. Kardash – Junior Research. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kardaselizaeta@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

UDC 349.6:502.175:004.89:004.4

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-118-124>

Received 21.10.2024

Michail E. Nikiforov¹, Lidiya O. Dashevskaya¹, Konstantin V. Homel¹, Arseniy A. Valnisty¹,
Tatyana G. Shagova², Lesya I. Kaigorodova², Denis A. Belyavsky²,
Daria A. Zhalova², Yuras S. Getsevich²

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

²United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

BELARUSIAN BIRD ACOUSTIC RECOGNITION: DATA PREPARATION AND MODEL TRAINING PROCESS

Abstract. The issue of substantial labor and time demands for monitoring bird species diversity and range changes, especially in developing countries, invites novel technological solutions. The recent advancements in machine learning (ML) have led to breakthroughs in AI-based data processing, including tools for automated passive acoustic monitoring (PAM) that utilize on-site bird vocalizations. Here we describe our preliminary results and difficulties encountered when developing an EfficientNetB3-based model for a PAM system to monitor bird diversity in the forested areas of interest in Belarus. A novel dataset of bird vocalizations from Eastern Europe, processed and converted into mel-spectrograms allowed us to achieve a respectable f1-scores (>0.9) in tests for certain species such as nightjar and nutcracker. However, the overall score (0.52) for the 116 species of interest was unacceptably low. Further testing with a more specialized dataset allowed us to determine that the problem lies with the peculiarities of species, and is not limited to species with complex vocalizations. We hypothesize that model overfitting to specific vocalization signals may be one of the main causes. Additionally, certain species require a thorough coverage of their vocalization diversity in the dataset.

Keywords: passive acoustic monitoring, avian vocalizations, machine learning

For citation: Nikiforov M. E., Dashevskaya L. O., Homel K. V., Valnisty A. A., Shagova T. G., Kaigorodova L. I., Belyavsky D. A., Zhalova D. A., Getsevich Yu. S. Belarusian bird acoustic recognition: data preparation and model training process. *Vestsi Natsyynal'най akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 118–124. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-118-124>

М. Е. Никифоров¹, Л. О. Дашевская¹, К. В. Гомель¹, А. А. Волнистый¹, Т. Г. Шагова²,
Л. И. Кайгородова², Д. А. Белявский², Д. А. Жалова², Ю. С. Гецевич²

¹Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

²Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВ ПТИЦ БЕЛАРУСИ С ПОМОЩЬЮ НЕЙРОСЕТЕВОГО АНАЛИЗА ВОКАЛИЗАЦИЙ: ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ ДАННЫХ И ОБУЧЕНИЯ МОДЕЛИ

Аннотация. Проблема значительных трудовых и временных затрат для осуществления эффективного мониторинга диких популяций птиц требует современных технологических решений. Актуальные достижения в области машинного обучения обеспечили прорыв в возможностях анализа больших объемов данных с использованием нейросетей, и одним из перспективных методов применения этой технологии является ее использование в рамках пассивного акустического мониторинга (ПАМ) – перспективного подхода для наблюдения за птицами, основанного на автоматическом определении видов животных по их вокализациям на звукозаписях. В настоящей публикации описываются промежуточные результаты и достижения, полученные в ходе разработки средства для автоматического определения видов птиц в рамках ПАМ в Беларуси на основе нейросетевой модели EfficientNetB3. Применение упомянутой модели, обученной на новом наборе акустических данных птичьих вокализаций (29,6 ч), подготовленном по специализированному алгоритму, позволило нам достичь высоких показателей достоверности определения видов птиц по записям их вокализаций (точность, $f1 > 0,9$) для большинства видов, как, например, для козодоя и кед-ровки. Средний результат получен по полному перечню из 116 видов птиц. Углубленное тестирование позволило нам установить комплексную связь между видовыми особенностями вокализаций и точностью определения видов моделью на основе акустических данных. Мы предполагаем, что ключевыми факторами, снижающими показатели автоматизированного видового определения, являются оверфиттинг на конкретных акустических сигналах, а также неполное покрытие разнообразия вокализаций использованным в обучении набором данных.

Ключевые слова: пассивный акустический мониторинг, птичьи вокализации, машинное обучение

Для цитирования: Определение видов птиц Беларуси с помощью нейросетевого анализа вокализаций: особенности подготовки данных и обучения модели / М. Е. Никифоров, Л. О. Дашевская, К. В. Гомель [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 118–124. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-118-124>

Introduction. Bird vocalizations serve as a vital means of communication for a large part of the avifauna, with numerous characteristics that make species identification possible from acoustic data alone. This makes passive acoustic monitoring (PAM) a strong option for monitoring avian species diversity, migrations, and conservation. The use of PAM experiences significant growth due to the increasing availability and convenience of autonomous digital recording devices with the capacity for passive registration of animal vocalizations across areas of interest and obtaining huge volumes of acoustic data [1]. The massive amount of acoustic data, however, presents a challenge in terms of efficient processing and classification of species vocalizations present in the recordings [2, 3]. Solutions based on machine learning (ML) are currently seen as the most effective approaches to bird species identification in acoustic data [4] with numerous projects reaching good results with ML-based PAM systems [5–7]. ML solutions allow for automated classification of bird vocalizations in acoustic data, which drastically reduce labor requirements for monitoring efforts [3]. Such solutions can provide thorough and up-to-date monitoring of avian fauna diversity, migrations, and range changes for the purposes of conservation in areas that are not receiving sufficient attention.

The ML model (“the model” from here on) is aimed at providing PAM suited to local Belarusian avifauna, and meant to use natural acoustic data collected at monitoring stations across Belarus using passive recording equipment to reliably identify certain species for the purposes of monitoring and conservation. Here we describe our experience with implementing such model, focusing on the process, choice of the model architecture, data preparation, preliminary results, and encountered difficulties.

Materials and research methods. The Belarusian avifauna currently includes 342 species [8]. We set our goal at sufficiently reliable identification of 116 vocalizing species inhabiting woodland areas using acoustic data gathered on-site. To form the dataset for the model training we have taken acoustic recordings of bird vocalizations made in the field and the recordings from the open acoustic datasets, such as Xeno-Canto [9], that were made in Belarus or its surroundings, mostly from Eastern Europe. All field recordings used in this study were obtained in accordance with ABA Code of Birding Ethics. Each recording was checked and annotated manually by a qualified specialist with start and end timestamps for the vocalizations of foreground and background bird’s species and the noise sounds present at the recording. We used this approach to form an original dataset consisted of approximately 2300 audio records with approximately 41 000 labels of avian vocalizations. Additionally, we used the open database FSD50k [10] for our dataset to train the model’s capacity to recognize interfering noises.

To prepare the data for the model training the records in the dataset were broken into 2-second windows. Consecutive annotations with durations below 1 second were united into a single annotation if the pauses between them were below 0.5 seconds. Then the long annotations with duration more than 1 second were divided into 2-second windows with a 1.75 second shift, ensuring that each window contains at least 1 second of vocalization. Short vocalizations below 1-second length were taken in a 2-second context as a single window. We attributed each 2-second window with the main species present in it, as well as a separate list of any background species’ vocalizations present. Background species not present in the 116 species list were marked as “unknown”.

This approach allowed us to obtain a dataset of approximately 50 thousand 2-second windows with marked vocalizations of 116 species of interest. To prevent data leak, the dataset of 2 seconds windows was divided into train/test/validation datasets with approximate percentages 60 %–20 %–20 % so that each 2-second window produced from the same recording ended up in the same dataset. To balance the dataset between various species, we utilized various methods of data augmentation, including time shifting, noise and pitch shifting, and signal mixing, with the latter being implemented in the final dataset as the most effective approach.

In our earlier efforts [11], we changed the sample rate (sr) of the audio records to 22050 Hz, and converted them into mel-spectrograms with the Fast Fourier Transform window length (n_fft) of 1024,

512 samples between consecutive windows (hop_length) and 128 mel-filters (n_mels). The conversion process also removed frequencies below 1400 Hz, as target species (initially 50 species) do not use those frequencies much. This approach, however, displayed numerous issues, including the model trained this way severely struggling with identifying any *Columbiformes* and *Strigiformes* species. To counter this, we increased the acoustic range and adjusted the settings. The model described here was trained on mel-spectrograms that included the frequencies between 200 and 11025 Hz, with parameters $sr = 22050$, $n_fft = 512$, $hop_length = 128$, and $n_mels = 128$. Additionally, we compressed the acoustic signal according to μ -law compression after applying resampling and normalization, which served to “balance” the signal, making weak vocalizations more pronounced. We believe that this approach allowed us to extract the most acoustic information content into the spectrograms, improving the effectiveness of the obtained dataset for model training, and so these methods were the ones used to prepare data for model training and obtain the results discussed below.

The procedure of the model’s recognition function is to divide the provided files into windows of certain length, detect recognizable acoustic signals (such as bird vocalizations), and classify them as one of the predetermined bird species, or interfering noise. We based the present model on a pre-trained convolutional neural network EfficientNetB3. While similar convolutional neural networks, such as ResNet [12] or Inception [13] were successfully used for similar goals, we chose EfficientNetB3 for its limited size and high performance characteristics [14, 15], as demonstrated in BirdCLEF-2023 challenge [16]. These are vital for use under conditions of limited computing power. We then added *Flatten*, *Dropout* and *Dense* layers to the model. Originally we used *softmax* as the activation function for the last layer, and *categorical cross entropy* as the loss function, but this approach introduced issues with identifying multiple species present at the same window. To address that, we switched the activator to *sigmoid*, and the loss function to *binary cross entropy*, allowing us to turn a multiclass classification task (one window – one prediction) into a multilabel classification task (one window – multiple predictions). We also used *Adam* optimizer.

The training process included 50 epochs with learning rate adjustment per *ReduceLROnPlateau*. To estimate the overall effectiveness of the model, we used the Precision, Recall and *F1*-score metrics obtained for the selection of the original dataset reserved for testing purposes.

Precision is a measure of the proportion of true positive predictions out of all positive predictions made by the model:

$$Precision = \frac{True\ positives}{True\ positives + False\ positives}.$$

Recall is the measure of the proportion of true positive predictions out of all the actual positive instances in the dataset:

$$Recall = \frac{True\ positives}{True\ positives + False\ negatives}.$$

F1-score is the harmonic mean of precision and recall, combining both metrics into a single score:

$$F1 - score = \frac{2 \times Precision \times Recall}{Precision + Recall}.$$

Additional model testing. The central principle of this in-depth test is evaluating the model’s effectiveness when working with specific bird groups, recording quality and conditions. It is aimed at identifying the underlying issues that can be worked upon to improve the model’s true positive rate, before moving on to decrease false positive and false negative rates.

For additional testing, we divided the 116 species into 5 groups according to their estimated vocalization complexity (Table 1). Then we picked 3 random species from each group to form the selection of 15 species: Common woodpigeon (*Columba palumbus*), Bohemian waxwing (*Bombycilla garrulus*),

European turtle-dove (*Streptopelia turtur*), Hawfinch (*Coccothraustes coccothraustes*), Common cuckoo (*Cuculus canorus*), Hazel grouse (*Tetrastes bonasia*), Common raven (*Corvus corax*), Eurasian wren (*Troglodytes troglodytes*), Eurasian blackbird (*Turdus merula*), Tree pipit (*Anthus trivialis*), European robin (*Erithacus rubecula*), Blackcap (*Sylvia atricapilla*), Song thrush (*Turdus philomelos*), Great tit (*Parus major*), and Eurasian jay (*Garrulus glandarius*).

Table 1. Estimated vocalization complexity groups of avian species used for additional model testing

№	Characteristics	Species in the group
1	Structurally simple, monotypic vocalizations	Turtle dove, waxwing, common woodpigeon
2	Relatively simple vocalizations with no more than 2 highly prevalent signal types	Common cuckoo, hawfinch, hazel grouse
3	Intermediate complexity vocalizations	Common raven, Eurasian wren, Eurasian blackbird
4	Highly complex vocalizations including widely varying signals	Tree pipit, European robin, blackcap
5	Highly complex vocalizations including vocal mimicry of other species	Song thrush, great tit, Eurasian jay

The selected species were also represented by various amounts of annotated vocalization data within the training dataset, which allows us to estimate the effect that the amount of training data, used for individual species, has on the model's effectiveness. The number of annotated vocalizations for each selected species, as well as for each vocalization complexity group is given in Fig. 1.

To perform the test, we formed an additional set of 362 new natural acoustic recordings, divided into 7 classes according to their quality and composition, with class I including 20 recordings per bird species, the remaining classes each including 1 recording per species, plus 2 control recordings. The classes and their characteristics are given in Table 2.

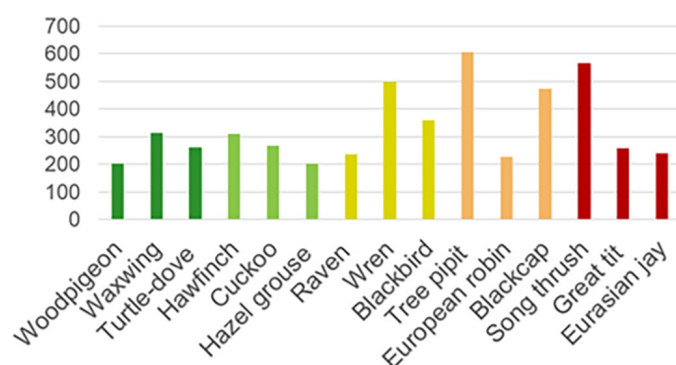


Fig. 1. The number of annotated vocalizations used to train the current iteration of the model, per species used for in-depth testing. Column color reflects the estimated vocalization complexity class of the species, from 1 (first three) to 5 (last three)

Table 2. Classification of recordings used for the additional analysis of the model's true positive rate capabilities

Type	Class	Contents
Test recordings	I (Typical) $n = 300$	A random selection of recordings of various quality with pronounced vocalizations of a single species, including or lacking interfering noises and background species vocalizations
	II (Clear) $n = 15$	High quality recordings with pronounced vocalizations of a single species, no noises or background vocalizations
	III (Noisy) $n = 15$	Recordings with pronounced vocalizations of a single species, rich in interfering noises, but without background vocalizations
	IV (Background) $n = 15$	Recordings with pronounced vocalizations of a single species, rich in background vocalizations of various species, but without interfering noises
	V (Noise and background) $n = 15$	Recordings with pronounced vocalizations of a single species, rich in both background vocalizations
Control recordings	VI (C1) $n = 1$	Files with no acoustic information present
	VII (C2) $n = 1$	Recordings possessing acoustic data without any bird vocalizations present

All test recordings were between 6 and 90 seconds in length. We ran the model on the abovementioned 362 records dataset and estimated the true positive rate with the criterion of at least one true positive result per recording counting as a success. We expected that the most consistently low success rate would point to the source of model's issues, be it classes of recordings, species, estimated vocalization difficulty or the amount of data used for training.

To estimate the baseline capacity of the model to identify bird vocalizations, we counted at least a single true positive result with the model's probability estimate at 0.4 or greater as a success, for the purpose of the additional test.

Results and discussion. The model testing on the 20 % test selection across the 116 target species displayed following average metrics: precision of 0.53, recall of 0.42 and *F1*-score of 0.52. The metrics for individual species are given in supplementary material 1. Results of additional testing are given in Table 3.

Table 3. Results for additional analysis of the model

Record class Species	Est. complexity	1 (Typical)	2 (Clear)	3 (Noisy)	4 (Background)	5 (Noise and background)
Woodpigeon	1	0.95	—	—	+	—
Waxwing		0.65	—	+	+	+
Turtle-dove		1	+	+	+	+
Hawfinch	2	0.2	—	—	—	—
Cuckoo		1	+	+	+	+
Hazel grouse		1	+	+	+	+
Raven	3	0.9	+	+	+	+
Wren		1	+	+	+	+
Blackbird		0.9	+	—	+	+
Tree pipit	4	0.9	+	+	+	—
European robin		0.35	+	+	—	—
Blackcap		0.6	—	—	—	+
Song thrush	5	0.25	—	—	—	—
Great tit		0.2	+	—	—	—
Eurasian jay		0	—	+	—	+
Controls		K1 No sound data			K2 Pure noise recording	
		+			—	

Note. For the column “1 (Typical)” the values indicate the ratio of recordings for which the model managed to achieve at least one true positive identification of that species out of 20 recordings. For the remaining columns a “+” indicates at least a successful true positive for the recording, and “–” a complete absence of true positive recordings. For the “Controls” row, “+” indicates absence of false positives, and “–” – at least a single false positive.

While the model's difficulties in obtaining any true positives for species with highly complex vocalizations (0.2 for great tit, 0 for Eurasian jay) was anticipated, the low values for certain species with relatively simple vocalizations (0.65 for waxwing, 0.2 for hawfinch) were unexpected. Another significant detail is the lack of correlations between true positive results and the presence of interfering noise or background vocalizations. We did not detect a significant correlation between the sheer volume of vocalization data and the true positive rate either (Fig. 2).

Conclusion. The testing of the current model iteration points us towards a few conclusions that might be useful for the development of similar PAM systems using ML and convolutional neural networks in particular. The major point would be the high effect of vocalization peculiarities of certain species on the system's performance, which can affect the model's effectiveness in identifying species with simple vocalizations as well as those with highly complex ones. We theorize that the low density of unique elements in certain simple vocalizations has negative effects on the effectiveness of model, particularly through pattern overfitting, which makes the model highly prone to false positive classification when faced with similar types of signals. Another possibility is the prevalence of high-frequency elements, or elements underrepresented in the training dataset among the species' vocalizations, which reduce the training effectiveness.

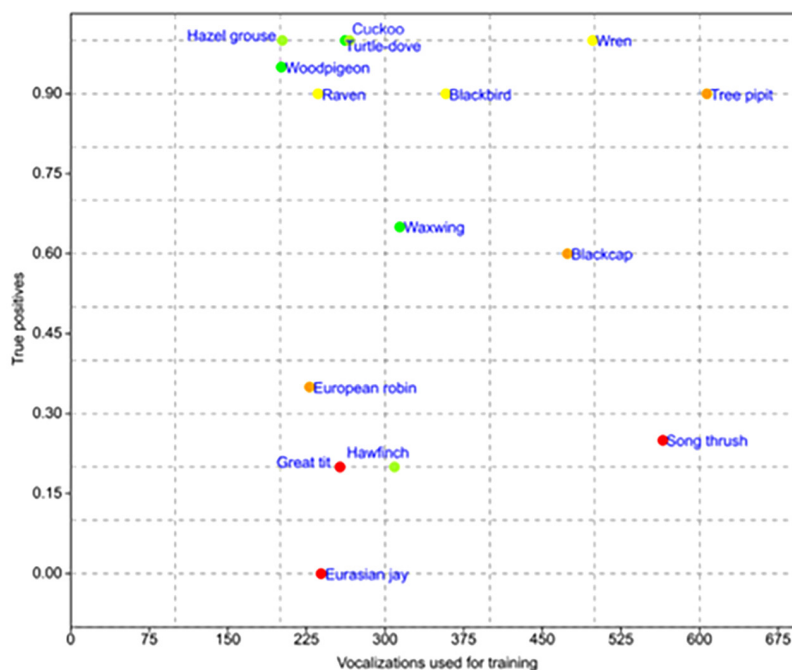


Fig. 2. The achieved true positives (Y-axis) per vocalization used for training (X-axis) for each species used in the additional analysis. The dot color represents the estimated vocalization difficulty for the species, colors identical to those in Fig. 1

The success of similar models for PAM indicates that the issue can be overcome with sufficient volume and diversity of data, and we believe that there are two key elements that deserve additional attention. Firstly, measures should be taken to ensure that the dataset includes all the possible vocal variations of any given species for the region of interest. Secondly, the problematic species must be detected empirically at the early stage of work, and the subsequent data gathering should aim to meet the necessary data volume and diversity thresholds for those species and their particular vocalizations.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Priyadarshani N., Marsland S., Castro I. Automated birdsong recognition in complex acoustic environments: a review. *Journal of Avian Biology*, 2018, vol. 49, no. 5, p. jav-01447. <https://doi.org/10.1111/jav.01447>
2. Klein D. J., Mckown M. W., Tershy B. R. Deep Learning for Large Scale Biodiversity Monitoring. *Bloomberg Data for Good Exchange*. New York, 2015. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1051.7201>
3. Miao Z., Gaynor K. M., Wang J., Liu Z., Muellerklein O., Norouzzadeh M. S., McInturff A., Bowie R. C. K., Nathan R., Yu S. X., Getz W. M. Insights and approaches using deep learning to classify wildlife. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 8137. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44565-w>
4. Sharma S., Sato K., Gautam B. P. A Methodological Literature Review of Acoustic Wildlife Monitoring Using Artificial Intelligence Tools and Techniques. *Sustainability*, 2023, vol. 15, no. 9, art. 7128. <https://doi.org/10.3390/su15097128>
5. Wood C. M., Kahl S., Rahaman A., Klinck H. The machine learning-powered BirdNET App reduces barriers to global bird research by enabling citizen science participation. *PLOS Biology*, 2022, vol. 20, no 6, p. e3001670. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001670>
6. Bota G., Manzano-Rubio R., Catalán L., Gómez-Catasús J., Pérez-Granados C. Hearing to the Unseen: AudioMoth and BirdNET as a Cheap and Easy Method for Monitoring Cryptic Bird Species. *Sensors*, 2023, vol. 23, no. 16, art. 7176. <https://doi.org/10.3390/s23167176>
7. Ware L., Mahon C. L., McLeod L., Jetté J.-F. Artificial intelligence (BirdNET) supplements manual methods to maximize bird species richness from acoustic data sets generated from regional monitoring. *Canadian Journal of Zoology*, 2023, vol. 101, no. 12, pp. 1031–1051. <https://doi.org/10.1139/cjz-2023-0044>
8. Karlionova N. V., Borodin A. V., Samusenko I. E., Nikiforov M. E. Records of rare birds approved by the Belarusian Ornithofaunistic Commission in 2021 and 2022. *Zoologicheskie chteniya: sbornik nauchnykh statei, posvyashchennyi 125-letiyu doktora biologicheskikh nauk Ivana Nikolaevicha Serzhanina, 22–24 marta 2023 goda, Grodno* [Zoological readings: a collection of scientific articles dedicated to the 125th anniversary of Doctor of Biological Sciences Ivan Nikolaevich Serzhanin, March 22–24, 2023, Grodno]. Grodno, 2023, pp. 113–125 (in Russian).
9. Vellinga W.-P. *Xeno-canto – Bird sounds from around the world*. Available at: <https://www.gbif.org/dataset/b1047888-ae52-4179-9dd5-5448ea342a24> (accessed 01.11.2024).

10. Fonseca E., Favory X., Pons J., Font F., Serra X. FSD50K: An Open Dataset of Human-Labeled Sound Events. *IEEE/ACM Transactions on Audio, Speech, and Language Processing*, 2022, vol. 30, pp. 829–852. <https://doi.org/10.1109/TASLP.2021.3133208>
11. Zianouka Y., Bialiauski D., Kajharodava L., Trafimau A., Chachlou V., Hetsevich J., Zahariev V., Zhaksylyk K. Developing Birds Sound Recognition System Using an Ontological Approach. *Open Semantic Technologies for Intelligent Systems: Research Papers Collection*. Minsk, 2023, iss. 7, pp. 165–170. Available at: https://libeldoc.bsuir.by/bitstream/123456789/51271/1/Zianouka_Developing.pdf (accessed 01.11.2024).
12. Koh C.-Y., Chang J.-Y., Tai C.-L., Huang D.-Y., Hsieh H.-H., Liu Y.-W. Bird Sound Classification Using Convolutional Neural Networks. *Working Notes of CLEF 2019 – Conference and Labs of the Evaluation Forum (CLEF 2019), Lugano, Switzerland, September 9–12, 2019*. Available at: https://ceur-ws.org/Vol-2380/paper_68.pdf (accessed 01.11.2024).
13. Sevilla A., Glotin H. Audio Bird Classification with Inception-v4 extended with Time and Time-Frequency Attention Mechanisms. *Working Notes of CLEF 2017 – Conference and Labs of the Evaluation Forum, Dublin, Ireland, September 11–14, 2017*. Available at: https://ceur-ws.org/Vol-1866/paper_177.pdf (accessed 01.11.2024).
14. Chollet F. *Keras 3 API Documentation*. Available at: <https://keras.io/applications> (accessed 01.11.2024).
15. Tan M., Le Q. V. EfficientNet: Rethinking Model Scaling for Convolutional Neural Networks. *International conference on machine learning*. Long Beach, 2019. Available at: <https://proceedings.mlr.press/v97/tan19a/tan19a.pdf> (accessed 01.11.2024).
16. Kahl S., Denton T., Klink H., Reers H., Cherutich F., Glotin H., Goëau H., Vellinga W.-P., Planqué R., Joly A. Overview of BirdCLEF 2023: Automated Bird Species Identification in Eastern Africa. *Working Notes of the Conference and Labs of the Evaluation Forum (CLEF 2023), Thessaloniki, Greece, September 18th to 21st, 2023*. Available at: <https://ceur-ws.org/Vol-3497/paper-164.pdf> (accessed 01.11.2024).

Information about the authors

Michail E. Nikiforov – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, 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: mnikif1956@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0003-1773-1128>

Lidiya O. Dashevskaya – Junior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lidiyadashevskaya@gmail.com

Kanstantsin V. Homel – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: homelkv@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-2396-1387>

Arseniy A. Valnisty – 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: volnisty.aa@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0002-3612-1467>

Tatyana G. Shagova – Ph. D. (Math.), Researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanya.shagova@gmail.com

Lesya I. Kaigorodova – Researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lesia.piatrouskaya@gmail.com

Denis A. Belyavsky – Researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dzianis.bialiauski@gmail.com

Daria A. Zhalova – Junior Researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: daryazhalova@gmail.com

Yuras. S. Getsevich – Ph. D. (Techn.), Head of the Laboratory. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuras.hetsevich@gmail.com

Информация об авторах

Никифоров Михаил Ефимович – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mnikif1956@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0003-1773-1128>

Дашевская Лидия Олеговна – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lidiyadashevskaya@gmail.com

Гомель Константин Вячеславович – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: homelkv@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-2396-1387>

Волнистый Арсений Андреевич – науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volnisty.aa@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0002-3612-1467>

Шагова Татьяна Григорьевна – канд. мат. наук, науч. сотрудник. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanya.shagova@gmail.com

Кайгородова Леся Иосифовна – науч. сотрудник. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lesia.piatrouskaya@gmail.com

Белявский Денис Александрович – науч. сотрудник. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dzianis.bialiauski@gmail.com

Жалова Дарья Александровна – мл. науч. сотрудник. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: daryazhalova@gmail.com

Гецевич Юрась Станиславович – канд. тех. наук, заведующий лабораторией. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuras.hetsevich@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 599.742.11;575.222.7

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-125-134>

Поступила в редакцию 04.02.2025

Received 04.02.2025

В. О. Молчан, К. В. Гомель, М. Е. Никифоров

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам,
Минск, Республика Беларусь*

ГИБРИДЫ ВОЛКА И СОБАКИ В БЕЛАРУСИ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ

Аннотация. В Беларуси волк относится к категории ненормируемых охотничьих видов, охота на него разрешена круглый год. На протяжении многих лет популяция волка находится под постоянным охотничьим прессом, но при этом сохраняет умеренную численность. Однако нарушение территориальной и половой структуры популяций волков на фоне высокой численности бродячих собак и собак на свободном выгуле может привести к ряду негативных последствий, одним из которых является гибридизация. В работе представлены результаты молекулярно-генетической идентификации волче-собачьих гибридов по данным STR-анализа и первые данные о распространении таких животных в Беларуси. Полученные сведения подтверждают наличие гибридизации волков с бродячими собаками в Беларуси, но при этом не показывают наличия какой-либо географической обусловленности либо концентрации гибридных особей в конкретных регионах страны.

Ключевые слова: Carnivora, Canidae, гибридизация, микросателлиты, STR, *D-loop*, митохондриальная ДНК, *Canis lupus*, *Canis familiaris*, Беларусь

Для цитирования: Молчан, В. О. Гибриды волка и собаки в Беларуси: идентификация и оценка частоты встречаемости / В. О. Молчан, К. В. Гомель, М. Е. Никифоров // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 125–134. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-125-134>

Vladislav O. Molchan, Kanstantsin V. Homel, Michail E. Nikiforov

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

WOLF-DOG HYBRIDS IN BELARUS: IDENTIFICATION AND RATE ESTIMATION

Abstract. In Belarus, the wolf is classified as an unregulated hunting species, and hunting is permitted throughout the year. For many years, the wolf population has been under hunting pressure, yet a moderate proportion persists. However, the disruption of the territorial and sexual structure of the wolf population in the context of a high numbers of stray dogs and free-ranging dogs, can lead to a number of negative consequences, one of which is hybridization. The paper presents the results of molecular genetic identification of wolf-dog hybrids based on STR analysis and the first data on the prevalence of such animals in Belarus. The obtained data confirm the presence of hybridization of wolves with stray dogs in Belarus, while no data are shown on any geographical conditionality or the concentration of hybrid individuals in the regions of the country.

Keywords: Carnivora, Canidae, hybridization, microsatellites, STR, *D-loop*, mitochondrial DNA, *Canis lupus*, *Canis familiaris*, Belarus

For citation: Molchan V. O., Homel K. V., Nikiforov M. E. Wolf-dog hybrids in Belarus: identification and rate estimation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 125–134 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-125-134>

Введение. Волк (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) – экологически очень пластичный вид, который обитает от тундр до полупустынь и горных районов, занимает обширные территории и расселяется на большие расстояния. Ареал обитания включает почти всю Евразию и Северную Америку. До начала XX в. волк был многочисленным и широко распространенным в Европе видом, но из-за исчезновения пригодных местообитаний, роста охотничьего пресса и снижения численности животных, являющихся объектами его добычи, началось сокращение популяции [1]. Наиболее выраженное снижение численности волка наблюдалось в странах Западной Европы, тогда как

в странах Восточной Европы сохранялись его крупные группировки, что впоследствии не могло не отразиться на региональных различиях показателей генетической структурированности и разнообразия европейской популяции.

Одним из наиболее негативных последствий сокращения численности волка является нарушение территориальной и половой структуры его группировок, что на фоне роста числа бродячих собак может приводить к нежелательной межвидовой гибридизации. Предполагается, что риск гибридизации выше в тех районах, где волки либо редки, либо подвержены высокому прессу со стороны человека, либо контактируют с большой популяцией бродячих собак [2]. Среди неблагоприятных эффектов, которые могут проявиться вслед за данным явлением, наибольшую опасность представляет нарушение эволюционных адаптаций локальных диких популяций волка из-за интрогрессивной гибридизации с бродячими собаками, что ставит под угрозу долгосрочное выживание этих популяций. К иным негативным последствиям гибридизации между волком и собакой следует отнести нарушение экологической функции волков в природе, изменение поведения по отношению к человеку и сельскохозяйственным животным, ухудшение трофейных качеств волков [2].

Во второй половине XX в. случаи регистрации гибридов волка и собаки имели место во многих странах Европы и Азии. Однако их идентификация проводилась в основном по внешним признакам. Морфологическая идентификация, на первый взгляд, более простая и дешевая, но у нее есть ряд существенных недостатков: морфологические параметры гибридов могут перекрываться внутривидовой фенотипической вариабельностью, надежность их установления зависит от опыта и профессионализма специалиста, выполняющего их определение, идентификация гибридных особей второго или более отдаленных поколений является особенно трудной [3]. С 2000-х гг. вследствие все более широкого внедрения молекулярно-генетических методов в популяционные исследования диких животных началось активное изучение межвидовой гибридизации с применением ДНК-анализа.

Гибридизация представляет собой важный эволюционный фактор и влияет на процессы видообразования и адаптации видов [4]. Но в то же время она может представлять риск для существования видов, особенно если это гибридизация с участием одомашненных представителей фауны [5, 6]. Изменение климата [7], интродукция или инвазия видов [8], трансформация среды обитания [9] и давление со стороны человека [10] увеличивают вероятность гибридизации и генетической интрогрессии между близкородственными видами, в том числе между дикими и домашними формами [11]. Такого рода гибридизация является опасной из-за последствий интенсивного искусственного отбора среди домашних животных, что может увеличивать вероятность накопления вредных аллелей и нарушать коадаптивные генные комплексы или локальную адаптацию в диких популяциях животных [6, 11].

Оценка уровня антропогенной гибридизации с собакой становится все более актуальной для сохранения и управления локальными популяциями волка, а генетическая идентификация является наиболее надежным способом выявления гибридных особей, что подтверждается проведенными исследованиями на основе микросателлитов в Италии [12] и полногеномного анализа в Фенноскандии [13].

Проблема опосредованной человеком межвидовой гибридизации, которая представляет прямую угрозу чистоте генофонда, коснулась многих популяционных группировок волков по всей Европе. Согласно данным из Болгарии [14], доказательства гибридизации с дикими собаками нашли у 10 из 92 исследованных волков (10,9 %). При этом авторы также указывали на признаки смешения волков и местных популяций золотистого шакала (*C. aureus* Linnaeus, 1758), но последствия такого смешения оказались намного менее выраженными. Исследования в Италии показали, что частота обратных скрещиваний между итальянским волком и собакой составила 87,5 %, что намного выше, чем частота гибридов F1 и F2 – 12,5 % [15]. Полученные данные позволили авторам предположить, что события гибридизации происходили в регионе исследований несколько поколений назад. В Португалии среди 93 иберийских волков выявили одну особь, которая была определена как гибрид волка и собаки, что составляет 1,1 % [16]. На территории восточно-румынских Карпат с использованием панели SNP, оптимизированной для обнаружения

гибридов, выявили низкий уровень смешения волков и домашних собак: из 127 предполагаемых генотипов волков 123 были однозначно отнесены к кластеру волков и 2 – к кластеру собак, еще 2 особи имели низкие показатели индивидуальной принадлежности, что может указывать на их смешанную природу [17]. Исследования с использованием 11 аутосомных микросателлитных маркеров 74 особей волков из Эстонии и Латвии и 21 особи собак из Эстонии подтвердили гибридное происхождение 6 особей из Эстонии и 2 из Латвии, имевших яркие морфологические признаки гибридизации, а также представили первые данные из Европы о гибридизации между самками собак и самцами волков [18]. Полевые наблюдения и генетический анализ, проведенные латвийскими учеными в другом исследовании [19], также свидетельствуют о распространении случаев скрещивания волков и собак, в том числе были выявлены гаплотипы контрольного региона мтДНК, которые могут быть использованы в качестве генетических маркеров материнских линий для обнаружения событий гибридизации. Исследования на основе анализа 11 аутосомных микросателлитов с использованием 101 образца из популяции волков и 32 образцов собак показали относительно низкий уровень гибридизации в центре европейской части России (около 3 %) [20].

В Беларуси чистота популяций диких волков до настоящего времени была выяснена недостаточно. Случаи вероятной гибридизации волков и собак отмечались в разных районах страны в период с 1980-х по 2000-е гг. Предполагается, что гибридизация происходила и ранее, но довольно редко. Однако в исследованиях начала 2000-х гг. не выявлено собачьей родословной ни для одного из изученных образцов волка [21]. Стоит отметить, что начиная с 2010 г. в различных регионах Беларуси участились случаи регистрации особей волков с морфологически яркими признаками гибридизации [22]. Некоторые исследователи объясняют это факт наличием богатой кормовой базы для бродячих собак и низкой плотностью популяции волка [23].

Цель настоящей работы – оценить наличие и распространение волчье-собачьих гибридов в Беларуси с использованием молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы исследования. В исследовании использовали 141 образец биологического материала от волков и 144 образца биоматериала от бродячих собак, которые были собраны

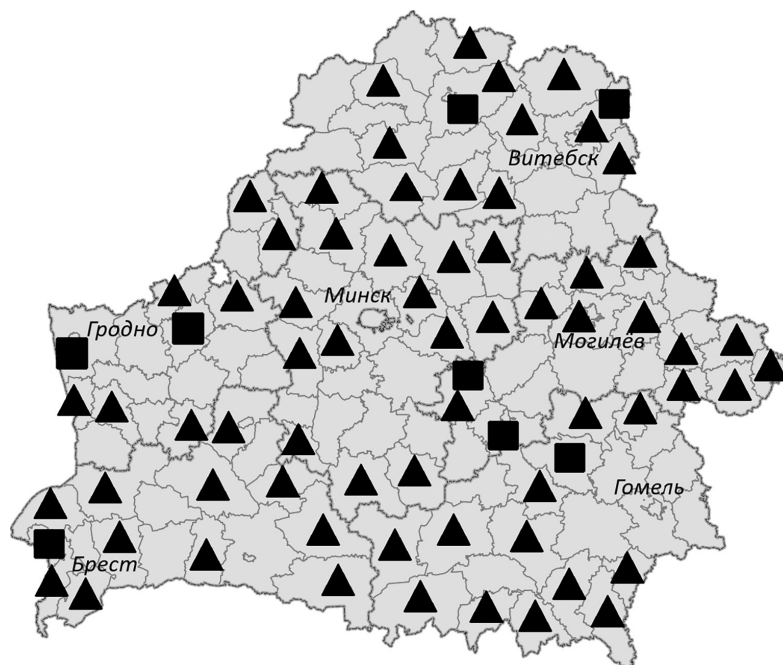


Рис. 1. Карта географического происхождения генетических образцов волка и бродячих собак, использованных в настоящем исследовании: треугольниками обозначены районы сбора образцов от волков; квадратами – районы сбора образцов от бродячих собак

Fig. 1. Map of the geographic origin of the wolf and stray dog genetic samples used in this study: triangles indicate areas where wolf samples were collected; squares indicate areas where stray dog samples were collected

в период с 1980 по 2024 г. от животных, погибших на дорогах или добытых в процессе законной охоты. Кроме того, часть исследованного биоматериала предоставлена специалистами по таксидермии и сотрудниками коммунальных служб. Биоматериал волков получен из 65 районов всех административных областей Беларуси: 17 образцов из Брестской обл., 31 – из Витебской, 39 – из Гомельской, 13 – из Гродненской, 23 – из Минской и 18 – из Могилёвской обл. Биоматериал бродячих собак собран из 8 районов 5 административных областей Беларуси (кроме Минской): 29 образцов – из Брестской обл., 31 – из Витебской, 14 – из Гомельской, 16 – из Гродненской и 54 – из Могилёвской обл. Все образцы сохраняются в низкотемпературных условиях. Географическое распределение образцов в соответствии с административными районами представлено на рис. 1.

Для экстракции ДНК использовался набор Animal and Fungi DNA Preparation – Solution Kit (Jena Bioscience, Германия). Все манипуляции проводились согласно протоколу производителя. Качественные и количественные показатели выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer P 330 UV/Vis (IMPLEN, Германия). Разработанная микросателлитная панель состоит из 20 локусов, которые были распределены по 4 мультиплексам согласно ожидаемым диапазонам размеров фрагментов и флуоресцентным меткам (см. таблицу).

Микросателлитные мультиплексы для исследования генетического разнообразия волка

Microsatellite multiplexes for the study of wolf genetic diversity

Мультиплекс, смесь	Наименование локуса	Диапазон размеров, п. н.	Длина мотива	Последовательность праймеров (5'-3'), прямой/обратный
MP1	FH2848	224–244	Di	CAAAACCAACCCATTCACCTC/GTCACAAGGACTTTTCTCCTG
	C09.474	111–133	Di	TTAAGCCTTATTTTGTGTTGGG/TCCAGGAAGTGTCTGCAGG
	C20.446	180–200	Di	CTGGGTATTTACCCAAAGAAAA/TTTCATTCCTTTTAATGGCTGA
	REN247 M23	263–283	Di	TGGTAACACCAAGGCTTTCC/TGTCTTTTCCATGGTGGTGA
	Dbar1	183–274	Di	CATGATCCTGGTCCCACGTA/TGTTTCAATGTGCTATGCACTG
MP2	C20.253	95–125	Di	AATGGCAGGATTTTCTTTTGC/ATCTTTGGACGAATGGATAAGG
	C27.442	158–172	Di	CCAAGAACAGCCTAAGCTGG/ACACATACACGCCCAATTCA
	C13.758	220–244	Di	AAGCATCCAGAATCCCTGG/GTTGATTGGGAGATAATCCACA
	INU30	136–156	Di	GGCTCCATGCTCAAGTCTGT/CATTGAAAGGGAATGCTGGT
	CPH9	133–163	Di	CAGAGACTGCCACTTTAAACACAC/AAAGTTCTCAAATACCATTGTGTACA
MP3	C04.140	132–160	Di	CAGAGGTGGCATAGGGTGAT/TCGAAGCCCAGAGAATGACT
	ANTh171	216–240	Di	AGGTGCAGAGCACTCACTCA/CCCATCCACAGTTTCACTTTT
	ANTk253	280–300	Di	ACATTTGTGGGCATTGGGGCTG/TGCACATGGAGGACAAGCACGC
	CPH2	87–113	Di	TTCTGTTGTTATCGGCACCA/TTCTTGAGAACAGTGTCTCTCG
	ANT111	72–92	Di	CCATACCCAGGATAGTTGAT/CCATCCTGAGGCTAGCTGTG
MP4	ANT132	170–182	Di	CGTCCCTATGTTTAACTACA/TTGTTGCAAATGGCAAGATT
	INRA21	87–103	Di	ATGTAGTTGAGATTTCTCCTACGG/TAATGGCTGATTTATTTGGTGG
	VWF	138–192	Hexa	CTCCCCTCTCTACCTCCACCTCTAA/CAGAGGTCAGCAAGGTAATTTGTG
	C14.866	221–257	Di	TGTCATAATAGTTGGAATGAC/TTAGAGCTTACTCATGATATCTG
Вне смеси	PEZ5	95–119	Tetra	GCTATCTTGTTTCCCACAGC/TCACTGTATACAACATTGTC

Концентрация всех использованных праймеров была приведена к 5 пмоль/мкл. Амплификацию каждой группы микросателлитных локусов проводили в составе отдельных реакционных смесей финальным объемом 25 мкл. Мультиплексы были амплифицированы методом Touchdown PCR при следующих условиях [24]: первичная денатурация – 94 °C 8 мин; 16 циклов с условием снижения температуры отжига на 0,5 °C за цикл – 94 °C 45 мин, 60 °C 1 мин, 65 °C 1 мин; далее 16 циклов – 94 °C 45 с, 52 °C 1 мин, 65 °C 1 мин и 20 мин элонгации при 65 °C. Отдельный ПЦР-протокол использовался для локуса PEZ5: 94 °C 4 мин; 29 циклов – 94 °C 30 с, 56 °C 45 с, 72 °C 1 мин. Определение размеров фрагментов проводили на основании массы

ампликонов посредством их автоматизированного разделения в линейном полиакриламиде на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, США).

Стандартизация размеров аллелей выполнена с использованием программы TANDEM v.1.09 [25]. Данные фрагментного анализа оценивали на предмет ошибок генотипирования (нулевые аллели, статтеры, выпадение больших аллелей) с помощью программного обеспечения MicroChecker v.2.2.3 [26]. Дополнительная оценка частоты нулевых аллелей проведена в программе Genepop v.4.7.5 [27] с применением метода максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation of null allele frequency). Анализ совпадения генотипов и оценку отклонения частоты генотипов для исследуемых микросателлитных локусов от равновесия Харди – Вайнберга (HWE) проводили с помощью программы GenAlEx v.6.501 [28].

Для выявления гибридов использовали две программы: NewHybrids совместно с пакетом R [29] и Structure v.2.4.3 [30]. Отнесение особи к гибридной производилось на основе обобщающего анализа полученных данных из двух программ.

Результаты и их обсуждение. В результате оценки 20 микросателлитных локусов было принято решение исключить из анализа локус Dbar1 по причине отсутствия данных аллельных размеров для 35 % образцов из выборки бродячих собак и локус AHT132 из-за низких значений для показателей популяционной подразделенности Dest и Gst.

Байесовский анализ индивидуальной принадлежности выполнялся в программе Structure v.2.4.3 [30]. Он включал 10 симуляций для двух генетических популяций ($K = 2$) с 300 000 итераций Марковской цепи Монте-Карло (MCMC) после периода инициации в 100 000 итераций. Использовалась модель смешанного происхождения (admixture model), коррелирующие частоты аллелей, не учитывались географические данные происхождения индивидов и референсные данные. С помощью веб-приложения CLUMPAK [31] мы усреднили результаты программы Structure и получили показатели индивидуальной принадлежности (q_i) к генетическим кластерам для каждого отдельного образца волка и собаки, а также обобщенное графическое представление результатов из программы Structure (рис. 2).

Байесовский анализ 141 особи, изначально отнесенной к волку, и 144 особей, определенных как собаки, показал, что наиболее вероятное число генетических кластеров $K = 2$ (рис. 2). Далее на основании полученных данных прогонов (run) определили пороговые значения участия генетических кластеров (q_i) для анализируемых особей. Изначально за пороговое значение для отнесения особи к «чистой» было взято $q_i \geq 0,99$. Значения $q_i < 0,9$ и, соответственно, $q_i > 0,1$ однозначно использовались для отнесения особи к гибридной по данным анализа в программе Structure.

Для особей с пороговыми значениями $q_i \geq 0,90$ и $q_i < 0,99$ решение об отнесении к гибриду волка и собаки делалось с учетом данных из программы Newhybrids: особь относилась к гибридной при суммарной вероятности гибридных генотипических классов равной или больше 0,70. Данное значение выбрано по результатам моделирования и направлено на уменьшение доли ошибки первого рода (на основании моделирования, при данном значении апостериорной вероятности средняя доля ошибки первого рода составляет 3,75 %) – неверной классификации «чистой» особи как гибридной.

В связи с тем, что точное отнесение особи к конкретному гибриднему классу в программе Structure практически невозможно, эту задачу решали в программе Newhybrids, в которой

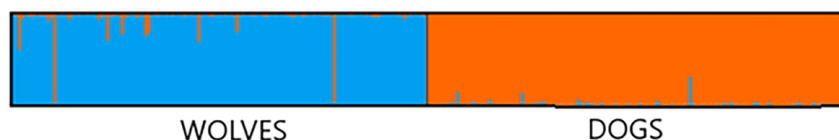


Рис. 2. Принадлежность исследуемых особей к генетическим кластерам волков (wolves, синий цвет) и собак (dogs, оранжевый цвет) по данным байесовского анализа в программе Structure при $K = 2$ на основании генотипических данных по 18 микросателлитным локусам

Fig. 2. Belonging of individuals to the genetic clusters of wolves (blue) and dogs (orange) according to Bayesian analysis in the program Structure with $K = 2$ based on genotypic data for 18 microsatellite loci

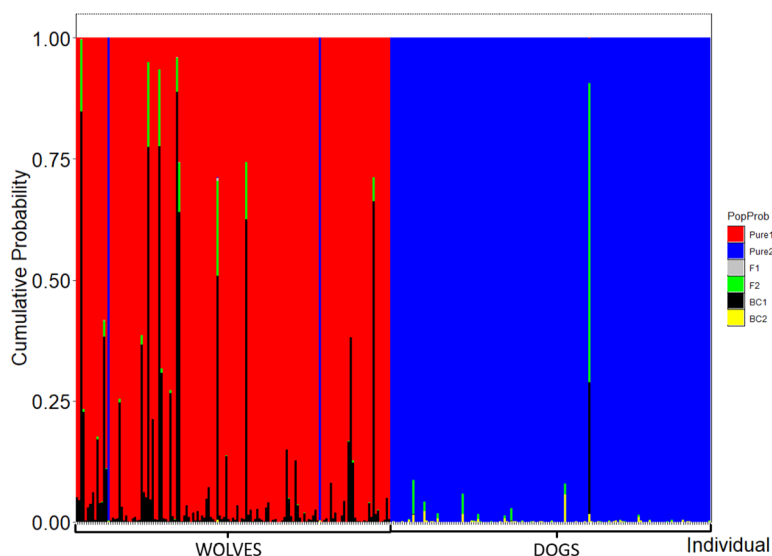


Рис. 3. Апостериорная вероятность отнесения особей волков и бродячих собак из Беларуси к одному из шести генотипических классов по данным анализа в программе Newhybrids: референсные данные «чистых» особей волков (wolves) и бродячих собак (dogs)

Fig. 3. Posterior probability of classifying individuals of wolves and stray dogs from Belarus into 1 of 6 genotypic classes according to the analysis in the program Newhybrids: reference data of “pure” wolves and stray dogs

пороги апостериорной вероятности принадлежности к «чистым» волкам составили 0,61–1, а к «чистым» собакам – 0,91–1. Итоговый график апостериорной вероятности отнесения особей волков и бродячих собак из Беларуси к одному из 6 генотипических классов, по данным анализа исследуемых образцов волков и собак в программе Newhybrids, представлен на рис. 3. Полученные результаты совпали с результатами исследования в программе Structure с учетом определенных выше пороговых значений.

По результатам обобщающего анализа было установлено 7 особей гибридного происхождения в выборке волков (4,96 %) и 1 особь – в выборке бродячих собак (0,69 %). Данные, полученные в программе Newhybrids, также подтверждаются значениями индивидуальных долей принадлежности (q_i) исследуемых особей к генетическим кластерам волков и собак в программе Structure. Выявленные гибридные особи волков были добыты в период с 2016 по 2024 г. в 6 районах 4 административных областей Беларуси. Ими являлись: взрослый самец волка черного окраса, который был добыт в апреле 2024 г. в Витебском р-не Витебской обл. (CL185); 2 щенка волка, переданные в 2016 г. из Ивьевского р-на (CL53; CL55); взрослая самка волка, добытая в 2021 г. на территории Слонимского р-на Гродненской обл. (CL83); 2 взрослых самца волка, добытые в 2022 г. на территориях Клецкого (CL109) и Солигорского (CL110) р-нов Минской обл., и волк, добытый в 2024 г. на территории Чаусского р-на Могилёвской обл. (CL151).

При этом в популяции волка все гибриды оказались результатом обратного скрещивания гибридных особей F1 с «чистыми» волками. Доля гибридов с волком среди бродячих собак составила 0,69 % – была зарегистрирована лишь 1 гибридная особь второго поколения. Таким образом, среди всех выявленных гибридов доля особей, произошедших от обратного скрещивания между волками и гибридными особями первого поколения, составила 87,5 %, второго поколения – 12,5 %, тогда как гибриды F1 и беккроссы между собаками и гибридами F1 не выявлены. Данная особенность делает наш результат схожим с ситуацией в итальянской популяции волка [15] и позволяет предположить, что события гибридизации в Беларуси происходили несколько поколений назад.

Следует отметить, что выявленные гибридные особи из выборки волков в результате проведенного ранее анализа контрольного региона (D-loop) мтДНК были идентифицированы как волки [32]. Также в коллекции биоматериала бродячих собак, использованной в работе, была выявлена 1 гибридная особь второго поколения, которая являлась взрослым самцом, добытым в 2022 г. на территории Бобруйского р-на Могилёвской обл. (CF94) (рис. 4).

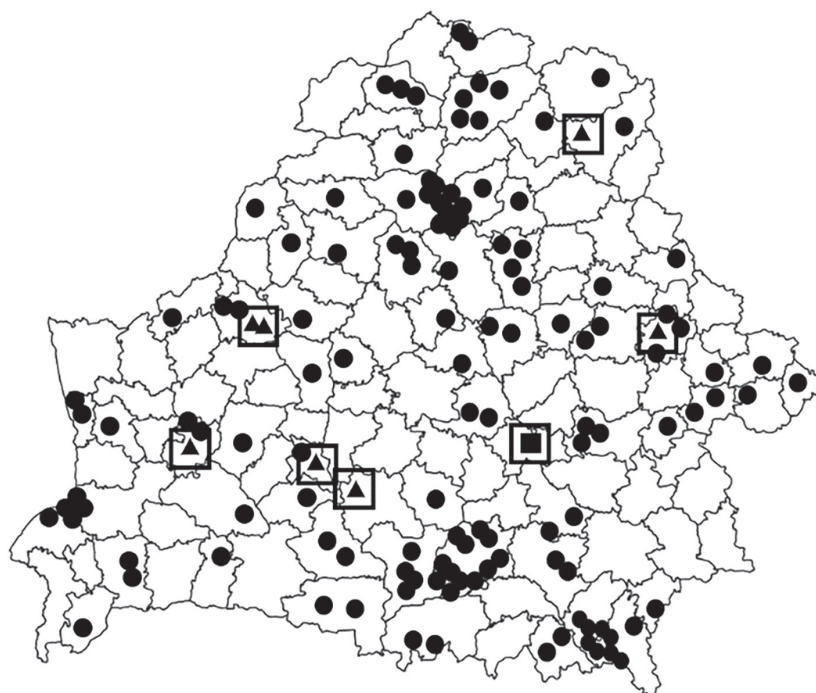


Рис. 4. Карта распределения исследованных образцов волков и установленных волче-собачьих гибридов: кругами обозначены особи волка; треугольниками – гибридные особи из выборки волков; квадратом – гибридная особь из выборки бродячих собак

Fig. 4. Allocations map of the studied wolf samples and identified wolf-dog hybrids: circles represent wolf individuals; triangles represent hybrid individuals from a sample of wolves; squares represent a hybrid individual from a sample of stray dogs

Считаем необходимым также отметить, что в исследованной выборке «чистых» волков было выявлено 2 образца от особей собак (CL87 и TH170), для которых, видимо, имело место ошибочное видовое определение передавшей данный образец стороной, что свидетельствует о наличии трудностей (а иногда и невозможности) даже для охотников в точном определении волкоподобных собак, а тем более гибридов, по морфолого-фенотипическим признакам.

Заключение. Полученные данные предоставляют убедительные доказательства наличия гибридизации волка с бродячими собаками в Беларуси и показывают принадлежность выявленных гибридов к гибридным поколениям. Среди исследованных 141 особи волка и 144 особей бродячих собак на основании анализа по 20 микросателлитным локусам выявлены 7 и 1 гибридная особь соответственно. Характер территориального распределения выявленных гибридных особей не свидетельствует о какой-либо географической обусловленности либо концентрации гибридных особей в конкретных регионах страны. Относительно невысокий уровень гибридизации между популяциями волка и бродячих собак в Беларуси в целом согласуется с результатами исследований в различных регионах Европы в период с 2014 по 2023 г. [14–21].

Несмотря на гибридизацию, генетическая целостность популяции волков в Беларуси в настоящее время не находится под серьезной угрозой. Большая доля лесных массивов на территории страны, обилие пищевых ресурсов для волка и связь с крупными метапопуляциями вида в России и в странах Северной Европы положительно сказываются на поддержании численности популяции волка в Беларуси. В то же время усиление таких факторов, как постоянный охотничий пресс, нарушение половой и социальной структуры популяционных группировок, свободный выгул и бродяжничество собак в деревенской местности, могут привести к возрастанию частоты гибридизации. Поэтому актуальным остается контроль (мониторинг) состояния популяции волка, который заключается в том числе в периодическом анализе генетической структуры и оценке уровня гибридизации в популяции вида в стране.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) in Serbia / M. Đan, D. Šnjegota, N. Veličković [et al.] // Russian Journal of Genetics. – 2016. – Vol. 52, N 8. – P. 821–827. <https://doi.org/10.1134/s1022795416080044>
2. Vilà, C. Hybridization between Wolves and Dogs / C. Vilà, R. K. Wayne // Conservation Biology. – 1999. – Vol. 13, N 1. – P. 195–198. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.97425.x>
3. Dziech, A. Identification of Wolf-Dog Hybrids in Europe – An Overview of Genetic Studies / A. Dziech // Frontiers in Ecology and Evolution. – 2021. – Vol. 9 – Art. 760160. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.760160>
4. Kays, R. Rapid adaptive evolution of northeastern coyotes via hybridization with wolves / R. Kays, A. Curtis, J. J. Kirchman // Biology Letters. – 2010. – Vol. 6, N 1. – P. 89–93. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0575>
5. Rhymer, J. M. Extinction by hybridization and introgression / J. M. Rhymer, D. Simberloff // Annual Review of Ecology and Systematics. – 1996. – Vol. 27, N 1. – P. 83–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
6. The problems with hybrids: setting conservation guidelines / F. W. Allendorf, R. F. Leary, P. Spruell, J. K. Wenburg // Trends in Ecology & Evolution. – 2001. – Vol. 16, N 11. – P. 613–622. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02290-x](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02290-x)
7. Climate change induced hybridization in flying squirrels / C. J. Garroway, J. Bowman, T. J. Cascaden [et al.] // Global Change Biology. – 2010. – Vol. 16, N 1. – P. 113–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01948.x>
8. Hybridization between escaped domestic and wild American mink (*Neovison vison*) / A. G. Kidd, J. Bowman, D. Lesbarrères, A. I. Schulte-Hostedde // Molecular Ecology. – 2009. – Vol. 18, N 6. – P. 1175–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2009.04100.x>
9. Hybridization among Caribbean damselfish species correlates with habitat degradation / S. P. Mullen, K. Little, M. Draud [et al.] // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 2012. – Vol. 416–417 – P. 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.01.002>
10. Intense harvesting of eastern wolves facilitated hybridization with coyotes: Culling Facilitates Hybridization / Y. L. Rutledge, B. N. White, J. R. Row, B. R. Patterson // Ecology and Evolution. – 2011. – Vol. 2, N 1. – P. 19–33. <https://doi.org/10.1002/ece3.61>
11. Randi, E. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives / E. Randi // Molecular Ecology. – 2007. – Vol. 17, N 1. – P. 285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03417.x>
12. Differentiation of the Italian wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis / G. Dolf, J. Schläpfer, C. Gaillard [et al.] // Genetics Selection Evolution. – 2000. – Vol. 32. – Art. 533. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-32-5-533>
13. Whole-genome analyses provide no evidence for dog introgression in Fennoscandian wolf populations / L. Smeds, J. Aspi, J. Berglund [et al.] // Evolutionary Applications. – 2020. – Vol. 14, N 3. – P. 721–734. <https://doi.org/10.1111/eva.13151>
14. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves / A. E. Moura, E. Tsingarska, M. J. Dąbrowski [et al.] // Conservation Genetics. – 2014. – Vol. 15, N 2. – P. 405–417. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0547-y>
15. Multilocus Detection of Wolf x Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection / E. Randi, P. Hulva, E. Fabbri [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 1. – P. e86409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086409>
16. Hybridization between wolf and domestic dog: First evidence from an endangered population in central Portugal / R. T. Torres, E. Ferreira, R. G. Rocha, C. Fonseca // Mammalian Biology. – 2017. – Vol. 86. – P. 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.05.001>
17. Assessment of genetic diversity, population structure and wolf-dog hybridisation in the Eastern Romanian Carpathian wolf population / A. Jarausch, A. von Thaden, T. Sin [et al.] // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13, N 1. – Art. 22574. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48741-x>
18. Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves / M. Hindrikson, P. Männil, J. Ozolins [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, N 10. – P. e46465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046465>
19. Andersone, Ž. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers / Ž. Andersone, V. Lucchini, J. Ozoliņš // Mammalian Biology. – 2002. – Vol. 67, N 2. – P. 79–90. <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00012>
20. Korabiev, M. P. Genetic diversity and population structure of the grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) and evidence of wolf x dog hybridization in the centre of European Russia / M. P. Korabiev, N. P. Korabiev, P. N. Korabiev // Mammalian Biology. – 2020. – Vol. 101, N 1. – P. 91–104. <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00074-2>
21. North-South Differentiation and a Region of High Diversity in European Wolves (*Canis lupus*) / A. V. Stronen, B. Jędrzejewska, C. Pertoldi [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, N 10. – P. e76454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076454>
22. Молчан, В. О. Регистрация возможных гибридов между волком (*Canis lupus lupus*) и собакой (*Canis lupus familiaris*) на территории Беларуси. / О. В. Молчан // Молодежь в науке – 2021: тез. докл. XVIII Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 27–30 сент. 2021 г.: в 2 ч. / НАН Беларуси, Совет молодых ученых; редкол.: В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2021. – Ч. 1. – С. 256–258.
23. Sidorovich, V. Reproduction biology in grey wolves *Canis lupus* in Belarus: Common beliefs versus reality / V. Sidorovich, I. Rotenko. – 2nd ed. – Minsk: Chatyry chverci, 2019. – 224 p.
24. Korbie, D. J. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification / D. J. Korbie, J. S. Matlick // Nature Protocols. – 2008. – Vol. 3, N 9. – P. 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
25. Matschiner, M. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows / M. Matschiner, W. Salzburger // Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25, N 15. – P. 1982–1983. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp303>
26. MICRO - CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data / C. van Oosterhout, W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, P. Shipley // Molecular Ecology Notes. – 2004. – Vol. 4, N 3. – P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
27. Rousset, F. genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux / F. Rousset // Molecular Ecology Resources. – 2008. – Vol. 8, N 1. – P. 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
28. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P. E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6, N 1. – P. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

29. *parallelnewhybrid*: an R package for the parallelization of hybrid detection using NEWHYBRIDS / B. F. Wringe, R. R. E. Stanley, N. W. Jeffery [et al.] // *Molecular Ecology Resources*. – 2017. – Vol. 17, N 1 (Spec. Iss.). – P. 91–95. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12597>
30. Pritchard, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155, N 2. – P. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
31. Clumpak – Cluster Markov Packager Across K // Plant Evolution, bioinformatics, & comparative genomics. URL: <https://clumpak.tau.ac.il> (date of access: 01.12.2024).
32. Genetic diversity of mtDNA in the grey wolf population of Belarus threatened by wolf–dog admixture / V. Molchan, K. Homel, A. Valnisty [et al.] // *Theriologia Ukrainica*. – 2023. – Vol. 25. – P. 87–99. <https://doi.org/10.53452/tu2508>

References

1. Đan M., Šnjegota D., Veličković N., Stefanović M., Obreht Vidaković D., Ćirović D. Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) in Serbia. *Russian Journal of Genetics*, 2016, vol. 52, no. 8, pp. 821–827. <https://doi.org/10.1134/s1022795416080044>
2. Vilà C., Wayne R. K. Hybridization between Wolves and Dogs. *Conservation Biology*, 1999, vol. 13, no. 1, pp. 195–198. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.97425.x>
3. Dziech A. Identification of Wolf-Dog Hybrids in Europe – An Overview of Genetic Studies. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2021, vol. 9, art. 760160. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.760160>
4. Kays R., Curtis A., Kirchman J. J. Rapid adaptive evolution of northeastern coyotes via hybridization with wolves. *Biology Letters*, 2010, vol. 6, no. 1, pp. 89–93. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0575>
5. Rhymer J. M., Simberloff D. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1996, vol. 27, no. 1, pp. 83–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
6. Allendorf F. W., Leary R. F., Spruell P., Wenburg J. K. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, vol. 16, no. 11, pp. 613–622. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02290-x](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02290-x)
7. Garraway C. J., Bowman J., Cascaden T. J., Holloway G. L., Mahan C. G., Malcolm J. R., Steele M. A., Turner G., Wilson P. J. Climate change induced hybridization in flying squirrels. *Global Change Biology*, 2010, vol. 16, no. 1, pp. 113–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01948.x>
8. Kidd A. G., Bowman J., Lesbarrères D., Schulte-Hostedde A. I. Hybridization between escaped domestic and wild American mink (*Neovison vison*). *Molecular Ecology*, 2009, vol. 18, no. 6, pp. 1175–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2009.04100.x>
9. Mullen S. P., Little K., Draud M., Brozek J., Itzkowitz M. Hybridization among Caribbean damselfish species correlates with habitat degradation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2012, vol. 416–417, pp. 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.01.002>
10. Rutledge L. Y., White B. N., Row J. R., Patterson B. R. Intense harvesting of eastern wolves facilitated hybridization with coyotes: Culling Facilitates Hybridization. *Ecology and Evolution*, 2011, vol. 2, no. 1, pp. 19–33. <https://doi.org/10.1002/ece3.61>
11. Randi E. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology*, 2007, vol. 17, no. 1, pp. 285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03417.x>
12. Dolf G., Schläpfer J., Gaillard C., Randi E., Lucchini V., Breitenmoser U., Stahlberger-Saitbekova N. Differentiation of the Italian wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis. *Genetics Selection Evolution*, vol. 32, art. 533. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-32-5-533>
13. Smeds L., Aspi J., Berglund J., Kojola I., Tirronen K., Ellegren H. Whole-genome analyses provide no evidence for dog introgression in Fennoscandian wolf populations. *Evolutionary Applications*, 2020, vol. 14, no. 3, pp. 721–734. <https://doi.org/10.1111/eva.13151>
14. Moura A. E., Tsingarska E., Dąbrowski M. J., Czarnomska S. D., Jędrzejewska B., Pilot M. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*, 2014, vol. 15, no. 2, pp. 405–417. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0547-y>
15. Randi E., Hulva P., Fabbri E., Galaverni M., Galov A., Kusak J., Bigi D., Černá Bolfíková B., Smetanová M., Caniglia R. Multilocus Detection of Wolf x Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. *PloS ONE*, 2014, vol. 9, no. 1, p. e86409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086409>
16. Torres T. R., Ferreira E., Rocha R. G., Fonseca C. Hybridization between wolf and domestic dog: First evidence from an endangered population in central Portugal. *Mammalian Biology*, 2017, vol. 86, pp. 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.05.001>
17. Jarausch A., von Thaden A., Sin T., Corradini A., Pop M. I., Chiriac S., Gazzola A., Nowak C. Assessment of genetic diversity, population structure and wolf-dog hybridization in the Eastern Romanian Carpathian wolf population. *Scientific Reports*, 2023, vol. 13, no. 1, art. 22574. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48741-x>
18. Hindrikson M., Männil P., Ozolins J., Krzywinski A., Saarma U. Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. *PloS ONE*, 2012, vol. 7, no. 10, p. e46465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046465>
19. Andersone Ž., Lucchini V., Ozoliņš J. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology*, 2002, vol. 67, no. 2, pp. 79–90. <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00012>
20. Korablev M. P., Korablev N. P., Korablev P. N. Genetic diversity and population structure of the grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) and evidence of wolf x dog hybridization in the centre of European Russia. *Mammalian Biology*, 2020, vol. 101, no. 1, pp. 91–104. <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00074-2>
21. Stronen A. V., Jędrzejewska B., Pertoldi C., Demontis D., Randi E., Niedziałkowska M., Pilot M., Sidorovich V. E., Dykyy I., Kusak J., Tsingarska E., Kojola I., Karamanlidis A. A., Ornicans A., Lobkov V. A., Dumenko V., Czarnomska S. D. North-South Differentiation and a Region of High Diversity in European Wolves (*Canis lupus*). *PloS ONE*, 2013, vol. 8, no. 10, p. e76454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076454>

22. Molchan V. O. Registration of possible hybrids between the wolf (*Canis lupus lupus*) and the dog (*Canis lupus familiaris*) in Belarus. *Molodezh' v nauke – 2021: tezisy dokladov XVIII Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchenykh* (Minsk, 27–30 sentyabrya 2021 goda) [Youth in Science – 2021: Abstracts of the XVIII International Scientific Conference of Young Scientists (Minsk, September 27–30, 2021)]. Minsk, 2021, vol. 1, pp. 256–258 (in Russian).
23. Sidorovich V., Rotenko I. *Reproduction biology in grey wolves Canis lupus in Belarus: Common beliefs versus reality. 2nd ed.* Minsk, Chatry chverci, 2019. 224 p. (in Russian).
24. Korbie D. J., Mattick J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 2008, vol. 3, no. 9, pp. 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
25. Matschiner M., Salzburger W. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 15, pp. 1982–1983. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp303>
26. Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. MICRO - CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 2004, vol. 4, no. 3, pp. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
27. Rousset F. genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 2008, vol. 8, no. 1, pp. 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
28. Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, no. 1, pp. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
29. Wringe B. F., Stanley R. R. E., Jeffery N. W., Anderson E. C., Bradbury I. R. *parallelnewhybrid*: an R package for the parallelization of hybrid detection using newhybrids. *Molecular Ecology Resources*, 2017, vol. 17, no. 1 (spec. iss.), pp. 91–95. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12597>
30. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 2, pp. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
31. Clumpak – Cluster Markov Packager Across K. *Plant Evolution, bioinformatics, & comparative genomics*. Available at: <https://clumpak.tau.ac.il> (accessed 01.12.2024).
32. Molchan V., Homel K., Valnisty A., Nikiforov M., Kheidorova E. Genetic diversity of mtDNA in the grey wolf population of Belarus threatened by wolf–dog admixture. *Theriologia Ukrainica*, 2023, vol. 25, pp. 87–99. <https://doi.org/10.53452/tu2508>

Информация об авторах

Молчан Владислав Олегович – мл. науч. сотрудник, аспирант. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: molchan_vladislav@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1070-1938>

Гомель Константин Вячеславович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: homelkv@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-2396-1387>

Никифоров Михаил Ефимович – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikif@tut.by. <https://orcid.org/0000-0003-1773-1128>

Information about the authors

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

Kanstantsin V. Homel – 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: homelkv@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-2396-1387>

Michail E. Nikiforov – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, 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. <https://orcid.org/0000-0003-1773-1128>

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.25

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-135-145>

Поступила в редакцию 26.11.2024

Received 26.11.2024

А. А. Муратова, А. Э. Охремчук, Л. Н. Валентович

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ГЕНОМА БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS AMYGDALI* PV. *LACHRYMANS* 8 –
ВОЗБУДИТЕЛЯ УГЛОВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ ОГУРЦА

Аннотация. В статье отражены результаты секвенирования, молекулярно-генетического и сравнительного анализа генома фитопатогенной бактерии *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8. Собранный геномная последовательность депонирована в базу данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (НЦБИ) США (номера для доступа: CP075686–CP075690). В результате расчета средней нуклеотидной идентичности определено, что последовательность генома штамма 8 имеет сходство 99,87 % и 99,79 % с последовательностями геномов бактерий *P. amygdali* pv. *lachrymans* 814/98 и *P. amygdali* pv. *lachrymans* M301315 соответственно. Установлено, что геном штамма 8 представлен кольцевой хромосомой размером 6 054 652 п. н. с содержанием ГЦ-пар 58,11 % и четырьмя кольцевыми плазмидами: pPAL8-01 (77 748 п. н., содержание ГЦ-пар 56 %), pPAL8-02 (72 398 п. н., содержание ГЦ-пар 55 %), pPAL8-03 (49 000 п. н., содержание ГЦ-пар 54 %) и pPAL8-04 (9600 п. н., содержание ГЦ-пар 55 %). Высказано предположение, что путь распространения изучаемого фитопатогена осуществлялся либо параллельно из Нидерландов в США и Беларусь, либо сначала из Нидерландов на территорию США, а затем в Беларусь. Осуществлено сравнение нуклеотидной последовательности штамма 8 с нуклеотидными последовательностями бактерий *P. amygdali* pv. *lachrymans* M301315, NM002 и YM7902, в результате чего выявлены значительные генетические перестройки и определена локализация уникальной области размером 19 773 п. н.

Ключевые слова: псевдомонады, фитопатоген, полногеномное секвенирование, анализ генома, генетические перестройки

Для цитирования: Муратова, А. А. Особенности структурно-функциональной организации генома бактерии *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8 – возбудителя угловой пятнистости листьев огурца / А. А. Муратова, А. Э. Охремчук, Л. Н. Валентович // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 135–145. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-135-145>

Anna A. Muratova, Artur E. Akhremchuk, Leonid N. Valentovich

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

SPECIAL ASPECTS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE GENOME
OF *PSEUDOMONAS AMYGDALI* PV. *LACHRYMANS* 8: A CAUSATIVE AGENT
OF ANGULAR LEAF SPOT OF CUCUMBER

Abstract. This article presents the results of the sequencing, molecular genetic and comparative analysis of the genome of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8. The assembled genome sequence has been deposited in the GenBank database of the US National Center for Biotechnology Information (accession numbers: CP075686–CP075690). The calculation of the average nucleotide identity revealed that the genome sequence of strain 8 exhibits 99.87 and 99.79 % similarity with the genome sequences of bacteria *P. amygdali* pv. *lachrymans* 814/98 and *P. amygdali* pv. *lachrymans* M301315, respectively. The genome of strain 8 was found to be represented by a circular chromosome of 6,054,652 bp with a GC-pair content of 58.11 % and four circular plasmids: pPAL8-01 (77,748 bp, GC-pair content of 56 %), pPAL8-02 (72,398 bp, GC-pair content of 55 %), pPAL8-03 (49,000 bp, GC-pair content of 54 %) and pPAL8-04 (9,600 bp, GC-pair content of 55 %). It is suggested that the route of dissemination of the studied phytopathogen was either parallel from the Netherlands to the USA and Belarus, or first from the Netherlands to the USA and then to Belarus. A comparison of the nucleotide sequence of the strain 8 with the nucleotide sequences of the bacteria *P. amygdali* pv. *lachrymans* M301315, NM002 and YM7902 revealed significant genetic rearrangements and determined the localization of a unique region of 19,773 bp.

Keywords: pseudomonads, phytopathogen, whole genome sequencing, genome analysis, genetic rearrangements

For citation: Muratova A. A., Akhremchuk A. E., Valentovich L. N. Special aspects of structural and functional organization of the genome of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8: a causative agent of angular leaf spot of cucumber. *Vesti Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 135–145 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-135-145>

Введение. На данный момент в полифилетический род *Pseudomonas* [1] объединено большое количество видов (~340 согласно списку названий прокариот с указанием места в номенклатуре (<https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>)), представители которых обладают разнообразным метаболическим потенциалом, что позволяет им осваивать практически все известные экологические ниши [2]. Например, среди представителей данного рода есть как патогены животных, растений и грибов, так и штаммы, стимулирующие рост и развитие сельскохозяйственных растений [3–6].

Фитопатогенные псевдомонады поражают травянистые и древесные виды растений и наносят значительный ущерб сельскому хозяйству по всему миру [7]. В настоящее время фитопатогенные штаммы обнаружены среди представителей 25 видов рода *Pseudomonas*, большинство из которых относится к *P. syringae* [8]. Представители данного вида распространены по всему миру и сгруппированы в более чем 50 патоваров в зависимости от способности поражать определенные группы высших растений. Вспышки заболеваний, вызванные бактериями *P. syringae*, периодически угрожают мировому производству сельскохозяйственной продукции [9]. В 2020 г. группа исследователей провела филогеномный анализ 494 полных геномов бактерий рода *Pseudomonas*, в результате чего было показано, что бактерии *P. syringae* не образуют монофилетический вид в строгом смысле слова, а представляют собой более широкую эволюционную группу (*sensu lato*), в которую на данный момент входят и другие виды, такие как *P. avellanae*, *P. savastanoi*, *P. cerasi* и *P. amygdali* [10].

Бактерии вида *P. amygdali* – гембиотрофные фитопатогены, которые, как было указано выше, входят в комплекс видов *P. syringae*. Вид *P. amygdali* описан в 1975 г. и назван в связи со способностью данных бактерий вызывать болезни миндальных деревьев (*Prunus amygdalus*) [11]. В 1999 г. Л. Гардан с коллегами на основании методов ДНК-ДНК-гибридизации и риботипирования причислили патовары *lachrymans*, *tabaci*, *mori* и *sesami*, первоначально отнесенные к *P. syringae*, к виду *P. amygdali* [12]. Патовары *tabaci*, *mori* и *sesami* вызывают заболевания табака, шелковицы и кунжута соответственно [13–15]. Бактерии патовара *P. amygdali* pv. *lachrymans* (*Pal*) вызывают угловатую пятнистость листьев огурца. Данное заболевание распространено почти во всех регионах мира и вызывает серьезные потери урожая не только огурцов (*Cucumis sativus*), но и других тыквенных культур, включая арбуз (*Citrullus lanatus*), дыню (*C. melo*) и тыкву (*Cucurbita maxima*) [16]. Симптомы поражения проявляются в виде мокнущих пятен неправильной угловатой формы на листьях растений и мелких, деформированных плодов [17]. В период с 2014 по 2016 г. вспышки угловатой пятнистости листьев огурца во многих провинциях Китая привели к потере от 30 до 50 % урожая [18]. Однако, учитывая экономический ущерб, который может быть нанесен данными бактериями, работ с описанием генетической организации, механизмов патогенеза и взаимодействия *Pal* с растениями на настоящий момент представлено несоизмеримо мало и только для двух штаммов [19, 20].

Таким образом, целью настоящего исследования стало изучение особенностей структурно-функциональной организации генома фитопатогенного штамма *P. amygdali* pv. *lachrymans* 8 (*Pal* 8), выделенного на территории Республики Беларусь.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись бактерии *Pal* 8 (номер в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов – БИМ В-695), также использовались бактерии *P. fluorescens* БИМ В-167.

Исследование фитопатогенных свойств проводили на растениях огурца сорта Малышок. Бактерии выращивали в течение 16 ч на скошенной агаризованной LB-среде (Conda, 1083), затем клетки ресуспендировали в физиологическом растворе и доводили до значений ОП₆₀₀, равных 0,1 и 0,3, после чего 10 мкл суспензии клеток вводили путем инъекции в паренхиму листа при помощи шприца Гамильтона. Проявление признаков заражения оценивали через 10–15 сут после инокуляции.

Исследуемые бактерии выращивали на агаризованной LB-среде с содержанием агар-агара 2 %. Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием набора Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience, PP-206).

Добавление адаптеров и подготовку библиотек ДНК к секвенированию проводили с использованием коммерческих наборов реактивов: Nextera XT DNA Library Prep Kit (FC-131-1024,

Illumina) – для последующего секвенирования по методу Illumina; Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109, Oxford Nanopore Technologies) – для последующего секвенирования с помощью нанопор.

Высокопроизводительное секвенирование выполняли на системе MiSeq (Illumina) с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v3, позволяющих получать прочтения длиной 2×301 нуклеотид. Нанопоровое секвенирование проводили с помощью прибора MinION (MinION MK 1B, Oxford Nanopore Technologies) и проточной ячейки R9.4.1.

Для удаления адаптеров и низкокачественных последовательностей ($Q < 18$) в данных, полученных на секвенаторе MiSeq, была использована программа Trimmomatic v.0.39 [21]; для сортировки и фильтрации fastq-файлов, полученных на секвенаторе MinION, – программа Barapost [22]. Для парного выравнивания последовательностей с целью их сравнения применяли пакет программ BLAST [23] и базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (НЦБИ) США [24]. Прочтения, полученные на приборе MiSeq, собирали до контигов с помощью программы SPAdes v.3.15.2 [25]. Для анализа частоты встречаемости контигов и поиска совпадающих концов использовали сценарий combinator-FQ.py из пакета программ ЦАГИИ-Разное (CAGER-misc) [26]. Прочтения, полученные на приборе MinION, собирали до черновика генома с помощью программы Flye v.2.8.3-b1695 [27]. Для исправления ошибок в черновой последовательности генома с помощью высококачественных прочтений MiSeq, была использована программа Pilon v.1.24 [28]. Для выравнивания прочтений относительно референсной последовательности использовали программу Bowtie 2 v.2.4.2 [29]. Для визуализации выровненных прочтений относительно референсной последовательности использовали программу Tablet v.1.21.02.08 [30].

Аннотация геномной последовательности проводилась на сервере НЦБИ США с помощью программы PGAP v.5.2 [31]. Визуализацию генетических карт осуществляли с помощью сервера Proksee [32] или программы SnapGene Viewer 5.2.

Расчет средней нуклеотидной идентичности (СНИ) проводили с использованием онлайн-сервиса JSpeciesWS [33] и программы OAT 0.93.1 [34]. Выравнивание полногеномных последовательностей выполняли в программе Mauve 20150226 [35]. Для поиска в пределах полногеномных последовательностей уникальных и общих ортологических генов использовали веб-сервер OrthoVenn3 [36]. Информацию о генах, ответственных за синтез систем рестрикции-модификации (Р-М), брали из веб-ресурса REBASE [37]. Поиск и анализ генетических локусов, относящихся к системе CRISPR/Cas, выполняли с помощью ресурса CRISPRCasFinder [38]. Поиск генетических детерминант, ответственных за устойчивость к антибактериальным лекарственным средствам, проводили с помощью ресурсов ResFinderFG-2.0 [39] и AMRFinderPlus [40].

Результаты и их обсуждение. В 2006 г. в Беларуси канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии биологического факультета Белорусского государственного университета В. Е. Мямин выделил из пораженных листьев огурца сорта Кураж F1 изолят, обозначенный как 8. По результатам биохимических тестов и секвенирования фрагмента гена 16S рРНК была установлена принадлежность выделенного штамма к *Pal*. Для подтверждения фитопатогенных свойств изучаемого штамма был проведен эксперимент по заражению растений огурца штаммом 8. В качестве отрицательных контролей использовали физиологический раствор и суспензии клеток непатогенного штамма *P. fluorescens* БИМ В-167. Показано, что после инокуляции растений огурца клеточной суспензией *Pal* 8 в количестве $\approx 5,5 \times 10^7$ КОЕ/мл наблюдалось появление некротических пятен на листьях, а при заражении клеточной суспензией $\approx 1,7 \times 10^8$ КОЕ/мл отмечалось образование больших маслянистых пятен и дальнейшее увядание листьев огурца (рис. 1).



Рис. 1. Фотографии растений огурца через 10–15 сут после искусственного заражения: а – физиологический раствор; б – *P. fluorescens* БИМ В-167; в – *Pal* 8

Fig. 1. Photographs of cucumber plants 10–15 days after artificial infection: а – saline solution; б – *P. fluorescens* BIM B-167; в – *Pal* 8

Таблица 1. Сравнение генома штамма *Pal* 8 с геномами близкородственных бактерий
Table 1. The comparison of the genome of the strain *Pal* 8 with the genomes of closely related bacteria

Штамм	Общий размер генома, п. н.	ГЦ, %	СНИ* (выровнено), %
<i>Pal</i> 814/98	6 579 377	57,2	99,87 (92,39)
<i>Pal</i> M301315	6 009 235	57,5	99,79 (85,72)
<i>Pal</i> 98A-744	6 276 659	58,0	99,72 (92,62)
<i>Pal</i> NM002	6 009 235	58,1	99,85 (95,97)
<i>Pal</i> YM7902	6 759 782	57,7	99,65 (89,06)
<i>Pal</i> ICMP 1448	5 799 366	58,2	99,65 (95,99)
<i>P. amygdali</i> pv. <i>tabaci</i> ATCC 11528	6 201 720	58,0	98,07 (86,76)
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ICMP 4352	6 023 336	58,0	97,10 (82,32)
<i>P. syringae</i> Susan2139	5 868 373	59,0	88,49 (84,46)

Примечание. * – СНИ между штаммом *Pal* 8 и указанными в таблице штаммами.

содержание ГЦ-пар – 56 %), pPAL8-02 (72 398 п. н., содержание ГЦ-пар – 55 %), pPAL8-03 (49 000 п. н., содержание ГЦ-пар – 54 %) и pPAL8-04 (9600 п. н., содержание ГЦ-пар – 55 %).

Установлено сходство изучаемых бактерий с известными представителями бактерий рода *Pseudomonas* путем расчета СНИ. Определено, что ближайшие родственные штаммы бактерий *Pal* 8 среди депонированных в базе данных GenBank – это штаммы *Pal* 814/98 и *Pal* M301315, СНИ с которыми составила соответственно 99,87 и 99,79 % (табл. 1).

С целью выявления вероятных путей распространения фитопатогена *Pal* 8 на территорию Республики Беларусь проводили сравнительный анализ показателей СНИ ортологических генов (ортоСНИ) близкородственных представителей (рис. 2).

Как видно на рис. 1, штамм *Pal* 8 способен вызывать образование некротических пятен на листьях растений огурца, что подтверждает наличие у этого штамма фитопатогенных свойств.

Для поиска генов, которые могут быть задействованы в патогенезе, штамм *Pal* 8 был подвергнут дальнейшему молекулярно-генетическому анализу.

Последовательность генома была секвенирована, собрана и депонирована в общедоступную базу данных GenBank (номера для доступа: CP075686–CP075690). Установлено, что геном *Pal* 8 представлен кольцевой хромосомой размером 6 054 652 п. н. с содержанием ГЦ-пар 58,11 % и четырьмя кольцевыми плазмидами: pPAL8-01 (77 748 п. н.,

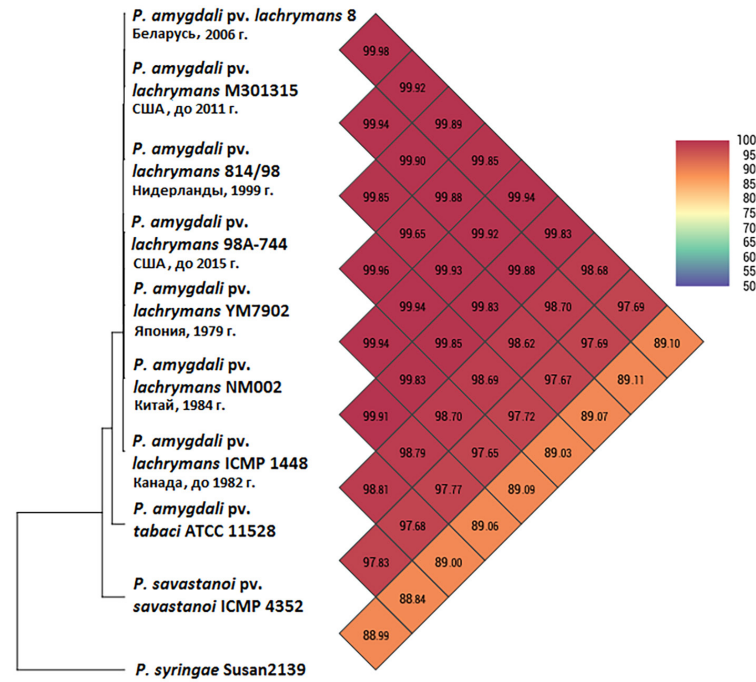


Рис. 2. Тепловая карта, показывающая значения ортоСНИ штамма 8 и близкородственных видов с обозначением страны и года выделения штаммов

Fig. 2. Heat map showing the orthoANI values of strain 8 and closely related species with the country and year of isolation of the strains indicated

Как видно из данных, представленных на рис. 2, штаммы 8, M301315, 814/98, 98A-744, YM7902, NM002 и ICMP 1448 образуют ветвь со схожими показателями ортоСНИ. Наибольшие значения ортоСНИ в сравнении со штаммом 8 продемонстрировали штаммы M301315 (99,98 %) и 814/98 (99,92 %), которые были выделены на территории США и Нидерландов соответственно. Учитывая проведенный сравнительный анализ, можно высказать предположение, что путь распространения фитопатогена *Pal* осуществлялся либо параллельно из Нидерландов в США и Беларусь, либо сначала из Нидерландов на территорию США, а затем в Беларусь.

Несмотря на негативную реакцию научных кругов, антибиотики (такие как стрептомицин, окситетрациклин или касугамицин) по-прежнему используются во многих странах для борьбы с основными бактериальными заболеваниями растений. Следовательно, анализ геномной последовательности на наличие генов устойчивости к антибиотическим веществам является важным этапом характеристики фитопатогенного штамма. Анализ не выявил генетических детерминант антибиотикорезистентности у бактерий *Pal* 8, согласно курируемым базам данных эталонных генов антибиотикорезистентности с помощью сервиса AMRFinderPlus (база данных от 22.07.2024) и базе данных генов антибиотикорезистентности, выявленных методом функциональной метагеномики, ресурса ResFinderFG-2.0 (версия от 30.06.2022). Поиск системы CRISPR/Cas (коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами) выявил в хромосоме бактерий штамма 8 наличие повторяющихся последовательностей, однако генов системы CRISPR/Cas не было идентифицировано. В нуклеотидной последовательности штамма *Pal* 8 найдены компоненты системы Р-М типа II, которые имеют как хромосомную (номера локусов C4C37_00035, C4C37_00645, C4C37_03980 (неполная последовательность), C4C37_04275, C4C37_04280, C4C37_09560, C4C37_09565, C4C37_10430, C4C37_13215, C4C37_18430), так и плазмидную (номера локусов C4C37_28745, C4C37_28750) локализацию.

На следующем этапе работы с целью проведения анализа и выявления уникальных генетических особенностей генома бактерий *Pal* 8 сравнивали нуклеотидную последовательность исследуемого штамма с полногеномными последовательностями бактерий изучаемого патовара. На момент проведения сравнения (сентябрь 2024 г.) в базе данных GenBank, помимо штамма 8, были депонированы всего три полностью собранные геномные последовательности бактерий патовара *lachrymans* штаммов M301315, NM002 и YM7902. Характеристика и особенности геномных последовательностей данных бактерий представлены в табл. 2.

Далее для определения геномных перестроек и выявления уникальных областей был выполнен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности штамма *Pal* 8 с последовательностями штаммов *Pal* M301315, *Pal* NM002 и *Pal* YM7902 (рис. 3).

Таблица 2. Характеристика и геномные особенности *Pal* 8 и других представителей изучаемого патовара
Table 2. Characteristics and genomic features of *Pal* 8 and other representatives of the studied pathovar

Характеристики	<i>Pal</i> 8	<i>Pal</i> NM002	<i>Pal</i> M301315	<i>Pal</i> YM7902
Место/источник выделения	Беларусь/растение огурца	Китай/растение огурца	США/–	Япония/растение огурца
Дата депонирования в базу данных GenBank	31.05.2021	22.03.2017	31.07.2018	12.06.2023
Размер хромосомы, п. н.	6 054 652	6 009 235	6 075 120	6 122 931
ГЦ-состав, %	58,11	58,10	57,42	57,67
Репликоны	Одна хромосома (CP075686.1); четыре плазмиды (CP075687.1–CP075690.1)	Одна хромосома (CP020351.1); плазмиды отсутствуют	Одна хромосома (CP031225.1); три плазмиды (CP031226.1–CP031228.1)	Одна хромосома (CP127045.1); шесть плазмид (CP127046.1–CP127051.1)
Всего генов	5757	5706	7132	6333
Гены, кодирующие белки	5487	5375	6606	6100
Гены РНК кластеров	85	85	140	86
Гены рРНК (5S, 16S, 23S)	6, 5, 5	6, 5, 5	6, 5, 5	6, 5, 5
Гены тРНК	65	65	119	66
Другие гены РНК	4	4	5	4
Псевдогены	185	246	386	147

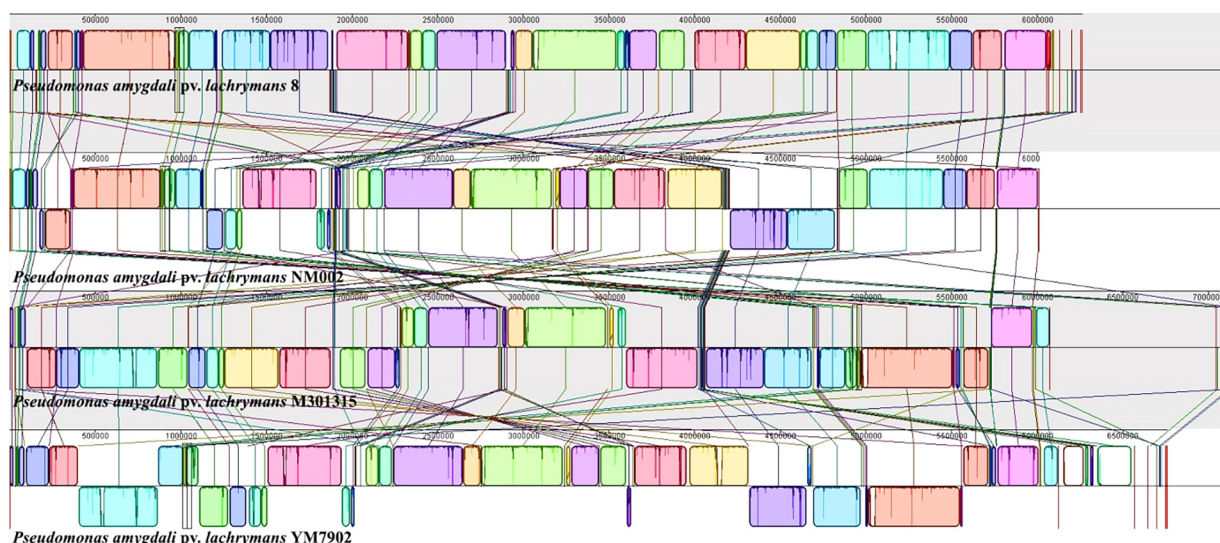


Рис. 3. Графический результат выравнивания геномов штаммов *Pal* 8, *Pal* M301315, *Pal* NM002 и *Pal* YM7902 (идентичные области обозначены одинаковым цветом)

Fig. 3. A graphical result of genome alignment of strains *Pal* 8, *Pal* M301315, *Pal* NM002 and *Pal* YM7902 (identical regions are filled with the same color)

Как показано на рис. 3, в пределах генома штамма *Pal* 8 имеется ряд генетических перестроек в сравнении с близкородственными представителями *Pal* M301315, *Pal* NM002 и *Pal* YM7902. Наиболее схожее расположение генов в сравнении со штаммом 8 имеет геном штамма NM002. Выявлена уникальная область в пределах хромосомы штамма *Pal* 8 размером 19 773 п. н. (координаты на хромосоме: 5 154 790–5 174 562 п. н.), которая содержит 17 открытых рамок считывания (ОРС). Генетическая карта и характеристика ОРС данной области приведены на рис. 4 и в табл. 3.

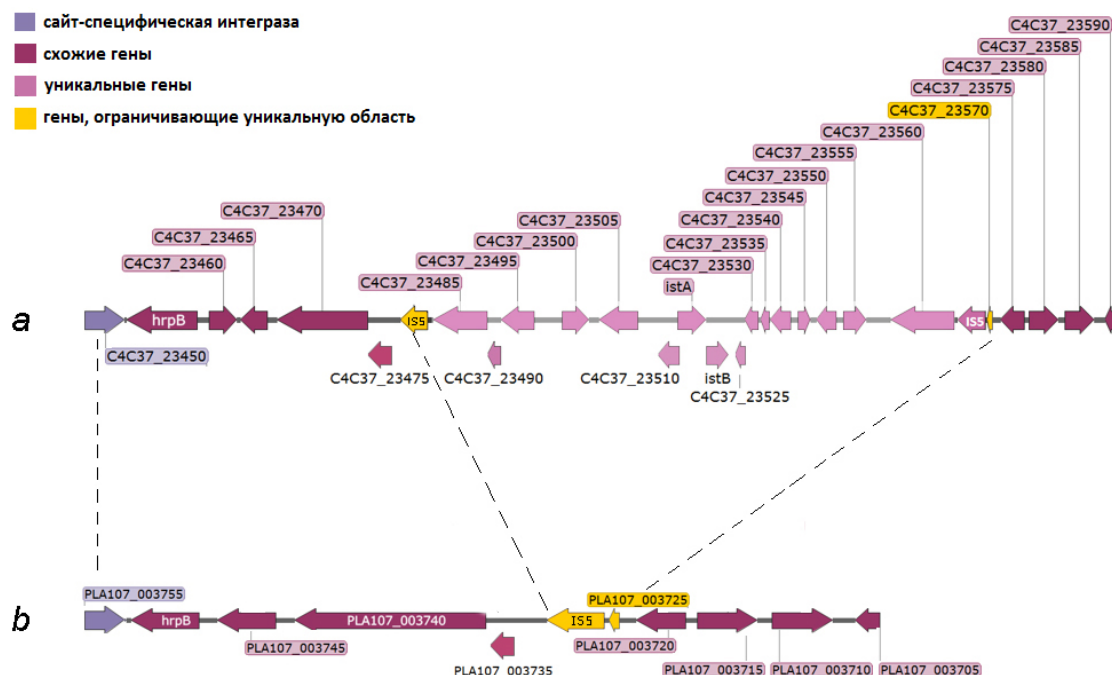


Рис. 4. Графический результат сравнения генетических локусов штаммов *Pal* 8 и *Pal* M301315: *a* – область в геноме штамма *Pal* 8; *b* – аналогичный регион в геноме штамма *Pal* M301315

Fig. 4. A graphical result of comparison of genetic loci of strains *Pal* 8 and *Pal* M301315: *a* – region in the genome of strain *Pal* 8; *b* – the same region in the genome of strain *Pal* M301315

Т а б л и ц а 3. Унікальныя ОРС, складаючыя кластер у геноме бактэрыі штамма *Pal 8*Table 3. Unique ORFs constituting a cluster in the genome of strain *Pal 8*

Номер локуса (ген)	Размер, п. н.	Функция белка или продукт
C4C37_23485	1941	ABC-транспортер
C4C37_23490	486	Белок с неизвестной функцией
C4C37_23495	1212	Белок с неизвестной функцией
C4C37_23500	981	Транспозаза семейства IS5
C4C37_23505	1407	Белок с неизвестной функцией
C4C37_23510	762	Гидролаза семейства HAD
C4C37_23515 (<i>istA</i>)	1023	IS21-подобный элемент транспозазы семейства ISPsy4
C4C37_23520 (<i>istB</i>)	810	IS21-подобный элемент транспозазы семейства ISPsy4
C4C37_23525	357	Белок с неизвестной функцией
C4C37_23530	498	Белок с неизвестной функцией
C4C37_23535	309	Белок с неизвестной функцией
C4C37_23540	750	Белок семейства металлофосфоэстераз
C4C37_23545	441	Белок, содержащий домен спираль-поворот-спираль
C4C37_23550	708	Белок с неизвестной функцией
C4C37_23555	810	Нуклеаза семейства GIY-YIG
C4C37_23560	2268	АТФаза семейства AAA
C4C37_23565	978	Транспозаза семейства IS5

П р и м е ч а н и е. Полужирным шрифтом выделены гены, не встречающиеся в геномах бактерий, представленных в базе данных nt/nt GenBank.

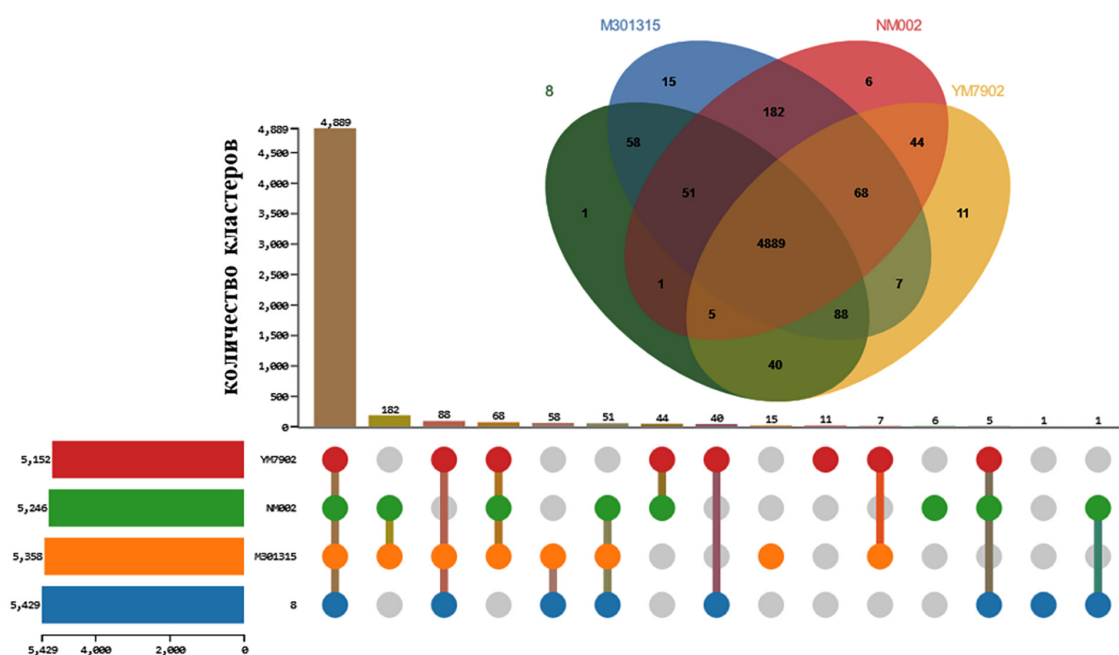


Рис. 5. Графический результат сравнения нуклеотидных последовательностей штаммов *Pal 8*, *Pal M301315*, *Pal NM002*, *Pal YM7902*. Диаграмма отображает общие и уникальные ортологичные кластеры сравниваемых штаммов. Горизонтальная столбчатая диаграмма слева показывает количество ортологичных кластеров на штамм. Правая вертикальная столбчатая диаграмма – количество ортологичных кластеров, общих для штаммов. Линии представляют пересекающиеся группы

Fig. 5. A graphical result of comparison of nucleotide sequences of strains *Pal 8*, *Pal M301315*, *Pal NM002*, *Pal YM7902*. The diagram shows common and unique orthologous clusters of the compared strains. The horizontal bar chart on the left shows the number of orthologous clusters per strain. The vertical bar chart on the right shows the number of orthologous clusters shared by the strains. The lines represent intersecting sets

ОРС под номерами локусов C4C37_23485, C4C37_23490, C4C37_23495 образуют единый кластер, который имеет высокий процент идентичности (92,30 %) с нуклеотидной последовательностью бактерий штамма *P. cannabina* pv. *alisalensis* MAFF 301419. Данный штамм также является фитопатогеном и вызывает бактериальный ожог листьев и бактериальную пятнистость крестоцветных.

ОРС с номерами локусов C4C37_23505, C4C37_23550, C4C37_23555 не встречается в геномах бактерий, представленных в базе данных nr/nt GenBank (по состоянию на сентябрь 2024 г.). Остальные генетические детерминанты, представленные в табл. 3, отсутствуют в пределах геномов штаммов M301315, NM002, YM7902, однако имеются у других представителей бактерий рода *Pseudomonas*.

На следующем этапе геномного анализа определяли количество уникальных и общих ортологичных генов штаммов *Pal* 8, *Pal* M301315, *Pal* NM002 и *Pal* YM7902. Результаты данного анализа представлены на рис. 5.

В результате проведенного анализа определено, что 4889 ортологичных генов являются общими для всех исследованных штаммов. В свою очередь, в пределах хромосомной последовательности штамма *Pal* 8 локализованы уникальные ортологичные гены со следующими номерами локусов: C4C37_14075, C4C37_14130, C4C37_14175 и C4C37_14220. Данные ОРС кодируют практически идентичные белки с неизвестной функцией, размером 146 аминокислотных остатков.

В настоящее время анализ нуклеотидных последовательностей геномов бактерий с использованием современных средств аннотации позволяет предсказать наличие генов, связанных с фитопатогенными или же фитостимулирующими свойствами штамма. Данному анализу будет посвящена отдельная статья.

Заключение. В работе приведены данные, которые подтверждают, что бактерии *Pal* 8 *in planta* проявляют фитопатогенную активность в отношении растений огурца. Проведено полногеномное секвенирование изучаемых бактерий с последующим депонированием собранной последовательности нуклеотидов в общедоступную базу данных GenBank (номера для доступа: CP075686–CP075690). Определены вероятные пути распространения фитопатогенного штамма *Pal* 8 на территорию Беларуси. Осуществлено сравнение нуклеотидной последовательности штамма *Pal* 8 с наиболее схожими нуклеотидными последовательностями бактерий патовара *Pal* (штаммы M301315, NM002 и YM7902), в результате чего выявлены значительные генетические перестройки и определена локализация уникальной области размером 19 773 п. н. (координаты на хромосоме штамма 8: 5 154 790–5 174 562 п. н.). Установлено, что в пределах хромосомной последовательности штамма 8 локализовано 4889 ортологичных генов, общих для штаммов *Pal* 8, *Pal* M301315, *Pal* NM002 и *Pal* YM7902, и 4 уникальных ортологичных гена с номерами локусов C4C37_14075, C4C37_14130, C4C37_14175 и C4C37_14220.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследования выполнены при финансовой поддержке государственной программы научных исследований «Биотехнологии» (задание 3.03) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор № B23M-076).

Acknowledgements. The research was carried out with the financial support of the State Program of Scientific Research “Biotechnologies” (task 3.03) and the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (contract No. B23M-076).

Список использованных источников

1. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. nov. / J. Lalucat, M. Gomila, M. Mulet [et al.] // Systematic and Applied Microbiology. – 2022. – Vol. 45, N 1. – Art. 126289. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126289>
2. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable / M. W. Silby, C. Winstanley, S. A. C. Godfrey [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2011. – Vol. 35, N 4. – P. 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
3. Multifaceted Impacts of Plant-Beneficial *Pseudomonas* spp. in Managing Various Plant Diseases and Crop Yield Improvement / N. Mehmood, M. Saeed, S. Zafarullah [et al.] // ACS Omega. – 2023. – Vol. 8, N 25. – P. 22296–22315. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00870>
4. Höfte, M. Plant pathogenic *Pseudomonas* species / M. Höfte, P. De Vos // Plant-Associated Bacteria / ed. S. S. Gnanamanickam. – Dordrecht, 2006. – P. 507–533. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_14
5. Diggle, S. P. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat / S. P. Diggle, M. Whiteley // Microbiology (Reading). – 2020. – Vol. 166, N 1. – P. 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
6. *Pseudomonas fluorescens* Showing Antifungal Activity against *Macrophomina phaseolina*, a Severe Pathogenic Fungus of Soybean, Produces Phenazine as the Main Active Metabolite / S. Castaldi, M. Masi, F. Sautua [et al.] // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11, N 11. – Art. 1728. <https://doi.org/10.3390/biom11111728>

7. Phytopathogenic *Pseudomonas syringae* as a Threat to Agriculture: Perspectives of a Promising Biological Control Using Bacteriophages and Microorganisms / P. Córdova, J. P. Rivera-González, V. Rojas-Martínez [et al.] // Horticulturae. – 2023. – Vol. 9, N 6. – Art. 712. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060712>
8. Schroth, M. N. Phytopathogenic Pseudomonads and Related Plant-Associated Pseudomonads / M. N. Schroth, D. C. Hildebrand, N. Panopoulos // The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria / eds.: M. Dworkin [et al.]. – 3rd ed. – New York, 2006. – Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. – P. 714–740. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_23
9. *Pseudomonas syringae* (bacterial blast) // PlantwisePlus Knowledge Bank. – 2022. – Vol. Species Pages – Art. 45010. <https://doi.org/10.1079/pwkb.species.45010>
10. Comparative Analysis of the Core Proteomes among the *Pseudomonas* Major Evolutionary Groups Reveals Species-Specific Adaptations for *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas chlororaphis* / M. Nikolaidis, D. Mossialos, S. G. Oliver, G. D. Amoutzias // Diversity. – 2020. – Vol. 12, N 8. – P. 289. <https://doi.org/10.3390/d12080289>
11. Psallidas, P. G. A new bacteriosis of almond caused by *Pseudomonas amygdali* sp. nov. / P. G. Psallidas, C. G. Panagopoulos // Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki. – 1975. – Vol. 11, N 2. – P. 94–108.
12. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959) / L. Gardan, H. Shafik, S. Belouin [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1999. – Vol. 49, N 2 – P. 469–478. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-469>
13. Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana* / S. Lee, D. S. Yang, S. R. Uppalapati [et al.] // BMC Plant Biology. – 2013. – Vol. 13, N 1. – Art. 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-65>
14. CABI. *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (bacterial: mulberry blight) / CABI // CABI Compendium. – 2019. – Art. 44977. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.44977>
15. Pathogenesis of *Pseudomonas syringae* pv. *sesami* associated with sesame (*Sesamum indicum* L.) bacterial leaf spot / S. S. Firdous, R. Asghar, M. Irfan-ul-Haque [et al.] // Pakistan Journal of Botany. – 2009. – Vol. 41, N 2. – P. 927–934.
16. Olczak-Woltman, H. Genetic background of host-pathogen interaction between *Cucumis sativus* L. and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* / H. Olczak-Woltman, M. Schollenberger, K. Niemirowicz-Szczytt // Journal of Applied Genetics. – 2009. – Vol. 50, N 1. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/bf03195645>
17. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) in cucumber and identification of molecular markers linked to resistance / H. Olczak-Woltman, G. Bartoszewski, W. Mądry, K. Niemirowicz-Szczytt // Plant Pathology. – 2009. – Vol. 58, N 1. – P. 145–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01911.x>
18. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *hrpZ* gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves / X.-L. Meng, X.-W. Xie, Y.-X. Shi [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2017. – Vol. 122, N 2. – P. 441–449. <https://doi.org/10.1111/jam.13356>
19. Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 814/98 indicates diversity within the pathovar / R. Słomnicka, H. Olczak-Woltman, M. Oskiera [et al.] // European Journal of Plant Pathology. – 2018. – Vol. 151, N 3. – P. 663–676. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1401-8>
20. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* NM002: Insights into its potential virulence genes and putative invasion determinants / L. Li, L. Yuan, Y. Shi [et al.] // Genomics. – 2019. – Vol. 111, N 6. – P. 1493–1503. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.10.004>
21. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, N 15. – P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
22. Sikolenko, M. A. Barapost: Binning of Nucleotide Sequences According to Taxonomic Annotation / M. A. Sikolenko, L. N. Valentovich // IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics. – 2021. – Vol. 18, N 6. – P. 2766–2767. <https://doi.org/10.1109/tcbb.2020.3009780>
23. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 1990. – Vol. 215, N 3. – P. 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
24. GenBank / D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2005. – Vol. 33, Iss. suppl_1. – P. D34–D38. <https://doi.org/10.1093/nar/gki063>
25. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov [et al.] // Journal of Computational Biology. – 2012. – Vol. 19, N 5. – P. 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
26. GitHub – masikol/cager-misc [Website]. – URL: <https://github.com/masikol/cager-misc> (date of access: 26.12.2020).
27. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs / M. Kolmogorov, J. Yuan, Y. Lin, P. A. Pevzner // Nature Biotechnology. – 2019. – Vol. 37, N 5. – P. 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
28. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement / B. J. Walker, T. Abeel, T. Shea [et al.] // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 11. – P. e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
29. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9, N 4. – P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
30. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data / I. Milne, G. Stephen, M. Bayer [et al.] // Briefings in Bioinformatics. – 2013. – Vol. 14, N 2. – P. 193–202. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>
31. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline / T. Tatusova, M. DiCuccio, A. Badretdin [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2016. – Vol. 44, N 14. – P. 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
32. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes / J. R. Grant, E. Enns, E. Marinier [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2023. – Vol. 51, N W1. – P. W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
33. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison / M. Richter, R. Rosselló-Móra, F. O. Glöckner, J. Peplies // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32, N 6. – P. 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
34. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity / I. Lee, Y. O. Kim, S.-C. Park, J. Chun // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – Vol. 66, N 2. – P. 1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>

35. Darling, A. E. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement / A. E. Darling, B. Mau, N. T. Perna // PLOS One. – 2010. – Vol. 5, N 6. – P. e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
36. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes / J. Sun, F. Lu, Y. Luo [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2023. – Vol. 51, N W1. – P. W397–W403. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad313>
37. REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes / R. J. Roberts, T. Vincze, J. Posfai, D. Macelis // Nucleic Acids Research. – 2015. – Vol. 43, N D1. – P. D298–299. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1046>
38. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins / D. Couvin, A. Bernheim, C. Toffano-Nioche [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46, N W1. – P. W246–W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
39. ResFinderFG v2.0: a database of antibiotic resistance genes obtained by functional metagenomics / R. Gschwind, S. Ugarcina Perovic, M. Weiss [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2023. – Vol. 51, N W1. – P. W493–W500. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad384>
40. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence / M. Feldgarden, V. Brover, N. Gonzalez-Escalona [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, N 1. – Art. 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>

References

1. Lalucat J., Gomila M., Mulet M., Zaruma A., García-Valdés E. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 2022, vol. 45, no. 1, art. 126289. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126289>
2. Silby M. W., Winstanley C., Godfrey S. A. C., Levy S. B., Jackson R. W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, vol. 35, no. 4, pp. 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
3. Mehmood N., Saeed M., Zafarullah S., Hyder S., Rizvi Z. F., Gondal A. S., Jamil N., Iqbal R., Ali B., Ercisli S., Kupe M. Multifaceted Impacts of Plant-Beneficial *Pseudomonas* spp. in Managing Various Plant Diseases and Crop Yield Improvement. *ACS Omega*, 2023, vol. 8, no. 25, pp. 22296–22315. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00870>
4. Höfte M., De Vos P. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, 2006, pp. 507–533. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_14
5. Diggle S. P., Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*, 2020, vol. 166, no. 1, pp. 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
6. Castaldi S., Masi M., Sautua F., Cimmino A., Istatico R., Carmona M., Tuzi A., Evidente A. *Pseudomonas fluorescens* Showing Antifungal Activity against *Macrophomina phaseolina*, a Severe Pathogenic Fungus of Soybean, Produces Phenazine as the Main Active Metabolite. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no. 11, art. 1728. <https://doi.org/10.3390/biom11111728>
7. Córdova P., Rivera-González J. P., Rojas-Martínez V., Fiore N., Bastías R., Zamorano A., Vera F., Barrueto J., Díaz B., Ilabaca-Díaz C., Bertaccini A., Higuera G. Phytopathogenic *Pseudomonas syringae* as a Threat to Agriculture: Perspectives of a Promising Biological Control Using Bacteriophages and Microorganisms. *Horticulturae*, 2023, vol. 9, no. 6, art. 712. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060712>
8. Schroth M. N., Hildebrand D. C., Panopoulos N. Phytopathogenic Pseudomonads and Related Plant-Associated Pseudomonads. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Vol. 6. Proteobacteria: Gamma Subclass*. New York, 2006, pp. 714–740. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_23
9. *Pseudomonas syringae* (bacterial blast). *PlantwisePlus Knowledge Bank*, 2022, vol. Species Pages, art. 45010. <https://doi.org/10.1079/pwkb.species.45010>
10. Nikolaidis M., Mossialos D., Oliver S. G., Amoutzias G. D. Comparative Analysis of the Core Proteomes among the *Pseudomonas* Major Evolutionary Groups Reveals Species-Specific Adaptations for *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas chlororaphis*. *Diversity*, 2020, vol. 12, no. 8, pp. 289. <https://doi.org/10.3390/d12080289>
11. Psallidas P. G., Panagopoulos, C. G. A new bacteriosis of almond caused by *Pseudomonas amygdali* sp. nov. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki*, 1975, vol. 11, no. 2, pp. 94–108.
12. Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F., Grimont P. A. D. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Satic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1999, vol. 49, no. 2, pp. 469–478. <https://doi.org/10.1099/00207113-49-2-469>
13. Lee S., Yang D. S., Uppalapati S. R., Sumner L. W., Mysore K. S. Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology*, 2013, vol. 13, no. 1, art. 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-65>
14. CABI. *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (bacterial: mulberry blight). *CABI Compendium*, 2019, art. 44977. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.44977>
15. Firdous S., Asghar R., Irfan-ul-Haq M., Waheed A., Afzal S. N., Mirza, M. Y. Pathogenesis of *Pseudomonas syringae* pv. *sesami* associated with sesame (*Sesamum indicum* L.) bacterial leaf spot. *Pakistan Journal of Botany*, 2009, vol. 41, no. 2, pp. 927–934.
16. Olczak-Woltman H., Schollenberger M., Niemirowicz-Szczytt K. Genetic background of host-pathogen interaction between *Cucumis sativus* L. and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Journal of Applied Genetics*, 2009, vol. 50, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1007/bf03195645>
17. Olczak-Woltman H., Bartoszewski G., Mądry W., Niemirowicz-Szczytt K. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) in cucumber and identification of molecular markers linked to resistance. *Plant Pathology*, 2009, vol. 58, no. 1, pp. 145–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01911.x>
18. Meng X.-L., Xie X.-W., Shi Y.-X., Chai A.-L., Ma Z.-H., Li B.-J. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *hrpZ* gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, vol. 122, no. 2, pp. 441–449. <https://doi.org/10.1111/jam.13356>
19. Słomnicka R., Olczak-Woltman H., Oskiera M., Schollenberger M., Niemirowicz-Szczytt K., Bartoszewski G. Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 814/98 indicates diversity within the pathovar. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, vol. 151, no. 3, pp. 663–676. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1401-8>

20. Li L., Yuan L., Shi Y., Xie X., Chai A., Wang Q., Li B. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* NM002: Insights into its potential virulence genes and putative invasion determinants. *Genomics*, 2019, vol. 111, no. 6, pp. 1493–1503. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.10.004>
21. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
22. Sikolenko M. A., Valentovich L. N. Barapost: Binning of Nucleotide Sequences According to Taxonomic Annotation. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 2021, vol. 18, no. 6, pp. 2766–2767. <https://doi.org/10.1109/tcbb.2020.3009780>
23. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
24. Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 2005, vol. 33, iss. suppl_1, pp. D34–D38. <https://doi.org/10.1093/nar/gki063>
25. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S., Lesin V. M., Nikolenko S. I., Pham S., Prjibelski A. D., Pyshkin A. V., Sirotkin A. V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M. A., Pevzner P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 2012, vol. 19, no. 5, pp. 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
26. *GitHub – masikol/cager-misc*. Available at: <https://github.com/masikol/cager-misc> (accessed 26.12.2020).
27. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P. A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 2019, vol. 37, no. 5, pp. 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
28. Walker B. J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo Ch. A., Zeng Q., Wortman J., Young S. K., Earl A. M. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 11, p. e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
29. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 2012, vol. 9, no. 4, pp. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
30. Milne I., Stephen G., Bayer M., Cock P. J. A., Pritchard L., Cardle L., Shaw P. D., Marshall D. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 193–202. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>
31. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E. P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K. D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol. 44, no. 14, pp. 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
32. Grant J. R., Enns E., Marinier E., Mandal A., Herman E. K., Chen C.-Y., Graham M., Van Domselaar G., Stothard P. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, no. W1, pp. W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
33. Richter M., Rosselló-Móra R., Glöckner F. O., Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32, iss. 6, pp. 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
34. Lee I., Kim Y. O., Park S.-C., Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, vol. 66, no. 2, pp. 1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
35. Darling A. E., Mau B., Perna N. T. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLOS One*, 2010, vol. 5, no. 6, pp. e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
36. Sun J., Lu F., Luo Y., Bie L., Xu L., Wang Y. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, no. W1, pp. W397–W403. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad313>
37. Roberts R. J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 2015, vol. 43, no. D1, pp. D298–299. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1046>
38. Couvin D., Bernheim A., Toffano-Nioche C., Touchon M., Michalik J., Néron B., Rocha E. P. C., Vergnaud G., Gautheret D., Pourcel Ch. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research*, 2018, vol. 46, no. W1, pp. W246–W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
39. Gschwind R., Ugarcina Perovic S., Weiss M., Petitjean M., Lao J., Coelho L. P., Ruppé E. ResFinderFG v2.0: a database of antibiotic resistance genes obtained by functional metagenomics. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, no. W1, pp. W493–W500. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad384>
40. Feldgarden M., Brover V., Gonzalez-Escalona N., Frye J. G., Haendiges, J., Haft D. H., Hoffmann M., Pettengill J. B., Prasad A. B., Tillman G. T., Tyson G. H., Klimke W. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, no. 1, art. 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>

Информация об авторах

Муратова Анна Алексеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: muratova@mbio.bas-net.by

Охремчук Артур Эдуардович – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.akhremchuk@mbio.bas-net.by

Валентович Леонид Николаевич – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Anna A. Muratova – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: muratova@mbio.bas-net.by

Artur E. Akhremchuk – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.akhremchuk@mbio.bas-net.by

Leonid N. Valentovich – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.214.5:616-006.446

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-146-160>

Поступила в редакцию 09.12.2024

Received 09.12.2024

Е. В. Гузова, А. А. Гавричков, И. Н. Ильюшёнков, Т. В. Романовская,
М. А. Лиховец, В. В. Скакун, Н. Н. Яцков, В. В. Гринев

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ СОХРАНЯЕМЫХ ИНТРОНОВ НА КОДИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ МОЛЕКУЛ РНК В ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Сохранение интронов – один из типов альтернативного сплайсинга, который подразумевает образование молекул зрелых РНК, содержащих в своей структуре хотя бы одну интронную последовательность. Если интронная последовательность попадает в кодирующую часть мРНК, то она может поменять структуру, свойства и порой функциональные возможности соответствующего белка. Более того, некоторые белки такого рода могут быть иммуногенными и рассматриваются как потенциальные мишени для терапии ряда заболеваний. Однако в целом влияние сохранения интронов на кодирующий потенциал РНК до сих пор изучено слабо.

В настоящей работе изложены результаты комбинированного транскриптомно-протеомного исследования 3540 последовательностей интронов, сохраняемых в зрелых молекулах РНК генов, активных в лейкозных клетках человека. Проведена классификация таких интронов в соответствии с наличием у них кодирующего потенциала и описано 7 возможных способов влияния сохранения интронов на последующую трансляцию соответствующих транскриптов. Выявлено 56 интронных последовательностей, способных транслироваться, причем 3 из них – с образованием ранее неизвестных полипептидов.

Ключевые слова: альтернативный сплайсинг РНК, сохранение интрона, транскриптом, кодирующий потенциал, протеом, биоинформатический анализ

Для цитирования: Влияние сохраняемых интронов на кодирующий потенциал молекул РНК в лейкозных клетках человека / Е. В. Гузова, А. А. Гавричков, И. Н. Ильюшёнков [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 146–160. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-146-160>

Katsiaryna V. Huzava, Aleksey A. Gavrichkov, Ilya M. Ilyushonak, Tatsiana V. Ramanouskaya,
Maksim A. Likhavets, Victor V. Skakun, Mikalai M. Yatskou, Vasily V. Grinev

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF RETAINED INTRONS ON THE CODING POTENTIAL OF RNA MOLECULES IN HUMAN LEUKEMIA CELLS

Abstract. Intron retention is a mode of alternative splicing in which at least one intron is retained in mature RNA molecules. The inclusion of an intron sequence within the coding region of the mRNA can change the structure, properties and, in some cases, the functions of the corresponding protein. Furthermore, some of these altered proteins can be immunogenic and are considered as potential targets for the treatment of a number of diseases. In general, however, the effect of intron retention on the coding potential of RNA molecules remains poorly studied.

This paper presents the results of a combined transcriptomic-proteomic study of 3540 intron sequences retained in mature RNA molecules of genes that are active in human leukemia cells. The introns were classified according to their coding potential and seven possible ways in which intron retention can influence the subsequent translation of the corresponding transcripts were described. A total of 56 translation-capable intronic sequences were identified, and 3 of them produce previously unknown polypeptides.

Keywords: alternative RNA splicing, intron retention, transcriptome, coding potential, proteome, bioinformatics analysis

For citation: Huzava K. V., Gavrichkov A. A., Ilyushonak I. M., Ramanouskaya T. V., Likhavets M. A., Skakun V. V., Yatskou M. M., Grinev V. V. Effect of retained introns on the coding potential of RNA molecules in human leukemia cells. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalogichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 146–160 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-146-160>

Введение. Согласно современным представлениям геном человека насчитывает порядка 19,5 тыс. белок-кодирующих генов (GENCODE, вып. 47, окт. 2024 г.). Каталог конечных продуктов их экспрессии продолжает расширяться, однако уже сейчас в публичных базах данных депонировано свыше 100 тыс. уникальных белковых последовательностей человека, что значительно

превышает упомянутое количество кодирующих их генов [1]. Возможность существования подобного разнообразия белков главным образом обусловлена мозаичностью структуры генов человека. В процессе созревания продукты их транскрипции способны подвергаться альтернативному сплайсингу (АС) – сложному многоступенчатому молекулярному процессу, обеспечивающему образование нескольких изоформ РНК из одного предшественника [2].

Среди известных типов АС наименее изученным и долгое время ошибочно рассматриваемым только в контексте аберрантного функционирования системы сплайсинга РНК является сохранение интронов. При данном типе сплайсинга образующиеся молекулы зрелых РНК в своем составе несут последовательности интронов, называемые сохраненными интронами (от англ. *retained introns*, RI) [3]. С появлением секвенаторов нового поколения, а также с развитием биоинформатических подходов, позволяющих осуществлять анализ больших транскриптомных данных, границы нашего понимания феномена сохранения интронов существенно расширились. К настоящему времени удалось установить, что сохранение интронов в транскриптах – это не только следствие возникающих на молекулярном уровне нарушений, присущих различным заболеваниям (в том числе и онкологическим), но и нормальный процесс, характеризующийся тканевой и клеточной специфичностью. Эти открытия, в свою очередь, обусловили повышение интереса к изучению судьбы транскриптов, образующихся в результате протекания АС указанного типа [4].

Исходно предполагалось, что молекулы зрелых мРНК, содержащие интрон(-ы), не обладают функциональной активностью и элиминируются. Последнее объяснялось содержанием в пределах их последовательностей преждевременных терминирующих кодонов (от англ. *premature termination codons*, PTC), распознающихся компонентами системы нонсенс-опосредованной деградации (от англ. *nonsense-mediated decay*, NMD) мРНК. Однако в дальнейшем выяснилось, что мРНК, содержащие PTC, способны избегать деградации и сохраняться в клетках, внося очевидный вклад в разнообразие транскриптома [5].

Более того, такие молекулы мРНК, несмотря на присутствие интронных последовательностей и PTC, могут транслироваться. В доступных на сегодняшний день научных работах, посвященных изучению феномена сохранения интронов, изложены некоторые факты, касающиеся особенностей трансляции подобных транскриптов и структуры синтезирующихся на их матрице белков. Так, известно, что в зависимости от протяженности интронов, их положения относительно стартового кодона, а также наличия в них стоп-кодонов результатом трансляции несущих их молекул РНК могут быть усеченные или же, наоборот, удлиненные изоформы белков с измененной функцией и/или клеточной локализацией. Более того, отмечается, что в случаях, когда речь идет о протекании патологических процессов, среди подобных белков обнаруживаются и иммуногенные молекулы. Однако все эти данные были получены главным образом при изучении вклада в разнообразие протеома человека тех интронных последовательностей, которые, сохраняясь в молекулах зрелых РНК, локализуются в области главных открытых рамок считывания мРНК (от англ. *main open reading frames*, mORF) и могут быть транслированы [6, 7]. При этом работы, которые были бы сфокусированы на системной оценке влияния всех RI (как транслируемых, так и нетранслируемых) на структуру несущих их транскриптов и соответствующих белков, в настоящее время фактически отсутствуют.

В контексте вышеописанного целью настоящего исследования стала оценка влияния интронов, сохраняемых в зрелых РНК белковых генов, активных в лейкозных клетках человека, на кодирующий потенциал таких молекул мРНК.

Материалы и методы исследования. В основе настоящего исследования лежал анализ прошедших стандартную процедуру предпроцессинга оригинальных, а также публичных данных секвенирования по методу парноконцевого RNA-Seq транскриптомов лейкозных и нормальных клеток крови человека. К группе оригинальных данных, ранее описанных в работе В. В. Гринева с соавт. [8], относились библиотеки, полученные в результате шести независимых повторов секвенирования полного транскриптома клеток модельной линии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) Kasumi-1, в частности клеток Kasumi-1, предварительно трансфецированных короткими интерферирующими РНК (киРНК), обеспечивающими нокдаун гибридного онкогена *RUNX1::RUNX1T1*,

а также контрольных клеток, трансфекция которых проводилась с использованием неактивных киРНК (по три повтора для каждого варианта). Второй набор данных состоял из отобранных среди представленных в базе данных European Nucleotide Archive [9] результатов секвенирования с использованием секвенаторов HiSeq 2000/2500 (Illumina) транскриптомов клеток ОМЛ с транслокацией t(8;21)(q22;q22), с инверсией inv(16), с нормальным кариотипом и перестройками гена *MLL*, а также транскриптомов нормальных CD34⁺ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток из красного костного мозга, периферической и пуповинной крови здоровых доноров (по 20 образцов для каждого типа клеток).

Идентификация геномных координат RI проводилась с использованием оригинальной методики, подробное описание которой приведено в наших более ранних работах [8, 10]. Восстановление нуклеотидных последовательностей обнаруженных RI осуществлялось с использованием функционала R/Bioconductor пакета Biostrings [11]. Их последующая трансляция *in silico* проводилась в трех рамках считывания (+0, +1 и +2) с использованием оригинальной (пользовательской) R-функции translate().

Реконструкция транскриптома клеток Kasumi-1 осуществлялась с помощью пакета StringTie [12]. Предварительно прочтения, полученные в ходе каждого повтора секвенирования РНК, картировались относительно эталонной сборки GRCh38.p7 генома человека с использованием алгоритма subunc из R-пакета Rsubread [13]. Полученные файлы формата BAM совместно с эталонными аннотациями, содержащимися в 85 вып. базы данных Ensembl, использовались в качестве входных данных непосредственно для сборщика. Фильтрация реконструированных полноразмерных РНК выполнялась с помощью оригинальной R-функции filtrateTrans(). Исходный код этой функции, а также другие R-коды, специально разработанные для целей настоящего исследования, находятся в свободном доступе в репозитории GitHub [14].

Для подтверждения экспрессии аминокислотных последовательностей, предсказываемых биоинформатически на основе транскриптомных данных, использовалась нейронная сеть DIA-NN [15]. В качестве протеомных данных выступили результаты масс-спектрометрического анализа (МС-анализа) трипсинолизованной белковой фракции клеток Kasumi-1 (с нокдауном гибридного онкогена *RUNX1::RUNX1T1* или без нокдауна, по 5 повторов на каждый вариант). Протеомные данные были получены на базе Института биологических наук при Ньюкаслском университете (г. Ньюкасл, Великобритания) с использованием масс-спектрометра Orbitrap Fusion Lumos Tribrid. Наряду с данными МС-анализа на вход нейронной сети DIA-NN также подавался файл FASTA, содержащий как результаты трансляции *in silico* RI, так и 105 681 последовательность известных на сегодняшний день белков человека, депонированных в базах данных UniProtKB/Swiss-Prot [16], Consensus CDS [17] и/или NCBI RefSeq [18].

Анализ полученных результатов осуществлялся в среде программирования R с помощью как оригинальных кодов собственной разработки, так и функционала пакетов, депонированных в хранилищах CRAN [19] либо Bioconductor [20].

Результаты и их обсуждение. Первый этап настоящего исследования был нацелен на идентификацию RI протяженностью не менее 50 нуклеотидов, присутствие которых в транскриптоме клеток Kasumi-1 подтверждается данными RNA-Seq. С помощью ранее разработанного нами подхода [8, 10] удалось идентифицировать 3540 RI, принадлежащих 2401 гену. Характер их распределения по классам генетических элементов, аннотированных в базе данных Ensembl, отражен на рис. 1, а.

Среди всех обнаруженных RI 1912 составили группу уже аннотированных в базе данных Ensembl сохраняющихся интронов. Причем 998 из них были ассоциированы с последним экзонном соответствующего гена, 498 – с первым экзоном, 387 – с внутренними экзонами и, наконец, 29 – с одноэкзонными транскриптами. Оставшиеся 1628 RI, согласно генным аннотациям, соответствовали каноническим интронам.

Идентификация RI, обладающих кодирующим потенциалом. Очевидно, что оценка кодирующего потенциала RI может иметь ряд особенностей. Во-первых, как это было подробно описано в наших более ранних работах [8, 10], зачастую RI представляют собой лишь уникальную нишу с чем не перекрывающуюся часть от всей последовательности интрона. Во-вторых, мы заранее

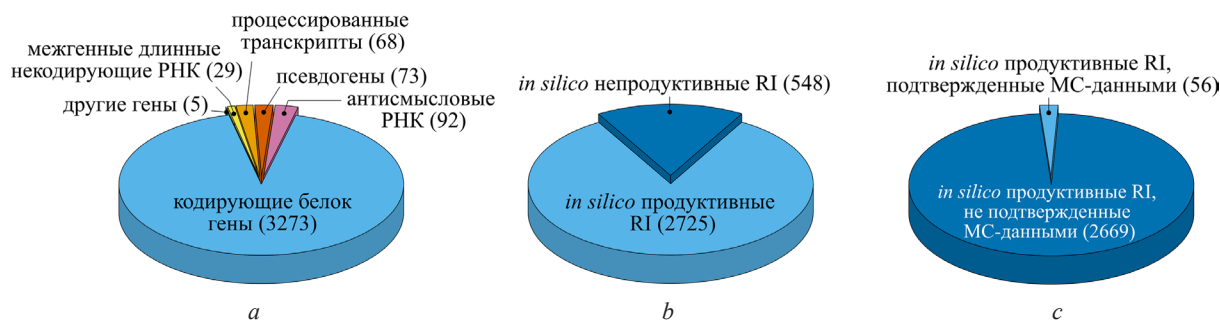


Рис. 1. Белок-кодирующий потенциал RI: *a* – принадлежность RI различным классам генетических элементов; *b* – результаты *in silico* оценки кодирующего потенциала RI, принадлежащих только генам, кодирующим белки; *c* – подтверждаемость МС-данными наличия кодирующего потенциала у *in silico* продуктивных RI

Fig. 1. Protein coding potential of RI: *a* – pie chart showing the assignment of RI to different classes of genetic elements; *b* – *in silico* assessment of the amino acid coding potential of RI from protein-coding genes only; *c* – MS data support the amino acid coding potential of only a minor fraction of RI

не знаем, какова структура транскрипта, несущего в себе тот или иной сохраненный интрон, и каково точное положение последнего в этом транскрипте. Наконец, работая только с RI, невозможно точно определить их локализацию в мРНК относительно стартового кодона. В связи с этим *in silico* трансляция нуклеотидных последовательностей RI проводилась в трех рамках считывания с помощью оригинальной R-функции `translate()`. Наряду с самой трансляцией эта функция позволила осуществить еще и фильтрацию получаемых аминокислотных последовательностей по длине. В настоящем исследовании для успешного прохождения отбора аминокислотные последовательности должны были иметь протяженность 20 аминокислотных остатков (а. о.) и более.

В результате первичной фильтрации из дальнейшего анализа было исключено 603 RI, 548 из которых принадлежали генам, кодирующим белки (рис. 1, *b*). Среди оставшихся 2937 RI 1558 могли быть транслированы *in silico* в более чем одной рамке считывания с образованием продукта длиной, равной или превышающей пороговое значение 20 а. о. В общей сложности на основе таких RI было получено 4705 аминокислотных последовательностей. В дальнейшем мы будем называть их экспериментальными полипептидами в том смысле, что они предсказаны биоинформатически на основе изучения RI, что их длина может быть как меньше, так и больше 50 а. о. и что осуществляется их экспериментальный поиск и обнаружение. Выявление среди них действительно экспрессирующихся в клетках Kasumi-1 проводилось с помощью нейронной сети DIA-NN. Она принимает на вход объединенный файл FASTA и осуществляет гидролиз *in silico* содержащихся в нем аминокислотных последовательностей по сайтам расщепления трипсином, а затем генерирует *in silico* библиотеку масс-спектров полученных пептидов длиной от 7 до 30 а. о. В последующем она используется для идентификации в МС-данных тех пептидов, которые могли бы быть получены в случае экспрессии в исследуемых клетках экспериментальных полипептидов.

Возвращаемые DIA-NN результаты обрабатывались с помощью оригинального R-кода `parseDIANNoutput()`, обеспечивающего фильтрацию детектированных МС-пептидов, спектры которых присутствуют в протеомных МС-данных, и экспериментальных полипептидов по нескольким параметрам. В настоящем исследовании достоверно идентифицированными считались те МС-пептиды, для которых такие показатели, как *q*-значение (*p*-значение, скорректированное по методу Беньямини – Хохберга), а также значение апостериорной вероятности случайного обнаружения оказывались не более 0,01. Кроме того, уровни их интенсивности должны были превышать нулевые значения как минимум в трех из пяти образцов одной группы (с нокдауном гибридного онкогена *RUNX1::RUNX1T1* либо без него). Фильтрация выявленных в клетках Kasumi-1 экспериментальных полипептидов (т. е. тех, чья экспрессия подтверждалась обнаруженными МС-пептидами) осуществлялась также по рассчитанным для них *q*-значениям с пороговым уровнем 0,01. В случае экспериментальных полипептидов, для которых не обнаруживались прототи-

пические МС-пептиды, рассматриваемому показателю автоматически присваивалась 1, и в дальнейшем анализ они не включались. Наконец, на завершающем этапе проводился отбор экспериментальных полипептидов в соответствии с количеством подтверждающих их МС-пептидов. Согласно литературным источникам на один белок должно приходиться по крайней мере два уникальных МС-пептида, чтобы считать его экспрессирующимся в изучаемом типе клеток [21, 22]. Однако в настоящей работе мы снизили этот порог до одного, так как изучаемые экспериментальные полипептиды, вероятнее всего, представляют собой лишь фрагменты полноразмерных белков. В частности, это заметно по распределению их длин (рис. 2, а), значительно смещенному влево в сравнении с распределением длин известных на сегодняшний день белков человека.

В целом из всех RI, обнаруженных нами в транскриптоме клеток Kasumi-1, кодирующими оказались лишь 56 (рис. 1, с), причем все они уже были описаны ранее в базе данных Ensembl именно как RI, но без указаний на их кодирующий потенциал. А вот новые (не аннотированные ранее) RI, также идентифицированные нами в транскриптоме клеток Kasumi-1, не являются кодирующими. То, что большинство RI оказались не кодирующими, по-видимому, может иметь несколько объяснений. Одно из объяснений, на наш взгляд, является тривиальным – недостаточная чувствительность использованного метода протеомного анализа. Так, те RI, для которых мы не обнаружили экспериментальных полипептидов, экспрессируются статистически значимо ниже ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 5,0 \times 10^{-12}$), чем кодирующие RI (рис. 2, б). Такую же закономерность мы увидели и в случае с не кодирующими и кодирующими экзонами тех же генов, у которых были обнаружены RI ($p_{\text{Mann-Whitney}} < 2,2 \times 10^{-16}$) (рис. 2, б). При этом пусть и не всегда, но все же прослеживается взаимосвязь между уровнями экспрессии мРНК и соответствующего белка. Так что как минимум часть из тех RI, которых мы отнесли к не кодирующим, может оказаться в конечном итоге кодирующими, если повысится чувствительность методов массовой детекции белков.

Ожидается, что идентифицированные нами кодирующие RI принадлежат мультиэкзонным белковым генам и ассоциированы с первыми, последними или внутренними экзонами транскриптов (11, 33 и 12 RI из 56 соответственно). Интересно отметить, что онтологический анализ [23] полного списка таких генов выявил статистически значимые обогащения по генам, которые кодируют белки ядра и ядерных телец, в том числе ответственных за сплайсинг РНК (см. таблицу).

Идентификация RI, кодирующих новые экспериментальные полипептиды. На данном этапе исследования нерешенным оставался вопрос относительно того, принадлежат обнаруженные нами экспериментальные полипептиды к уже известным белкам или же являются неизвестными белковыми продуктами генов. Чтобы ответить на этот вопрос, мы разработали многоэтапный

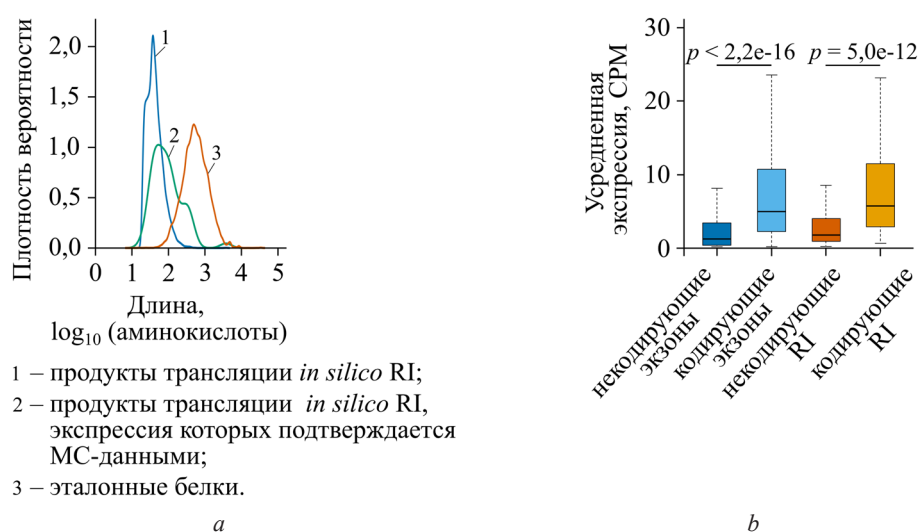


Рис. 2. Распределение длин экспериментальных полипептидов, кодируемых RI (а), а также уровни экспрессии не кодирующих и кодирующих RI (б), обнаруженных в транскриптоме клеток Kasumi-1

Fig. 2. Length distribution of experimental polypeptides encoded by RI (а) and abundance of non-coding as well as coding RI in the transcriptome of Kasumi-1 cells (б)

**Классификация генов, в зрелых молекулах РНК которых были обнаружены кодирующие RI,
в соответствии с генными онтологиями**

Gene ontology classification of genes harboring protein-coding RI

Термин геной онтологіі	Кратность обогащения	Скорректированное <i>p</i> -значение
Рибонуклеопротеиновая гранула (ribonucleoprotein granule)	8,28	1,66E-02
Ядерный спекл (nuclear speckle)	6,33	2,02E-02
Ядерное тельце (nuclear body)	4,49	1,38E-02
Нуклеоплазма (nucleoplasm)	2,62	1,63E-04
Перинуклеарное пространство (nuclear lumen)	2,40	5,55E-04
Просвет внутриклеточной органеллы (intracellular organelle lumen)	1,98	8,46E-03
Просвет органеллы (organelle lumen)	1,98	1,02E-02
Межмембранное пространство (membrane-enclosed lumen)	1,98	7,25E-03
Ядро (nucleus)	1,86	1,24E-03
Внутриклеточная мембранная органелла (intracellular membrane-bounded organelle)	1,47	3,49E-03
Внутриклеточная органелла (intracellular organelle)	1,38	1,38E-02
Мембранная органелла (membrane-bounded organelle)	1,35	3,24E-02

биоинформатический конвейер, исходно требующий наличия двух наборов данных: сиквенсов экспериментальных полипептидов и аминокислотных последовательностей эталонных белков человека. В настоящей работе в качестве последних выступили белки, депонированные в таких базах данных, как UniProtKB/Swiss-Prot, Consensus CDS и NCBI RefSeq.

Последовательности каждого набора разбивались на *k*-меры длиной 8 а. о., и проводилось вычитание *k*-меров эталонных белков из *k*-меров экспериментальных полипептидов. Описанная процедура позволила отобрать только те *k*-меры экспериментальных полипептидов, которые были специфичными для лейкозных клеток. Далее такие *k*-меры собирались обратно в континги (непрерывные фрагменты экспериментальных полипептидов, специфичные для лейкозных клеток). Идентифицированные таким образом специфические фрагменты полипептидов (а также МС-пептиды, подтверждающие их экспрессию в клетках Kasumi-1) дополнительно выравнивались относительно всех известных на сегодняшний момент белков человека с помощью blastp [24]. Данная процедура позволила нам разделить 56 экспериментальных полипептидов, кодируемых RI, на два класса:

1. Принадлежащие эталонным белкам либо идентичные аминокислотным последовательностям неохарактеризованных или плохо охарактеризованных белков из базы данных blastp.
2. Имеющие идентичность менее 100 % по отношению к любым известным белкам человека и, таким образом, являющиеся новыми.

В итоге полипептидов первого класса оказалось 53, второго – 3, кодируемых генами *UBE2M*, *OGT* и *SLC10A3*. Продуктом экспрессии гена *UBE2M* является E2-убиквитин-конъюгирующий белок, способный вносить свой вклад в поддержание клеточного гомеостаза путем обеспечения нормального протекания недиляции – одного из типов пост-трансляционной модификации белков [25]. Ген *OGT* кодирует гликозилтрансферазу, которая осуществляет перенос N-ацетилглюкозамина от уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамина к остаткам серина/треонина белков-мишеней, обеспечивая тем самым регуляцию ряда биологических процессов [26]. Ген *SLC10A3* входит в семейство генов, кодирующих белки-транспортеры [27].

Очевидно, что идентификация новых полипептидов – это наиболее значимая часть настоящей работы. Вместе с тем не исключено, что выявленные полипептиды являются частью протеома лишь клеток Kasumi-1 (как артефакт этой клеточной линии), но не клеток ОМЛ вообще. К сожалению, протеомные данные надлежащего качества по первичным клеткам ОМЛ, которые позволили бы напрямую провести поиск детектированных новых пептидов в клетках пациентов, отсутствуют в публичных базах данных. Поэтому мы пошли другим путем и воспользовались

транскриптомными данными для первичных лейкозных и нормальных клеток крови человека как источником косвенной информации о распространенности обнаруженного феномена.

Мы провели расширенный анализ опубликованного нами ранее набора данных транскриптомного секвенирования первичных клеток ОМЛ с транслокацией $t(8;21)(q22;q22)$, с инверсией $inv(16)$, с нормальным кариотипом и перестройками гена *MLL*, а также нормальных $CD34^+$ клеток из красного костного мозга, периферической и пуповинной крови здоровых доноров (по 20 образцов для каждого типа клеток) [8]. Предварительно прошедшие стандартную процедуру предпроцессинга прочтения картировались с помощью алгоритма *subjunc* относительно референсной сборки GRCh38.p7 генома человека. Полученные на выходе BED-файлы содержали информацию обо всех идентифицированных экзон-экзонных стыках (от англ. *exon-exon junctions*, EEJ) и их покрытии ридами. Эти данные были использованы для определения отношения уровня экспрессии EEJ, образующихся при удалении RI из изучаемых РНК и последующем воссоединении фланкирующих их экзонов, к уровню экспрессии одного из конститутивных EEJ соответствующего транскрипта. Предполагалось, что использование конститутивных EEJ, т. е. присутствующих в большинстве изоформ РНК отдельного гена, позволит оценить представленность полностью сплайсированных молекул в общем пуле транскриптов, принадлежащих целевым генам.

Результаты анализа, показанные на рис. 3, оказались сопоставимы с таковыми, полученными для клеток Kasumi-1. На этом рисунке EEJ, экспрессия которых сравнивалась между собой, обозначены буквой J и пронумерованы: первым указано альтернативное, а вторым – конститутивное событие (обоснование выбора конкретных EEJ для сравнения приведено в следующем разделе). Заслуживает внимания закономерность, прослеживающаяся как в случае клеток модельной линии, так и в случае первичных клеток ОМЛ и нормальных $CD34^+$ клеток: полное сплайсирование транскриптов исследуемых генов представляет собой редкое событие. По-видимому, основной вклад в пул РНК продуктов изучаемых генов вносят молекулы с RI. Причем это характерно как для лейкозных, так и для нормальных клеток крови человека. Однако можно отметить заметное выделение на общем фоне данных, полученных в отношении транскриптов гена *OGT* в нормальных $CD34^+$ клетках из красного костного мозга. В данном случае наблюдается относительно более высокая представленность РНК, не несущих RI.

Общий эффект кодирующих RI на структуру молекул мРНК и соответствующих белков. Кодировкой только новых полипептидов, очевидно, не исчерпывается влияние кодирующих RI на структуру молекул мРНК и соответствующих белков. Интерес представляет также вклад в общее разнообразие белков лейкозных клеток тех кодирующих RI, полипептиды которых уже известны и присутствуют в белковых базах данных. Для выяснения этого вопроса была проведена

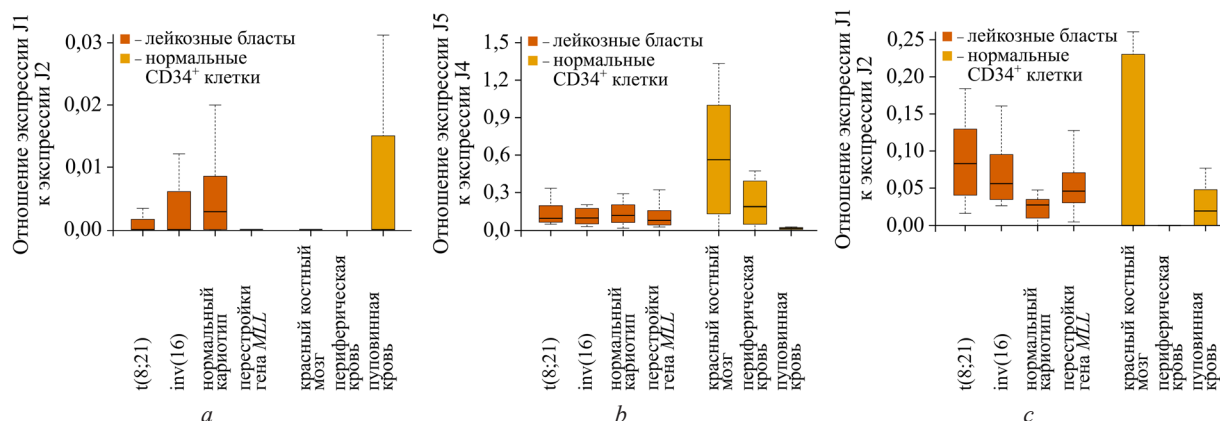


Рис. 3. Уровень экспрессии EEJ, свидетельствующих об удалении RI из транскриптов генов *UBE2M* (a), *OGT* (b) и *SLC10A3* (c), по отношению к уровню экспрессии соответствующих конститутивных EEJ в транскриптоме различных типов лейкозных и нормальных $CD34^+$ клеток крови человека

Fig. 3. Expression ratio between EEJ that supports RI splicing out and constitutive EEJ of *UBE2M* (a), *OGT* (b), *SLC10A3* (c) genes in the transcriptome of different types of human primary leukemia blasts or normal $CD34^+$ cells

реконструкция транскриптома клеток Kasumi-1 с помощью сборщика StringTie. После сборки осуществлялся поиск mORF в полноразмерных РНК и их трансляция *in silico* с помощью функционала R/Bioconductor пакета ORFhunter [28]. Далее определялось, на какую именно часть белка и каким именно образом оказывает влияние тот или иной кодирующий сохраненный интрон.

Анализ структуры молекул РНК, несущих кодирующие RI, показал, что сохраненные интроны могут быть разделены на 4 класса в зависимости от их локализации в пределах транскрипта и, как следствие, предполагаемого эффекта, оказываемого на структуру соответствующих белков: 1) RI, целиком локализованные в пределах 5'-нетранслируемой области транскрипта (от англ. untranslated region, UTR); 2) RI, затрагивающие как 5'-UTR, так и 5'-конец mORF; 3) RI, расположенные во внутренней части mORF; 4) RI, охватывающие и 3'-конец mORF, и 3'-UTR.

Примечательно, что интронами, расположенными в 5'-UTR (всего 3 RI), стали именно те, которые в предыдущем разделе были описаны нами как RI, кодирующие новые полипептидные последовательности. С целью определить, каким образом такие RI, находясь вне границ mORF, могут быть транслированы, нами был выполнен поиск в целевых транскриптах всех возможных ORF с использованием инструмента ORFfinder [29]. Идея базировалась на литературных данных, согласно которым в пределах одного транскрипта возможно существование нескольких ORF: главной и так называемых малых ORF (от англ. small open reading frames, smORF). Причем результаты последних исследований показывают, что триплет ATG выступает в качестве стартового кодона лишь у половины известных smORF [30]. По этой причине при решении описываемой задачи в качестве стартовых наряду с ATG рассматривались также альтернативные кодоны.

У гена *SLC10A3* сохранение интрона, расположенного между 1-м и 2-м экзонами, приводит к модификации структуры его 5'-UTR (рис. 4, а) и появлению smORF, кодирующей новый микробелок размером 109 а. о. (рис. 5, а), экспрессия которого подтверждается МС-данными. В случае гена *OGT* сохраняемый интрон располагается в кодирующей области и определяет инициацию процесса синтеза белка OGT с альтернативного нижележащего стартового кодона (рис. 4, б). Это, в свою очередь, обуславливает образование новой усеченной по N-концу изоформы данного белка. Кроме того, в пределах непосредственно интронной последовательности локализуется smORF, кодирующая новый микробелок размером 58 а. о. (рис. 5, б), экспрессия которого также подтверждается нашими МС-данными. Оба микробелка, согласно результатам моделирования, проведенного с помощью Conserved Domain Search и InterProScan [31, 32], содержат участки неупорядоченной структуры неизвестной функциональности. Наконец, в случае гена *UBE2M* сохранение интрона в мРНК приводит к N-удлинению полноразмерного белка на 115 а. о., причем данная белковая изоформа возникает благодаря инициации трансляции с альтернативного стартового кодона CTG внутри экзонной последовательности, предшествующей сохраняемому интрону (рис. 4, в). Опять же, эта новая изоформа белка UBE2M в пределах 115-аминокислотной N-концевой добавки содержит участок неупорядоченной структуры неизвестной функциональности (рис. 5, в).

Последовательности RI 2-го класса (всего 2 RI) содержат стартовый кодон трансляции и определяют N-конец белков. Гены, которым принадлежат такие RI, – *LMNB1* и *MOGS*. Первый кодирует ламин B1 – один из ламинов B-типа, вовлеченных в регуляцию организации хроматина, репликации и репарации ДНК, клеточного цикла, пролиферации и старения клеток [33]. Конечным продуктом экспрессии гена *MOGS* является фермент маннозил-олигосахарид глюкозидаза, необходимый для нормального протекания N-гликозилирования белков [34].

RI, вошедшие в класс интронов, локализованных в пределах mORF (всего 38 RI), обеспечивают синтез соответствующих внутренних фрагментов белков. Подобные кодирующие RI были обнаружены в РНК-продуктах, например, таких генов, как *BCLAF1* и *HNRNPL*. Исходно рассматриваемый только в роли регулятора транскрипции и клеточного апоптоза, BCLAF1 на сегодняшний день известен как белок, принимающий участие в широком спектре клеточных процессов, в том числе в процессинге и сплайсинге молекул пре-мРНК [35]. Продукт экспрессии *HNRNPL* – один из представителей белков класса гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов, способный влиять на протекание ряда биологических процессов, в частности на репарацию ДНК, альтернативный сплайсинг РНК, трансляцию и сигнальную трансдукцию [36].

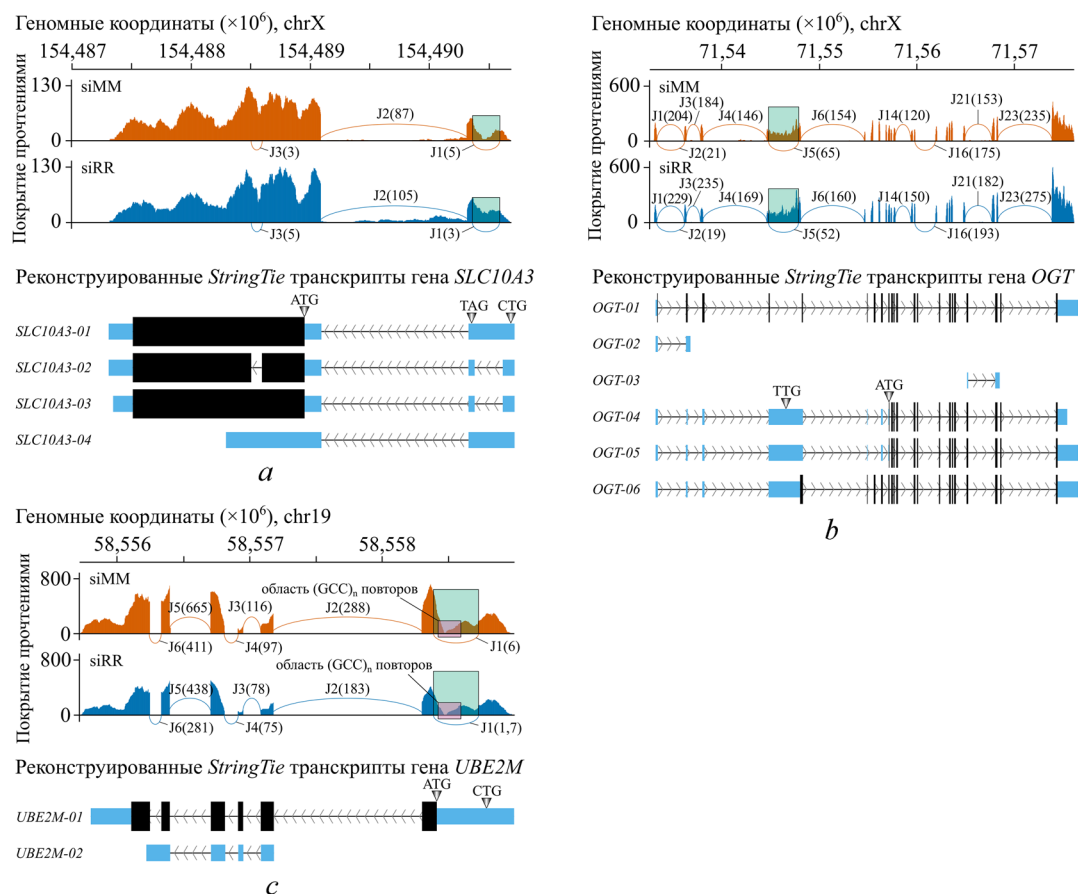


Рис. 4. Графы сплайсинга и структура реконструированных StringTie транскриптов генов *SLC10A3* (a), *OGT* (b) и *UBE2M* (c). Графы сплайсинга построены на основе данных секвенирования транскриптома клеток линии Kasumi-1 с нокдауном гибридного онкогена *RUNX1::RUNX1T1* и без него. Экзон-экзонные стыки отмечены латинской буквой J и пронумерованы. В скобках указано количество прочтений, подтверждающих конкретное сплайсинговое событие. Области сохранения интронов ограничены рамками

Fig. 4. Splicing graphs and StringTie-assembled transcripts of *SLC10A3* (a), *OGT* (b) and *UBE2M* (c) genes. Splicing graphs are based on total RNA-Seq data from *RUNX1::RUNX1T1* knockdown and control Kasumi-1 cells. Exon-exon junctions are labeled with the letter J and numbered. The number of reads supporting each splicing event is indicated in parentheses. Regions of retained introns are boxed

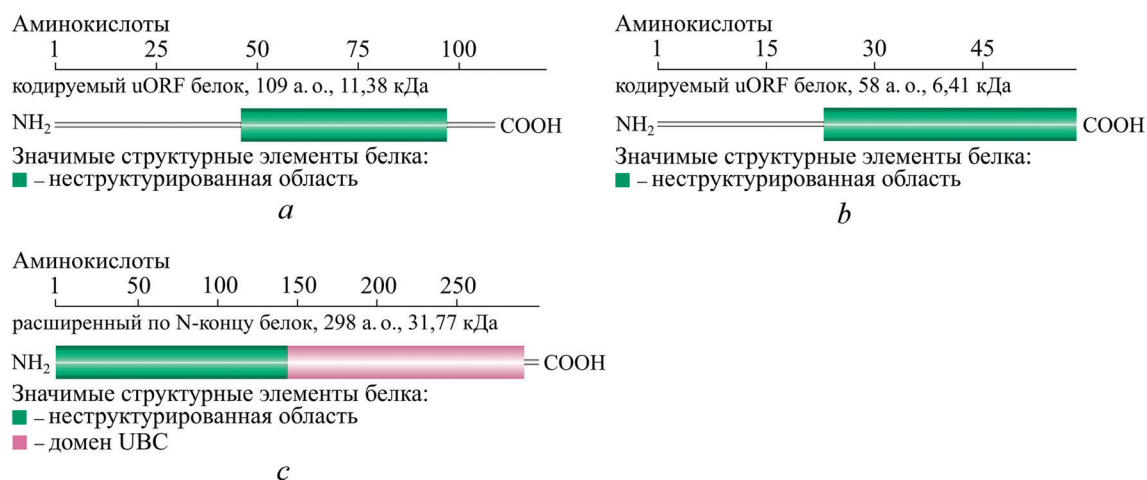


Рис. 5. Структура *in silico* транслированных ранее неизвестных белков, кодируемых генами *SLC10A3* (a), *OGT* (b) и *UBE2M* (c)

Fig. 5. *In silico* predicted structure of previously unknown proteins encoded by *SLC10A3* (a), *OGT* (b) and *UBE2M* (c) genes

RI, отнесенные к 4-му классу (всего 13 RI) несут стоп-кодон трансляции и детерминируют аминокислотную последовательность С-концевых участков белков. Среди RI указанного класса обнаружены, например, принадлежащие генам *NKRF* и *SH3BP1*. Ген *NKRF* кодирует ингибитор транскрипционного фактора NF- κ B, регулирующего экспрессию генов, чьи белковые продукты вовлечены в процессы воспаления, иммунного ответа, клеточной пролиферации и апоптоза [37]. Ген *SH3BP1* кодирует один из белков-регуляторов сигнального пути Ras [38]. Как видно, во всех этих случаях речь идет о генах, критически важных для жизни клеток.

Общий эффект некодирующих RI на структуру молекул мРНК и соответствующих белков. Количество RI, у которых в данном исследовании не было выявлено кодирующего потенциала, составило 3484 (или 98,4 % от общего списка идентифицированных RI). Из них 2239 могут быть локализованы в областях ORF белковых генов, описанных в базе данных Ensembl. Следовательно, такие RI могут влиять не только на структуру мРНК, но и на аминокислотную последовательность соответствующих белков.

Анализ полноразмерных РНК, содержащих некодирующие RI, выявил три потенциальных механизма влияния сохранения интронов на кодирующий потенциал таких молекул. Во-первых, при включении интрона в область ORF молекула мРНК может сохранять способность быть транслированной, но с использованием альтернативного нижележащего стартового кодона. Более подробно в качестве примера может быть рассмотрен ген *RASSF4* и его РНК/белковые продукты (рис. 6, а). Вследствие сохранения в транскриптах этого гена всей интронной последовательности, локализованной между экзонами 2 и 3, может образовываться усеченный по N-концу белок как результат использования нижележащего альтернативного стартового кодона. Косвенным подтверждением правомочности такого предположения служат протеомные МС-данные для клеток Kasumi-1, которые содержат МС-пептиды только части белка RASSF4, кодируемой экзонами гена, расположенными за сохраняемым интроном. Известно, что полноразмерный белковый продукт гена *RASSF4* является участником ряда сигнальных путей и функционирует в роли опухолевого

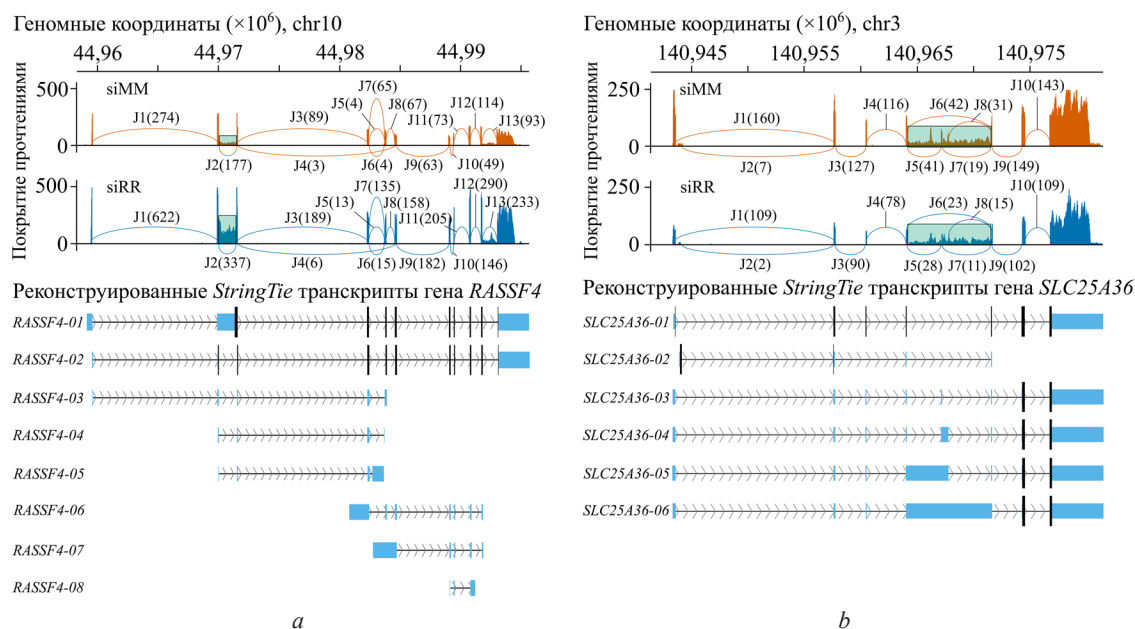


Рис. 6. Графы сплайсинга и структура реконструированных с помощью StringTie транскриптов генов *RASSF4* (а) и *SLC25A36* (b). Графы сплайсинга построены на основе данных секвенирования транскриптома клеток линии Kasumi-1 с нокдауном гибридного онкогена *RUNX1::RUNX1T1* и без него. Экзон-экзонные стыки отмечены латинской буквой J и пронумерованы. В скобках указано количество прочтений, подтверждающих конкретное сплайсинговое событие. Область сохранения интрона ограничена рамкой

Fig. 6. Splicing graphs and StringTie assembled transcripts of *RASSF4* (a) and *SLC25A36* (b) genes. Splicing graphs are based on total RNA-Seq data from *RUNX1::RUNX1T1* knockdown and control Kasumi-1 cells. Exon-exon junctions are designated by the letter J and numbered. The number of reads supporting each splicing event is indicated in parentheses. Region of retained intron is boxed

супрессора [39]. А вот какую роль может играть его N-усеченная изоформа, предстоит выяснить в будущем.

Второй механизм – фактически полная потеря кодирующего потенциала РНК-продуктов белкового гена из-за включения интрона. Примером является ген *SLC25A36* и его РНК/белковые продукты (рис. 6, *b*). Он кодирует митохондриальный транспортер пиримидиновых нуклеотидов, локализующийся во внутренней мембране митохондрий и обеспечивающий поддержание стабильности ДНК этих органелл и регуляцию мембранного потенциала [40]. В клетках Kasumi-1 мажорная фракция РНК-продуктов данного гена представлена молекулами, в ходе сплайсирования которых происходит сохранение интрона (целиком или фрагментарно), фланкированного экзонами 4 и 5. Воспользовавшись ассемблером StringTie мы провели реконструкцию полноразмерных транскриптов гена *SLC25A36* и идентифицировали в них mORF. Наше биоинформатическое моделирование показывает, что транскрипты, содержащие вышеупомянутый интрон, если и могут транслироваться, то только в короткие микробелки с нижележащего кодона ATG. Однако МС-данные не подтверждают экспрессии в клетках Kasumi-1 каких-либо белков гена *SLC25A36*, несмотря на высокую продукцию этим геном молекул РНК. Это, а также тот факт, что подобного рода микробелки характеризовались бы малой протяженностью и, по-видимому, не были бы способны нормально функционировать, свидетельствует в пользу обусловленной сохранением интрона утраты транскриптами гена *SLC25A36* кодирующего потенциала.

Наконец, возможен и третий механизм – появление РТС в молекулах РНК, несущих RI. Так, сборщик StringTie реконструировал 233 белок-кодирующих транскрипта, содержащих РТС и несущих в областях mORF RI (всего 175 RI), классифицированные как некодирующие. Очевидно, что транскрипты с РТС могут быть потенциальными мишенями для компонентов системы NMD. И даже если они транслируются, то из-за собственного невысокого присутствия в клетках (вследствие действия системы NMD) они не могут произвести такое количество белка, которого было бы достаточно для детекции с помощью использованной протеомной технологии.

Закключение. Таким образом, разработанный нами комбинированный подход, где использовались транскриптомные и протеомные данные, а также многошаговый биоинформатический конвейер для анализа таких данных, позволил провести углубленное изучение эффекта сохранения интронов на кодирующий потенциал РНК-продуктов белковых генов в модельных клетках ОМЛ человека. Полученные нами результаты позволяют разделить весь пул RI белковых генов на кодирующие и некодирующие. При этом на кодирующий потенциал РНК могут влиять представители обоих классов: кодирующие RI действуют напрямую, а некодирующие RI влияют опосредованно, через изменение структуры молекул РНК.

Вместе с тем результаты нашего исследования порождают и ряд новых вопросов:

каким образом обусловленное сохранением интрона усечение белка либо же приобретение им нового аминокислотного фрагмента отражается на его пространственной укладке, свойствах и функциональной активности вплоть до изменения фенотипа клетки;

обладают ли обнаруженные нами новые белки иммуногенностью и могут ли они рассматриваться как мишени для терапии лейкозов.

Эти и некоторые другие вопросы могут стать предметом дальнейших исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы признательны доктору Хосе Марин-Рубио из Института биологических наук при Ньюкаслском университете (г. Ньюкасл, Великобритания), а также профессору Олафу Хайденрайху из Центра детской онкологии имени Принцессы Максими (г. Утрехт, Нидерланды) за помощь в получении оригинальных протеомных данных для клеток Kasumi-1. Эта работа стала частью проектов «Разработка комплексного подхода по идентификации новых, зависящих от дифференциального сплайсинга, иммуногенных пептидов лейкозных клеток», выполняемого при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных

Acknowledgements. The authors thank Dr. Jose Luis Marin-Rubio (Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom) as well as Professor Olaf Heidenreich (Princess Maxima Center for Pediatric Oncology, Utrecht, The Netherlands) for assistance in obtaining the original proteomic data for Kasumi-1 cells. The research was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research as part of the project “Development of a comprehensive approach to identify new differential splicing-dependent immunogenic peptides of leukemia cells” (grant No. M23-056, reg. No. 20231102). The described results were also obtained

исследований (грант № M23-056, № гос. регистрации 20231102), и «Разработка моделей, алгоритмов и программных средств для идентификации и аннотации сайтов генетического полиморфизма по данным геномного секвенирования», выполняемого в рамках подпрограммы «Междисциплинарные исследования и новые зарождающиеся технологии» ГПНИ «Конвергенция–2025» на 2021–2025 гг. (проект № 3.04.3.1, № гос. регистрации 20211918).

within the framework of the project “Development of models, algorithms and software for identification and annotation of genetic polymorphism sites based on genomic sequencing data” (State Program of Scientific Research “Convergence–2025”, Subprogram “Interdisciplinary research and new emerging technologies” (project No. 3.04.3.1, reg. No. 20211918).

Список использованных источников

1. The status of the human gene catalogue / P. Amaral, S. Carbonell-Sala, F. M. De La Vega [et al.] // *Nature*. – 2023. – Vol. 622, N 7981. – P. 41–47. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06490-x>
2. Ramanouskaya, T. V. The determinants of alternative RNA splicing in human cells / T. V. Ramanouskaya, V. V. Grinev // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2017. – Vol. 292, N 6. – P. 1175–1195. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1350-0>
3. Liu, Q. Alternative splicing and isoforms: from mechanisms to diseases / Q. Liu, L. Fang, C. Wu // *Genes*. – 2022. – Vol. 13, N 3. – Art. 401. <https://doi.org/10.3390/genes13030401>
4. Intron retention as a mode for RNA-Seq data analysis / J.-T. Zheng, C.-X. Lin, Z.-Y. Fang, H.-D. Li // *Frontiers in Genetics*. – 2020. – Vol. 11. – Art. 586. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00586>
5. Decoding of exon splicing patterns in the human RUNX1–RUNX1T1 fusion gene / V. V. Grinev, A. A. Migas, A. D. Kirsanova [et al.] // *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2015. – Vol. 68. – P. 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.08.017>
6. Differential fates of introns in gene expression due to global alternative splicing / A. Kumari, S. Sedehizadeh, J. D. Brook [et al.] // *Human Genetics*. – 2021. – Vol. 141. – P. 31–47. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02409-6>
7. Holding on to junk bonds: intron retention in cancer and therapy / G. Monteuiis, U. Schmitz, V. Petrova [et al.] // *Cancer Research*. – 2021. – Vol. 81, N 4. – P. 779–789. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-20-1943>
8. RUNX1/RUNX1T1 mediates alternative splicing and reorganises the transcriptional landscape in leukemia / V. V. Grinev, F. Barneh, I. M. Ilyushonak [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 520. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20848-z>
9. The European Nucleotide Archive in 2022 / J. Burgin, A. Ahamed, C. Cummins [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51, N D1. – P. D121–D125. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1051>
10. Гринев, В. В. Сохранение интронов в транскриптом лейкозных и нормальных клеток крови человека / В. В. Гринев // *Молекулярная и прикладная генетика*. – 2018. – Т. 25. – С. 44–55.
11. Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. – URL: <https://bioconductor.org/packages/Biostrings> (date of access: 12.09.2024).
12. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads / M. Pertea, G. M. Pertea, C. M. Antonescu [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2015. – Vol. 33. – P. 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
13. Liao, Y. The R package *Rsubread* is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads / Y. Liao, G. K. Smyth, W. Shi // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47, N 8. – P. e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
14. GitHub. – URL: <https://github.com/VGrinev/TranscriptomicFeatures> (date of access: 12.09.2024).
15. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput / V. Demichev, Ch. B. Messner, S. I. Vernardis [et al.] // *Nature Methods*. – 2020. – Vol. 17. – P. 41–44. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>
16. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023 / The UniProt Consortium // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51, N D1. – P. D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
17. Consensus coding sequence (CCDS) database: a standardized set of human and mouse protein-coding regions supported by expert curation / Sh. Pujar, N. A. O’Leary, C. M. Farrell [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46, iss. D1. – P. D221–D228. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1031>
18. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation / N. A. O’Leary, M. W. Wright, J. R. Brister [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, N D1. – P. D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
19. The comprehensive R archive network. – URL: <https://cran.r-project.org/> (date of access: 12.09.2024).
20. Bioconductor: Open source software for Bioinformatics. – URL: <https://www.bioconductor.org/> (date of access: 12.09.2024).
21. The Need for Guidelines in Publication of Peptide and Protein Identification Data / S. Carr, R. Aebersold, M. Baldwin [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2004. – Vol. 3, N 6. – P. 531–533. <https://doi.org/10.1074/mcp.t400006-mcp200>
22. A Practical Guide to Small Protein Discovery and Characterization Using Mass Spectrometry / Ch. H. Ahrens, J. T. Wade, M. M. Champion, J. D. Langer // *Journal of Bacteriology*. – 2022. – Vol. 204, N 1. – Art. 00353. <https://doi.org/10.1128/jb.00353-21>
23. The Gene Ontology knowledgebase in 2023 / The Gene Ontology Consortium, S. A. Aleksander, J. Balhoff [et al.] // *Genetics*. – 2023. – Vol. 224, N 11. – Art. 31. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
24. BLAST. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (date of access: 12.09.2024).
25. Protein neddylation and its role in health and diseases / Sh. Zhang, Q. Yu, Zh. Li [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2024. – Vol. 9. – Art. 85. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01800-9>
26. OGT as potential novel target: Structure, function and inhibitors / N. Zhang, H. Jiang, K. Zhang [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – Vol. 357. – Art. 109886. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109886>
27. Claro da Silva T. The solute carrier family 10 (SLC10): Beyond bile acid transport / T. Claro da Silva, J. E. Polli, P. W. Swaan // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2013. – Vol. 34, N 2–3. – P. 252–269. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.004>

28. ORFhunter: An accurate approach to the automatic identification and annotation of open reading frames in human mRNA molecules / V. V. Grinev, M. M. Yatskou, V. V. Skakun [et al.] // *Software Impacts*. – 2022. – Vol. 12. – Art. 100268. <https://doi.org/10.1016/j.simpa.2022.100268>
29. Open Reading Frame Finder. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (date of access: 12.09.2024).
30. A high-resolution map of human RNA translation / S. P. Chothani, E. Adami, A. A. Widjaja [et al.] // *Molecular Cell*. – 2022. – Vol. 82, N 15. – P. 2885–2899. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.023>
31. The conserved domain database in 2023 / J. Wang, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51, N D1. – P. D384–D388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>
32. InterPro in 2022 / T. Paysan-Lafosse, M. Blum, S. Chuguransky [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51, N D1. – P. D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
33. The wide and growing range of lamin B-related diseases: from laminopathies to cancer / C. Evangelisti, I. Rusciano, S. Mongiorgi [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2022. – Vol. 79. – Art. 126. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04084-2>
34. Congenital disorders of glycosylation type IIb with MOGS mutations cause early infantile epileptic encephalopathy, dysmorphic features, and hepatic dysfunction / R. Anzai, M. Tsuji, S. Yamashita [et al.] // *Brain and Development*. – 2021. – Vol. 43, N 3. – P. 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.10.013>
35. Function of BCLAF1 in human disease (Review) / Z. Yu, J. Zhu, H. Wang [et al.] // *Oncology Letters*. – 2022. – Vol. 23, N 2. – Art. 58. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13176>
36. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPL) in cancer / J. Gu, Zh. Chen, X. Chen, Zh. Wang // *Clinica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 507. – P. 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.040>
37. Human NF- κ B repressing factor acts as a stress-regulated switch for ribosomal RNA processing and nucleolar homeostasis surveillance / M. Coccia, A. Rossi, A. Riccio [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114, N 5. – P. 1045–1050. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616112114>
38. SH3BP1, an Exocyst-Associated RhoGAP, Inactivates Rac1 at the Front to Drive Cell Motility / M. C. Parrini, A. Sadou-Dubourgnoux, K. Aoki [et al.] // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 42, N 5. – P. 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.032>
39. The role and function of Ras-association domain family in cancer: A review / M. R. Zinatizadeh, S. A. Momeni, P. K. Zarandi [et al.] // *Genes and Diseases*. – 2019. – Vol. 6, N 4. – P. 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.008>
40. The human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters / M. A. Di Noia, S. Todisco, A. Cirigliano [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, N 48. – P. 33137–33148. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.610808>

References

1. Amaral P., Carbonell-Sala S., De La Vega F. M., Faial T., Frankish A., Gingeras T. [et al.]. The status of the human gene catalogue. *Nature*, 2023, vol. 622, no. 7981, pp. 41–47. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06490-x>
2. Ramanouskaya T. V., Grinev V. V. The determinants of alternative RNA splicing in human cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 2017, vol. 292, no. 6, pp. 1175–1195. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1350-0>
3. Liu Q., Fang L., Wu C. Alternative splicing and isoforms: from mechanisms to diseases. *Genes*, 2022, vol. 13, no. 3, art. 401. <https://doi.org/10.3390/genes13030401>
4. Zheng J.-T., Lin C.-X., Fang Z.-Y., Li H.-D. Intron retention as a mode for RNA-Seq data analysis. *Frontiers in Genetics*, 2020, vol. 11, art. 586. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00586>
5. Grinev V. V., Migas A. A., Kirsanova A. D., Mishkova O. A., Siomava N., Ramanouskaya T. V., Vaitsiankova A. V., Ilyushonak I. M., Nazarov P. V., Vallar L., Aleinikova O. V. Decoding of exon splicing patterns in the human RUNX1–RUNXIT1 fusion gene. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2015, vol. 68, pp. 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.08.017>
6. Kumari A., Sedehizadeh S., Brook J. D., Kozlowski P., Wojciechowska M. Differential fates of introns in gene expression due to global alternative splicing. *Human Genetics*, 2021, vol. 141, pp. 31–47. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02409-6>
7. Monteuuis G., Schmitz U., Petrova V., Kearney P. S., Rasko J. E. J. Holding on to junk bonds: intron retention in cancer and therapy. *Cancer Research*, 2021, vol. 81, no. 4, pp. 779–789. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-20-1943>
8. Grinev V. V., Barnef F., Ilyushonak I. M., Nakjang S., Smink J., van Oort A. [et al.]. RUNX1/RUNXIT1 mediates alternative splicing and reorganizes the transcriptional landscape in leukemia. *Nature Communications*, 2021, vol. 12, art. 520. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20848-z>
9. Burgin J., Ahamed A., Cummins C., Devraj R., Gueye K., Gupta D., Gupta V. [et al.]. The European Nucleotide Archive in 2022. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, no. D1, pp. D121–D125. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1051>
10. Grinev V. V. Intron retention in the transcriptome of leukemic and normal human blood cells. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and Applied Genetics], 2018, vol. 25, pp. 45–56 (in Russian).
11. *Biostrings: Efficient manipulation of biological strings*. Available at: <https://bioconductor.org/packages/Biostrings> (accessed 12.09.2024).
12. Pertea M., Pertea G. M., Antonescu C. M., Chang T.-Ch., Mendell J. T., Salzberg S. L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 2015, vol. 33, pp. 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
13. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. The R package *Rsubread* is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, 2019, vol. 47, no. 8, p. e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
14. *GitHub*. Available at: <https://github.com/VGrinev/TranscriptomicFeatures/> (accessed 12.09.2024).
15. Demichev V., Messner Ch. B., Vernardis S. I., Lilley K. S., Ralser M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nature Methods*, 2020, vol. 17, pp. 41–44. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>
16. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, no. D1, pp. D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>

17. Pujar Sh., O'Leary N. A., Farrell C. M., Loveland J. E., Mudge J. M., Wallin C., Girón C. G. [et al.]. Consensus coding sequence (CCDS) database: a standardized set of human and mouse protein-coding regions supported by expert curation. *Nucleic Acids Research*, 2018, vol. 46, no. D1, pp. D221–D228. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1031>
18. O'Leary N. A., Wright M. W., Brister J. R., Ciufio S., Haddad D., McVeigh R., Rajput B. [et al.]. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol. 44, no. D1, pp. D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
19. *The comprehensive R archive network*. Available at: <https://cran.r-project.org/> (accessed 12.09.2024).
20. *Bioconductor: Open source software for Biobinformatics*. Available at: <https://www.bioconductor.org/> (accessed 12.09.2024).
21. Carr S., Aebersold R., Baldwin M., Burlingame A., Clauser K., Nesvizhskii A. The Need for Guidelines in Publication of Peptide and Protein Identification Data. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, vol. 3, no. 6, pp. 531–533. <https://doi.org/10.1074/mcp.t400006-mcp200>
22. Ahrens Ch. H., Wade J. T., Champion M. M., Langer J. D. A Practical Guide to Small Protein Discovery and Characterization Using Mass Spectrometry. *Journal of Bacteriology*, 2022, vol. 204, no. 1, art. 00353. <https://doi.org/10.1128/jb.00353-21>
23. The Gene Ontology Consortium, Aleksander S. A., Balhoff J., Carbon S., Cherry J. M., Drabkin H. J., Ebert D. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 2023, vol. 224, no. 11, art 31. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
24. *BLAST*. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 12.09.2024).
25. Zhang Sh., Yu Q., Li Zh., Zhao Y., Sun Y. Protein neddylation and its role in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, vol. 9, art. 85. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01800-9>
26. Zhang N., Jiang H., Zhang K., Zhu J., Wang Zh., Long Y., He Y., Feng F., Liu W., Ye F., Qu W. OGT as potential novel target: Structure, function and inhibitors. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 357, art. 109886. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109886>
27. Claro da Silva T., Polli J. E., Swaan P. W. The solute carrier family 10 (SLC10): Beyond bile acid transport. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, vol. 34, no. 2–3, pp. 252–269. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.004>
28. Grinev V. V., Yatskou M. M., Skakun V. V., Chepeleva M. K., Nazarov P. V. ORFhunter: An accurate approach to the automatic identification and annotation of open reading frames in human mRNA molecules. *Software Impacts*, 2022, vol. 12, art. 100268. <https://doi.org/10.1016/j.simpa.2022.100268>
29. *Open Reading Frame Finder*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (accessed 12.09.2024).
30. Chothani S. P., Adami E., Widjaja A. A., Langley S. R., Viswanathan S., Pua Ch. J. [et al.]. A high-resolution map of human RNA translation. *Molecular Cell*, 2022, vol. 82, no. 15, pp. 2885–2899. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.023>
31. Wang J., Chitsaz F., Derbyshire M. K., Gonzales N. R., Gwadz M., Lu Sh. [et al.]. The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, no. D1, pp. D384–D388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>
32. Paysan-Lafosse T., Blum M., Chuguransky S., Grego T., Pinto B. L., Salazar G. A., Bileschi M. L. [et al.]. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, no. D1, pp. D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
33. Evangelisti C., Rusciano I., Mongiorgi S., Ramazzotti G., Lattanzi G., Manzoli L., Cocco L., Ratti S. The wide and growing range of lamin B-related diseases: from laminopathies to cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, vol. 79, art. 126. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04084-2>
34. Anzai R., Tsuji M., Yamashita S., Wada Y., Okamoto N., Saitsu H., Matsumoto N., Goto T. Congenital disorders of glycosylation type IIb with MOGS mutations cause early infantile epileptic encephalopathy, dysmorphic features, and hepatic dysfunction. *Brain and Development*, 2021, vol. 43, no. 3, pp. 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.10.013>
35. Yu Z., Zhu J., Wang H., Li H., Jin X. Function of BCLAF1 in human disease (Review). *Oncology Letters*, 2022, vol. 23, no. 2, art. 58. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13176>
36. Gu J., Chen Zh., Chen X., Wang Zh. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPL) in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 2020, vol. 507, pp. 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.040>
37. Coccia M., Rossi A., Riccio A., Trotta E., Santoro M. G. Human NF-κB repressing factor acts as a stress-regulated switch for ribosomal RNA processing and nucleolar homeostasis surveillance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, vol. 114, no. 5, pp. 1045–1050. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616112114>
38. Parrini M. C., Sadou-Dubourgoux A., Aoki K., Kunida K., Biondini M., Hatzoglou A., Pouillet P., Formstecher E., Yeaman Ch., Matsuda M., Rossé C., Camonis J. SH3BP1, an Exocyst-Associated RhoGAP, Inactivates Rac1 at the Front to Drive Cell Motility. *Molecular Cell*, 2011, vol. 42, no. 5, pp. 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.032>
39. Zinatizadeh M. R., Momeni S. A., Zarandi P. K., Chalbatani G. M., Dana H., Mirzaei H. R., Akbari M. E., Miri S. R. The Role and Function of Ras-association domain family in Cancer: A Review. *Genes and Diseases*, 2019, vol. 6, no. 4, pp. 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.008>
40. Di Noia M. A., Todisco S., Cirigliano A., Rinaldi T., Agrimi G., Iacobazzi V., Palmieri F. The Human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 48, pp. 33137–33148. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.610808>

Інфармацыя аб аўтарах

Гузова Екатерина Витальевна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: k.guzowwa0099@gmail.com

Гавричков Александрович – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gavrichkow@gmail.com

Information about the authors

Katsiaryna V. Huzava – Postgraduate Student, Junior Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k.guzowwa0099@gmail.com

Aleksey A. Gavrichkov – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gavrichkow@gmail.com

Ильющёнок Илья Николаевич – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nov.ilyushonok@gmail.com

Романовская Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: romanovskaya.t@mail.ru

Лиховец Максим Александрович – магистрант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: likhovetsmax@gmail.com

Скакун Виктор Васильевич – канд. физ.-мат. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Skakun@bsu.by

Яцков Николай Николаевич – канд. физ.-мат. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Yatskou@bsu.by

Гринец Василий Викторович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: grinev_vv@bsu.by

Ilya M. Ilyushonak – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nov.ilyushonok@gmail.com

Tatsiana V. Ramanouskaya – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romanovskaya.t@mail.ru

Maksim A. Likhavets – Master Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: likhovetsmax@gmail.com

Victor V. Skakun – Ph. D. (Math.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Skakun@bsu.by

Mikalai M. Yatskou – Ph. D. (Math.), Associate Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Yatskou@bsu.by

Vasily V. Grinev – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grinev_vv@bsu.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 595.384.591.5:595.3

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-161-168>

Поступила в редакцию 03.12.2024

Received 03.12.2024

В. Ф. Кулеш¹, Ю. Г. Гигиняк²

¹Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка, Минск,
Республика Беларусь

²Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск,
Республика Беларусь

РАЗМНОЖЕНИЕ СИБИРСКОГО ШРИМСА *EXOPALAEEMON MODESTUS* (HELLER) ИЗ КАПЧАГАЙСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА (РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН) В АКВАКУЛЬТУРЕ

Аннотация. Изучены репродуктивные показатели сибирского шримса *Exopalaemon modestus* (Heller) из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан): динамика эмбрионального развития, размеры и объем яиц. Рассчитаны уравнения, где показано, что продолжительность эмбриогенеза зависит от температуры (коэффициент детерминации $R^2 = 0,879$) и в малой степени от длины самки ($R^2 = 0,311$). В среднем продолжительность эмбрионального развития при средней температуре $20,6 \pm 4,2$ °C и средней длине тела самок $39,4 \pm 2,2$ мм составляет $26,9 \pm 7,0$ сут. Средние величины длины и ширины яиц на начальном этапе инкубации (яйца без глазков) составляют $1,16 \pm 0,10$ и $0,85 \pm 0,07$ мм соответственно, а объем – $0,45 \pm 0,10$ мм³. На завершающем этапе эмбриогенеза размерные показатели возрастают. Длина и ширина яиц с глазками увеличивается примерно в 1,2 раза, составляя в среднем $1,37 \pm 0,09$ и $0,98 \pm 0,10$ мм соответственно, а объем – $0,70 \pm 0,17$ мм³.

Ключевые слова: сибирский шримс, размножение, яйцекладка, эмбриогенез, стадии развития яиц, размеры яиц, объем яиц

Для цитирования: Кулеш, В. Ф. Размножение сибирского шримса *Exopalaemon modestus* (Heller) из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан) в аквакультуре / В. Ф. Кулеш, Ю. Г. Гигиняк // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 161–168. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-161-168>.

Victor F. Kulesh¹, Yury G. Hihiniak²

¹Maxim Tank Belarusian State Pedagogical University, Minsk, Republic of Belarus

²Scientific 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) IN AQUACULTURE

Abstract. The reproductive indicators of the Siberian shrimp *Exopalaemon modestus* (Heller) from the Kapchagay reservoir (Republic of Kazakhstan) were studied: the dynamics of embryonic development, the size and volume of eggs. Equations were calculated showing that the duration of embryogenesis depends on temperature (coefficient of determination $R^2 = 0.879$) and to a small extent on the length of the female ($R^2 = 0.311$). On average, the duration of embryonic development is 26.9 ± 7.0 days at an average temperature of 20.6 ± 4.2 °C and an average body length of females of 39.4 ± 2.2 mm. The average length and width of eggs at the initial stage of incubation (eggs without eyes) are 1.16 ± 0.10 and 0.85 ± 0.07 mm, respectively, and the volume is 0.45 ± 0.10 mm³. In the final stage of embryogenesis, the size indicators increase. The length and width of eyed eggs increase by approximately 1.2 times, with an average of 1.37 ± 0.09 and 0.98 ± 0.10 mm, respectively, and the volume increases to 0.70 ± 0.17 mm³.

Keywords: Siberian shrimp, reproduction, oviposition, embryogenesis, stages of egg development, egg size and volume

For citation: Kulesh V. F., Hihiniak Yu. G. Reproduction of Siberian shrimp *Exopalaemon modestus* (Heller) from the Kapchagai reservoir (Republic of Kazakhstan) in aquaculture. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 161–168 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-161-168>

Введение. Экологически пластичный вид – сибирский шримс *Exopalaemon modestus* (*Palaeomon modestus*) (Heller, 1862) занимает обширный ареал на Азиатском континенте: на севере он доходит до сибирских рек, а на юге – до южной оконечности Китая и острова Тайвань, весьма обилен в водоемах Дальнего Востока (бассейны рек Амур и Уссури), Кореи, Японии. Максимальные скопления сибирского шримса приурочены к литоральной зоне водоемов [1–4]. Креветки устойчивы к дефициту кислорода и могут выживать в природных условиях при концентрации кислорода 0,57–0,96 мг/л и температуре от 0,1 до 35 °C и выше [1, 5].

Интересна история описания и идентификации этого вида пресноводных креветок. Впервые он был зафиксирован в 1862 г. как *Leander modestus* (Heller, 1862) (регион Шанхая, Китай). Затем в 1907 г. – как *Leander modestus sibirica* (Brashnikov, 1907) и в этом же году – как *Leander czerniavskyi* (Brashnikov, 1907) (реки Нижняя Тунгуска и Амур). Его описал известный зоолог В. Брашников и назвал в честь В. И. Чернявского. «...В одном из протоколов заседаний Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей (Труды Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей, 1878, с. 23) содержится краткое сообщение В. И. Чернявского, что Чекановским оставлен из Нижней Тунгуски один вид *Leander*, который крайне интересен как остаток морской фауны в большом отдалении от моря. В музее же Академии сохраняются подлинные 2 экз. с этикеткой В. И. Чернявского: “*Leander modestus*, Heller, var. *sibirica*, Czerniavskyi”. Указание на нахождение этого вида в реке Нижняя Тунгуска еще требует проверки...» ([6], Брашников, 1907). В 1950 г. этот вид был идентифицирован профессором Л. Б. Холтхейсом (L. B. Holthuis, Нидерланды), крупнейшим специалистом по десятиногим ракообразным, и позже им же – как *Palaemon (Exopalaemon) modestus* (Holthuis, 1950) (Китай) и *Exopalaemon modestus* (Holthuis, 1980) (Китай, Россия) [7].

Наши исследования личиночного развития показали, что сибирский шримс может быть объектом тепловодной аквакультуры и использоваться как дополнительный компонент кормовой базы рыб в водоемах – охладителях энергетических объектов. Этот вывод подтверждается результатами по плодовитости и репродуктивной производительности [8], но еще неясными остаются вопросы по продолжительности эмбрионального развития, динамике размеров и объему яиц, что и явилось целью данной работы.

Материалы и методы исследования. В Капчагайском водохранилище (бассейн р. Или, Казахстан) в июле 1988 г. были впервые зарегистрированы два вида пресноводных креветок, идентифицированные крупнейшим знатоком этого систематического таксона Л. Б. Холтхейсом как *Exopalaemon modestus* (Heller, 1862) и *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) [9].

Креветки *E. modestus* были отловлены на мелководьях Капчагайского водохранилища ручным тралом и доставлены самолетом в Институт зоологии НАН Беларуси. Для определения размеров и объема яиц, эмбрионального развития отбирались яйценосные самки сразу же после откладки яиц на плеоподы (без глазков), а также яйценосные самки на завершающем этапе эмбриогенеза (яйца с глазками).

Стадии развития яиц соответствовали тем, которые были определены *Macrobrachium lamarrei* [10]:

Стадия I. Равномерно гранулированное яйцо, заполненное желтком.

Стадия II. Свободная от желтка область с множеством шестиугольных отметин в желточной области.

Стадия III. Увеличение размера бластодермы, которая выглядит серповидной.

Стадия IV. Видимая пульсация сердца, глаза в форме полумесяца, формирование придатков.

Стадия V. Хорошо развиты придатки; сформирована роговица глаза, нет личиночного движения.

Стадия VI. Хорошо просматриваются круглые черные глаза; личинка изредка подергивается.

Чтобы определить воздействие температуры на продолжительность эмбрионального развития, яйценосных самок помещали в пластиковые бассейны с проточной водой при температуре от 15 до 30 °C.

В стационарных условиях яйца счищали с плеопод самок и измеряли длину и ширину при помощи бинокуляра МБС-10 с окуляр-микрометром. Объем яиц определяли по формуле эллипсоида:

$$V = \frac{\pi \cdot L \cdot L_1^2}{6},$$

где V – объем яйца, мм³; π – 3,14; L – длина яйца, мм; L_1^2 – ширина яйца, мм.

Общая длина тела креветок (TL , мм) измерялась от острия (начала) рострума до конца тельсона при помощи штангенциркуля. Минимальная длина тела половозрелых самок была принята при наличии кладки яиц [11]. Изменчивость длины тела креветок, размерные показатели яиц и их объем 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. Эмбриогенез. Одними из важных показателей размножения пресноводных креветок являются длительность эмбрионального развития и размеры яиц. Как известно, продолжительность эмбриогенеза – это период от оплодотворения до выхода личинок из яйца. Скорости эмбрионального развития и оогенеза взаимосвязаны. Самки вынашивают яйца на плеоподах, поэтому следующая кладка может произойти только после завершения эмбриогенеза и выхода личинок во внешнюю среду. Период между яйцекладками может составлять несколько суток.

Яйцекладущие самки сибирского шримса в оз. Young-am (Южная Корея) встречались с мая по сентябрь. Впервые они были отмечены в мае, достигли пика в июне, а затем пошли на убыль. Сезонные изменения были очевидны в процентном соотношении самок с двумя различными стадиями развития. Для самок с яйцами без глаз и икринок с глазками наблюдалось бимодальное распределение (рис. 1), что указывает на потенциальную возможность того, что самки могли нереститься более одного раза в течение одного репродуктивного периода. Максимальная продолжительность жизни в этих условиях оценивалась в 1,08–1,33 года [2].

В табл. 1 приведены данные по эмбриональному развитию сибирского шримса из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан) в лабораторных условиях при температуре 15–30 °С. Стадии развития яиц соответствовали тем, которые были определены для *Macrobrachium lamarrei* [10].

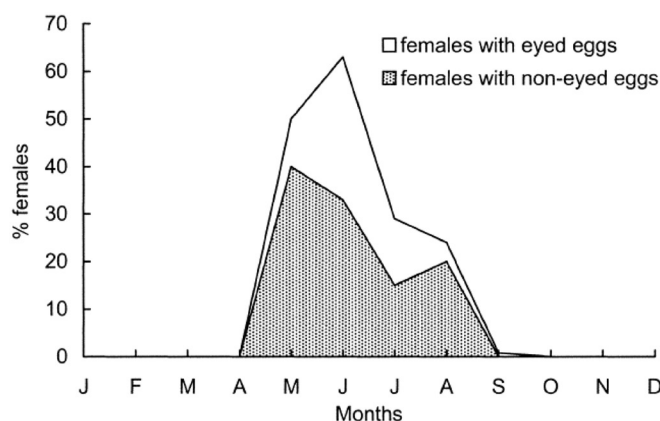


Рис. 1. Сезонные изменения встречаемости яйценосных самок [2]: □ – яйца с глазками; ■ – яйца без глазков

Fig. 1. Seasonal changes in the occurrence of egg-bearing females [2]: □ – eyed eggs; ■ – eggs without eyes

Таблица 1. Длина яйценосных самок, температура и эмбриогенез *E. modestus*

Table 1. Length of egg-bearing females, temperature and embryogenesis of *E. modestus*

Показатель	Значение показателя			с. v., %	Число измерений
	среднее ± s. d.	минимальное	максимальное		
Длина тела, мм	39,4 ± 2,2	35,0	44,0	5,5	22
Период эмбриогенеза, сут	26,9 ± 7,0	16,0	42,0	26,1	22
Температура, °С	20,6 ± 4,2	15,0	30,0	20,3	22

Сразу же после откладки яиц яйца овальные, потом они постепенно увеличиваются в размерах, приобретая более округлую форму, и к концу инкубационного цикла яичник занимает передний спинной отдел под карапаксом. После прохождения этих фаз генеративного роста и выхода личинок из яиц самки готовы к нересту.

Как видно из табл. 1, длина яйценосных самок колебалась в довольно узком интервале от 35 до 44 мм. Для этих самок средняя величина эмбрионального развития составила $26,9 \pm 7,0$ сут при средней температуре $20,6 \pm 4,2$ °C. Надо отметить, что период эмбриогенеза – непостоянная величина, которая в зависимости от температуры может изменяться более чем в 2 раза – от 16 до 42 сут. Об этом свидетельствует и коэффициент вариации, который составляет 26,1 %.

Таким образом, температура оказывает основное влияние на продолжительность инкубации яиц *E. modestus*. Оптимальный показатель для эмбрионального развития креветок рода *Macrobrachium* (в том числе и креветок семейства Palaemonidae) может составлять 25–30 °C [12]. Под воздействием низкой температуры инкубационный период для представителей десятиногих ракообразных закономерно увеличивается [9, 13, 14].

На рис. 2, а показана длительность эмбрионального развития яиц от откладки на плеоподы до выхода личинок в температурном интервале от 15 до 30 °C. Зависимость хорошо описывает экспоненциальное уравнение с высоким коэффициентом детерминации:

$$Dq = 86,12e^{-0,058t} (R^2 = 0,879),$$

где Dq – продолжительность развития яиц, сут; t – температура, °C.

В результате проведенных экспериментов прослеживается слабо выраженная тенденция увеличения продолжительности эмбриогенеза в зависимости от длины самки. Как видно на рис. 2, б, данное соотношение можно описать уравнением линейной регрессии с невысоким коэффициентом детерминации:

$$Dq = 44,89 - 1,82L (R^2 = 0,311),$$

где Dq – продолжительность развития яиц, сут; L – длина тела, мм.

Размеры и объем яиц. Одним из значимых показателей репродуктивной стратегии пресноводных креветок являются размеры и объем яиц, которые приведены в табл. 2. Размер яйца влияет на инкубационный период и выживаемость и различается у разных видов, что приводит к различным репродуктивным стратегиям. Известно, что размеры яиц у пресноводных креветок зависят от местообитания и географической разобщенности популяций [15]. Большой объем яиц у пресноводных популяций можно объяснить адаптацией к существованию при бедной кормовой базе. Личинки, которые вышли из крупных яиц, более длительное время переносят период

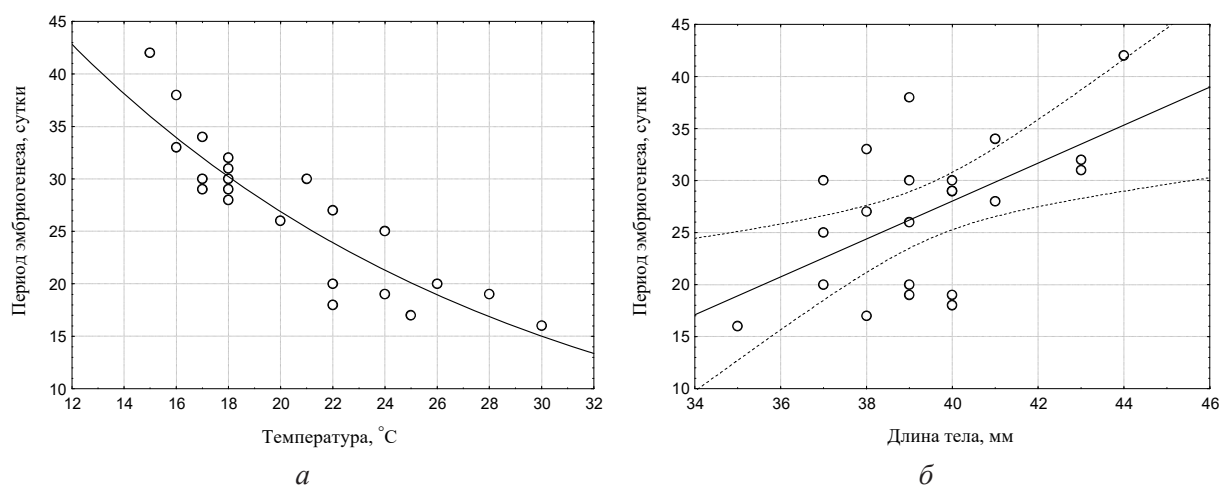


Рис. 2. Зависимость периода эмбрионального развития яиц от температуры (а) и длины тела (б) самок

Fig. 2. Dependence of the period of embryonic development of eggs on temperature (a) and body length (b) of females

вынужденного голодания, и в условиях низкой обеспеченности кормом их выживаемость выше за счет более короткого периода личиночного развития, чем у личинок из яиц меньших размеров. Это справедливо и для морских видов, что согласуется с *r*- и *K*-стратегиями отбора ([9, 16, 17].

Т а б л и ц а 2. Размерные показатели яиц и объем яиц сибирского шримса из Капчагайского водохранилища

Table 2. Size and volume of Siberian shrimp eggs from the Kapchagai reservoir

Показатель	Значение показателя			с. в., %	Число измерений
	среднее $\pm$ s. d	минимальное	максимальное		
Яйца без глазков					
Длина, мм	1,16 $\pm$ 0,10	0,95	1,50	8,5	373
Ширина, мм	0,85 $\pm$ 0,07	0,70	1,10	8,2	373
Объем, мм ³	0,45 $\pm$ 0,10	0,23	0,82	22,5	373
Яйца с глазками					
Длина, мм	1,37 $\pm$ 0,09	1,10	1,75	6,9	223
Ширина, мм	0,98 $\pm$ 0,10	0,75	1,25	10,5	223
Объем, мм ³	0,70 $\pm$ 0,17	0,35	1,23	25,0	223

Как видно из табл. 2, средние величины длины и ширины яиц сибирского шримса на начальном этапе инкубации (яйца без глазков) составляют $1,16 \pm 0,10$ и $0,85 \pm 0,07$ мм соответственно, а объем – $0,45 \pm 0,10$ мм³. Если сравнить эти показатели с размерами и объемом яиц без глазков среди других видов пресноводных креветок с сокращенным периодом личиночного развития и близкими величинами абсолютной плодовитости [5], то у сибирского шримса они имеют самое низкое значение. Обращает на себя внимание то, что показатели длины и ширины яиц достаточно лабильны и существенно не изменяются (с. в. для них составляют 8,5 и 8,2 % соответственно, что свидетельствует об однородности биологического материала). В отличие от этих показателей объем яиц – величина более разнокачественная, и с. в. здесь составляет 22,5 % несмотря на большой объем выборки. Доминировали группы самок с объемом яиц без глазка 0,4–0,5 мм³ (120 и 133 экз. соответственно), а количество особей с объемом 0,6 мм³ и более не превышало 80 экз. (рис. 3).

На завершающем этапе эмбриогенеза размерные показатели возрастают. Длина и ширина яиц с глазками увеличивается примерно в 1,2 раза, составляя в среднем $1,37 \pm 0,09$ и $0,98 \pm 0,10$ мм соответственно. Объем яиц также, как и для начального этапа эмбрионального развития, изменяется в широких пределах (с. в. = 25,0 %) от 0,35 до 1,23 мм³ при среднем значении $0,70 \pm 0,17$ мм³. Здесь выделяются 3 размерных класса объема яиц от 0,5 до 0,7 мм³ (рис. 3).

В целом за время инкубации от стадии яйца без глазка и до стадии яйца с глазком их объем увеличился на 36 % (рис. 4). Для сравнения: в оз. Young-am при колебаниях температуры 13,5–29,5 °С объем яиц без глазков составил $0,722 \pm 0,139$ мм³, у яиц с глазками в конце периода эмбриогенеза – $0,897 \pm 0,199$ мм³. За время инкубации объем яиц увеличился на 24 % [17]. Эти величины отличаются от показателей у сибирского шримса из Капчагайского водохранилища. К сожалению, авторы не приводят данных о продолжительности эмбриогенеза и температуре инкубации.

Ближние результаты получены при исследовании репродукционных характеристик

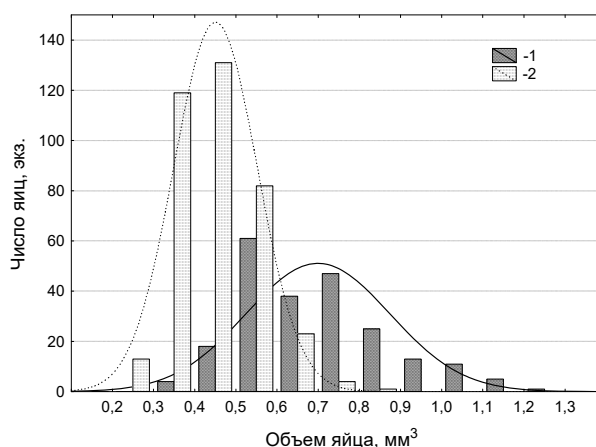


Рис. 3. Объем яиц с глазками (1) и без глазков (2)

Fig. 3. Volume of eyed eggs (1) and eggs without eyes (2)

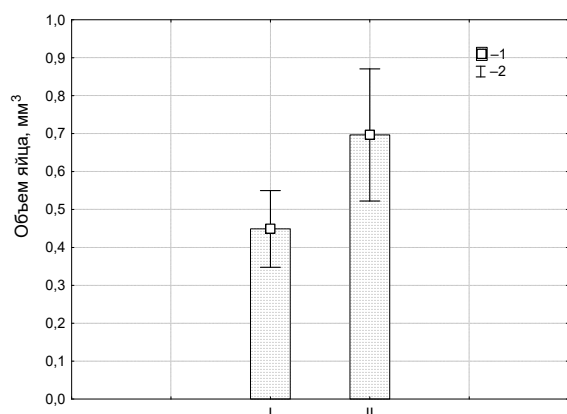


Рис 4. Объем яиц без глазков (I) и перед выходом личинок с глазками (II): 1 – среднее значение; 2 – стандартное отклонение

Fig. 4. Volume of eggs without eyes (I) and eggs before the emergence of larvae (II): 1 – average value; 2 – standard deviation

тела – 42–51 мм; абсолютная плодовитость – 20–75 яиц; объем яиц – 2,68 мм³; период эмбриогенеза – 53 сут ($t = 20\text{--}28^\circ\text{C}$).

Однако, по данным J. T. Wong [20], средняя величина периода инкубации составила 37 сут, что, очевидно, было связано с более высокой температурой, равной 26–28 °C.

Macrobrachium totonacum [21]: ареал – реки Мексики; сокращенное личиночное развитие – 3 стадии зоеа; длина карапакса – 11,4–14,8 мм; абсолютная плодовитость – 9–28 яиц; объем яиц – 4,5 мм³; период эмбриогенеза – 60 сут ($t = 20^\circ\text{C}$).

В последнем случае приведен пример, пожалуй, одного из самых длительных периодов инкубации яиц у креветок семейства Palaemonidae. В этом процессе выделяется несколько отличительных стадий. Первоначально яйца были коричневыми или бордовыми, впоследствии они изменились на зеленые; через три недели стало заметно развитие глаз и карапакса; на 7-й неделе брюшко самки, которое до этого было темным, стало прозрачным, и тогда произошло вылупление личинок. Их выход из яиц продолжался 3 сут в разное время. Все личинки выходили на одной и той же стадии. У этих креветок нет четко выраженного сезона размножения. Как полагает автор, этот вид увеличивает свою репродуктивность в ответ на изобилие пищи, и сезонные колебания экологических характеристик в местах обитания этого вида ограничены.

Закключение. Размножение является наиболее значимым периодом в онтогенезе пресноводных креветок, а также критерием для выбора перспективного объекта аквакультуры. В этой связи изучены элементы репродуктивного цикла: эмбриональное развитие и (за этот период) динамика размера и объема яиц. Рассчитаны уравнения взаимосвязи продолжительности эмбриогенеза с температурой и длиной тела половозрелых самок. В сравнительном аспекте анализируются эти показатели с пресноводными креветками близкого экологического статуса. Исходя из ранее полученных результатов [8] и результатов данного исследования, характеризующих начальный период онтогенеза (размножение), можно заключить, что сибирский шримс является перспективным объектом аквакультуры, в том числе и на сбросной подогретой воде теплоэлектростанции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список используемых источников

1. Куренков, И. И. К биологии дальневосточных пресноводных креветок / И. И. Куренков // Труды Амурской ихтиологической экспедиции, 1945–1949 гг.: в 4 т. / отв. ред. Г. В. Никольский. – М., 1950–1958. – 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, H.-S. Lim, H.-L. Suh [et al.] // Journal of Crustacean Biology. – 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)

пресноводной креветки *Macrobrachium asperulum*. По своему экологическому статусу этот вид весьма схож с *E. modestus* и встречается в совместных местообитаниях [1, 7].

Macrobrachium asperulum [18]: ареал – континентальные водоемы Дальнего Востока, Китая, Японии; сокращенное личиночное развитие – 3 стадии зоеа; общая средняя длина тела – 57 мм; абсолютная плодовитость – 26–166 яиц; объем яиц – 1,42 мм³; период эмбриогенеза – 33 сут ($t = 28^\circ\text{C}$).

В сравнительном аспекте приведем данные по другим видам пресноводных креветок со сходными экологическими характеристиками и сокращенным личиночным развитием из других континентальных водоемов.

Macrobrachium hainanense [19]: ареал – реки и ручьи Гонконга; сокращенное личиночное развитие – 2 стадии зоеа; общая средняя длина

3. Guo, Z. L. On the genus *Exopalaemon* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in Guangdong province, Southern China / Z. L. Guo, X. Q. Wang, J. P. 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 // *Известия ТИНРО*. – 2020. – Т. 200, № 2. – С. 292–307.
5. Kulesh, V. F. Peculiarities of the life cycle of freshwater shrimps with abbreviated larval development / V. F. Kulesh // *Hydrobiological Journal*. – 2020. – Vol. 56, N 4. – P. 43–59. <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v56.i4.40>
6. Бражников, В. Материалы по фауне русских восточных морей, собранные шхуною «Сторож» в 1899–1902 гг. (С 2 таблицами, 1 картой и 26 рис. в тексте) // *Записки Императорской Академии наук по Физико-математическому отделению*. – 1907. – Т. 20, N 6. – С. 1–185.
7. FAO species catalogue: in 49 Vol. / FAO Fisheries Department [et al.]. – Rome: Food and agriculture organization of the united nations. – Vol. 1: Shrimps and prawn of the world / L. B. Holthuis. – 1980. – 271 p.
8. Кулеш, В. Ф. Размножение сибирского шримса *Exopalaemon modestus* (Heller) из Капчагайского водохранилища (Республика Казахстан): репродуктивная производительность и плодовитость / В. Ф. Кулеш, Ю. Г. Гигиняк // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 289–297.
9. Экология пресноводных креветок / Н. Н. Хмелева, В. Ф. Кулеш, А. В. Алехнович, Ю. Г. Гигиняк. – Минск: Беларус. наука, 1997. – 254 с.
10. Charles, P. M. Egg production as a function of seasonal variation in *Macrobrachium lanchesteri* / P. M. Charles // *Journal of Ecobiology*. – 1997. – Vol. 9. – P. 49–52.
11. Wear, R. G. Incubation in British decapods crustacea, and the effects temperature on the rate and success of embryonic development / R. G. Wear // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. – 1974. – Vol. 54, N 3. – P. 745–762. <https://doi.org/10.1017/s0025315400022918>
12. Alekhovich, A. V. Variation in the parameters of the life cycle in prawns of the genus *Macrobrachium* Bate (Crustacea, Palaemonidae) / A. V. Alekhovich, V. F. Kulesh // *Russian Journal of Ecology*. – 2001. – Vol. 32, N 6. – P. 420–424. <https://doi.org/10.1023/A:1012586218096>
13. Guest, W. C. Palaemonid shrimp, *Macrobrachium amazonicum*: effects of salinity and temperature on survival / W. C. Guest, P. P. Durocher // *The Progressive Fish-Culturist*. – 1979. – Vol. 41, N 1. – P. 14–18. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1979\)41\[14:psma\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1979)41[14:psma]2.0.co;2)
14. Shirley, S. M. Longitudinal variation in the dungeness crab, *Cancer magister*: zoal morphology explained by incubation temperature / S. M. Shirley, T. C. Shirley, S. D. Rice // *Marine Biology*. – 1987. – Vol. 95, N 8. – P. 371–376. <https://doi.org/10.1007/bf00409567>
15. Mashiko, K. Diversified egg and clutch sizes among local populations of the fresh-water prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan) / K. Mashiko // *Journal of Crustacean Biology*. – 1990. – Vol. 10, N 2. – P. 306–314.
16. Пианка, Э. Эволюционная экология / Э. Пианка; пер. с англ. А. М. Гилярова, В. Ф. Матвеева; под ред. М. С. Гилярова. – М.: Мир, 1981. – 400 с.
17. 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 // *Fisheries and aquatic sciences*. – 2000. – Vol. 3, N 3–4. – P. 180–187.
18. Shokita, S. Abbreviated metamorphosis of land-locked fresh-water prawn, *Macrobrachium asperulum* (Von Martens) from Taiwan / S. Shokita // *Annotationes zoologicae japonenses*. – 1977. – Vol. 50, N 2. – P. 110–22.
19. Mantel, S. K. Reproduction and sexual dimorphism of the palaemonid shrimp *Macrobrachium hainanense* in Hong Kong streams / S. K. Mantel, D. Dudgeon // *Journal of Crustacean Biology*. – 2005. – Vol. 25, N 3. – P. 450–459. <https://doi.org/10.1651/c-2541>
20. Wong, J. T. Y. Abbreviated larval development of *Macrobrachium hainanense* (Parisi, 1919) reared in the laboratory (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) / J. T. Y. Wong // *Crustaceana*. – 1989. – Vol. 56, N 1. – P. 18–30. <https://doi.org/10.1163/156854089x00752>
21. Mejia-Ortiz, L. M. The abbreviated larval development of *Macrobrachium totonacum* Mejia, Alvarez & Hartnoll, 2003 (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory / L. M. Mejia-Ortiz, R. G. Hartnoll, M. López-Mejía // *Crustaceana*. – 2010. – Vol. 83, N 1. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1163/001121609x12487811051462>

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., Lim H.-S., Suh H.-L., Ma C.-W., Park K.-Y. 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. P. 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 V. N., Kolpakov N. V. Species composition and distribution of fish and shrimps in the Lower Amur River channel. *Izvestiya Tikhookeanskogo nauchno-issledovatel'skogo rybokhozyaistvennogo tsentra* [News of the Pacific Research Fisheries Center], 2020, vol. 200, no. 2, pp. 292–307 (in Russian).
5. 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>
6. Brazhnikov V. Materials on the fauna of the Russian eastern seas, collected by the schooner “Storozh” in 1899–1902 (With 2 tables, 1 map and 26 figures in the text). *Zapiski Imperatorskoi Akademii nauk po Fiziko-matematicheskomu otdeleniyu* [Notes of the Imperial Academy of Sciences for the Physics and Mathematics Department], 1907, vol. 20, no. 6, pp. 1–185 (in Russian).
7. Holthuis L. B. *FAO species catalogue. Vol. 1. Shrimps and prawn of the worlds*. Rome, 1980. 271 p.

8. Kulesh V. F., Giginyak 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 biyagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 289–297 (in Russian).
9. Khmeleva N. N., Kulesh V. F., Alekhovich A. V., Giginyak Yu. G. *Ecology of freshwater shrimps*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 1997. 254 p. (in Russian).
10. Charles P. M. Egg production as a function of seasonal variation in *Macrobrachium lanchesteri*. *Journal of Ecology*, 1997, Vol. 9, pp. 49–52.
11. Wear R. G. Incubation in British decapods crustacea, and the effects temperature on the rate and success of embryonic development. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1974, vol. 54, no. 3, pp. 745–762. <https://doi.org/10.1017/s0025315400022918>
12. Alekhovich A. V., Kulesh V. F. Variation in the parameters of the life cycle in prawns of the genus *Macrobrachium* Bate (Crustacea, Palaemonidae). *Russian Journal of Ecology*, 2001, vol. 32, no. 6, pp. 420–424. <https://doi.org/10.1023/A:1012586218096>
13. Guest W. C., Durocher P. P. Palaemonid shrimp, *Macrobrachium amazonicum*: effects of salinity and temperature on survival. *The Progressive Fish-Culturist*, 1979, vol. 41, no. 1, pp. 14–18. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1979\)41\[14:psma\] 2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1979)41[14:psma] 2.0.co;2)
14. Shirley S. M., Shirley T. C., Rice S. D. Longitudinal variation in the dungeness crab, *Cancer magister*: zoal morphology explained by incubation temperature. *Marine Biology*, 1987, vol. 95, no. 8, pp. 371–376. <https://doi.org/10.1007/bf00409567>
15. 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.
16. Pianka E. R. *Evolutionary Ecology*. New York, Harper and Row, 1974. 356 p. (Russ. ed.: Pianka E. *Evolutsionnaya ekologiya*. Moscow, Mir Publ., 1981. 400 p.
17. Oh C. W., Park K. Y. Comparative study on reproductive effort and spawning frequency of the two palaemonid prawns (*Exopalaemon modestus* and *Palaemon grarieri*) with different habitats. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, vol. 3, no. 3–4, pp. 180–187.
18. Shokita S. Abbreviated metamorphosis of land-locked fresh-water prawn, *Macrobrachium asperulum* (Von Martens) from Taiwan. *Annotationes zoologicae japonenses*, 1977, vol. 50, no. 2, pp. 110–122.
19. 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-254>
20. Wong J. T. Y. Abbreviated larval development of *Macrobrachium hainanense* (Parisi, 1919) reared in the laboratory (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Crustaceana*, 1989, vol. 56, no. 1, pp. 18–30. <https://doi.org/10.1163/156854089x00752>
21. Mejía-Ortiz L. M., Hartnoll R. G., López-Mejía M. The abbreviated larval development of *Macrobrachium totonacum* Mejía, Alvarez & Hartnoll, 2003 (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 2010, vol. 83, no. 1, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1163/001121609x12487811051462>

Информация об авторах

Кулеш Виктор Федорович – д-р биол. наук, профессор, Белорусский государственный педагогический университет имени М. Танка (ул. Советская, 18, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: victor_kulesh@tut.by

Гигиняк Юрий Григорьевич – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: antarctida_2010@mail.ru

Information about the authors

Viktor F. Kulesh – D. Sc. (Biol.), Professor. Maxim Tank Belarusian State Pedagogical University (27, Sovetskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: victor_kulesh@tut.by

Yury G. Hihiniak – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. The 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 592;576.89;591.69;574.3

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-169-176>

Поступила в редакцию 09.08.2024

Received 09.08.2024

Е. Г. Скуратович, К. Сливинска

Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам,
Минск, Республика Беларусь

ПЕРВАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БРАНХИОБДЕЛЛИДЫ *BRANCHIOBELLEA PENTADONTA* WHITMAN, 1882 (ANNELIDA) В БЕЛАРУСИ

Аннотация. Во время оценки состояния популяции широкопалого рака (*Astacus astacus*) из р. Доргомысль (Мстиславский р-н, Могилевская обл.) на пойманных особях были обнаружены представители рода *Branchiobdella*. Всего было обследовано 8 особей *A. astacus*, с которых собрали 101 особь рачьих пиявок. Согласно таким морфологическим признакам, как форма и размер тела, строение челюстного аппарата и количество зубов, пиявки были идентифицированы как *Branchiobdella pentadonta*. На территории Беларуси это первая регистрация данного вида, а также первая достоверная находка представителей рода *Branchiobdella* на широкопалом раке из Беларуси.

Ключевые слова: *Branchiobdella pentadonta*, Беларусь, рачьи пиявки, широкопалый рак

Для цитирования: Скуратович, Е. Г. Первая регистрация бранхиобделлиды *Branchiobdella pentadonta* Whitman, 1882 (Annelida) в Беларуси / Е. Г. Скуратович, К. Сливинска // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 169–176. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-169-176>

Elena G. Skuratovich, Karolina Śliwińska

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

FIRST RECORD OF *BRANCHIOBELLEA PENTADONTA* WHITMAN, 1882 (ANNELIDA) IN BELARUS

Abstract. Our paper describes the registration of crayfish worms on the noble crayfish *Astacus astacus* from the Dorgomysl River (Mstislavsky district, Mogilev region, Belarus). A total of 101 branchiobdellidans were collected from eight *A. astacus* individuals. Each individual was separated and identified by key morphological characters, including body size and shape, jaw apparatus structure, and the number of teeth. The found branchiobdellidans were identified as *Branchiobdella pentadonta*, which is the first record of this species in Belarus.

Keywords: *Branchiobdella pentadonta*, Belarus, crayfish worms, noble crayfish

For citation: Skuratovich E. G., Śliwińska K. First record of *Branchiobdella pentadonta* Whitman, 1882 (Annelida) in Belarus. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 169–176 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-2-169-176>

Введение. Бранхиобделлиды (также известны как рачьи пиявки) являются узкоспециализированной группой кольчатых червей, которые формируют тесные эктосимбиотические отношения преимущественно с пресноводными раками [1]. Большинство видов бранхиобделлид обитают на поверхности тела хозяина, однако некоторые виды населяют жаберные полости раков [2]. Виды бранхиобделлид, обитающие в жабрах и питающиеся тканями и гемолимфой раков, рассматриваются как паразиты [3–5]. Однако большинство представителей рода *Branchiobdella* не наносят вреда своим хозяевам и могут оказывать положительное влияние на раков, выполняя очистительную функцию [6, 7].

Ареал распространения бранхиобделлид (*Branchiobdellidae*) охватывает значительную часть Голарктического региона, включая Евро-средиземноморскую область, Восточную Азию, а также Северную и Центральную Америку [1, 2, 8, 9]. Рачьи пиявки обнаружены практически во всех частях Европы, где присутствуют популяции раков, исключением являются периферийные страны Европы (Норвегия и Ирландия на северо-западе, Испания и Португалия на юго-западе), где представители рода *Branchiobdella* не были обнаружены несмотря на наличие раков [2].

В настоящее время род *Branchiobdella* (Odier, 1823) представлен 19 валидными видами, которые дифференцируются на 2 географически обособленные группы: азиатскую и европейскую [2]. На данный момент европейская группа включает в себя 9 видов: *Branchiobdella astaci* Odier, 1823; *Branchiobdella parasita* Braun, 1805; *Branchiobdella pentadonta* Whitman, 1882; *Branchiobdella hexadonta* Gruber, 1883; *Branchiobdella italica* Canegallo, 1928; *Branchiobdella balcanica* Moszyński, 1938; *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978; *Branchiobdella papillosa* Nesemann and Hutter, 2002; *Branchiobdella bulgariensis* Subchev, Rimcheska 2021 [2, 10, 11].

Из 7 Европейских аборигенных видов раков бранхиобделлиды регистрировались на 4 видах: широкопалом (*Astacus astacus*), длиннопалом (*Pontastacus leptodactylus*), белоклешневым (*Austropotamobius pallipes*) и каменном (*A. torrentium*) раках. Кроме того, обитание бранхиобделлид было описано на инвазивных видах раков: полосатом (*Faxonius limosus*), сигнальном (*Pacifastacus leniusculus*) и красном болотном (*Procambarus clarkii*) [2, 10, 12]. В Беларуси обитают 3 вида из вышеперечисленных: аборигенные широкопалый и длиннопалый раки, а также инвазивный полосатый рак.

До настоящего времени данная группа организмов не являлась предметом изучения в Беларуси. Поэтому их видовой состав, распространение и встречаемость в республике остаются неизученными. В литературе имеются лишь единичные упоминания о регистрации бранхиобделлид. Первое сообщение касается *B. astaci* и *B. kozarovi*, обнаруженных на музейных образцах *A. astacus* из р. Днепр в г. Могилеве [13]. Однако достоверность этих данных вызывает сомнения, поскольку *B. kozarovi* является специфичным видом для длиннопалого рака [2, 14, 15]. В дальнейшем, в другой своей публикации, автор указывает на возможность ошибочной идентификации вида хозяина [2]. Кроме того, достоверность результатов данного исследования под вопросом, поскольку в литературе отсутствуют данные, подтверждающие, что р. Днепр когда-либо являлась биотопом широкопалого рака [16]. Второе и на сегодняшний день последнее упоминание о бранхиобделлидах из Беларуси касается находки *B. kozarovi* на длиннопалых раках из Краснослободского водохранилища (Солигорский р-н, Минская обл.) [17].

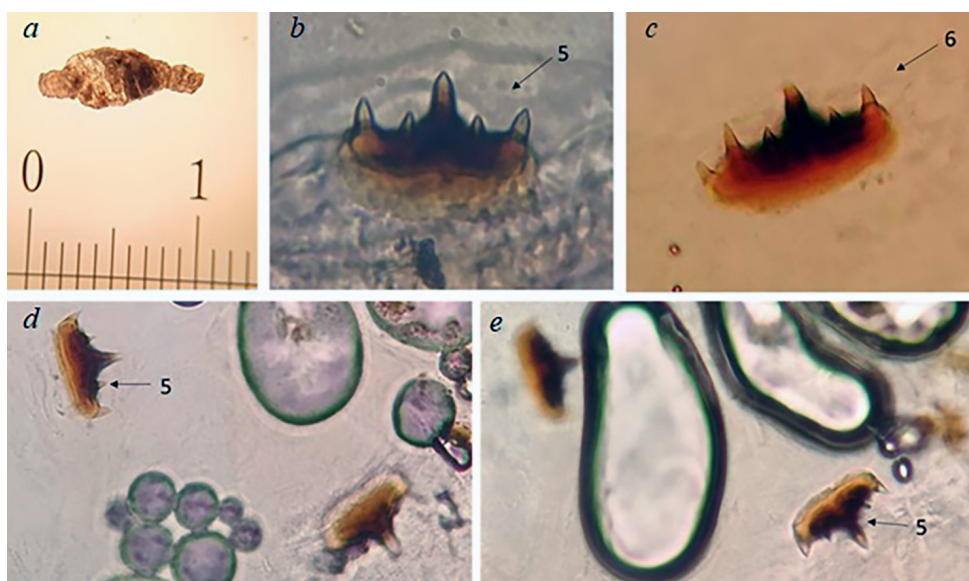
В рамках выполнения проекта «Устойчивое управление лесными и водно-болотными экосистемами для достижения многоцелевых преимуществ («Ветландс»)), финансируемого Программой развития Организация Объединенных Наций (ПРООН), изучалось распространение редких и исчезающих видов животных и оценка состояния их популяций для природоохранных целей. Одним из объектов исследования являлся широкопалый рак. В 2020 г. на особях *A. astacus*, отловленных в р. Доргомысль (Мстиславский р-н, Могилевская обл.), было зарегистрировано обильное обрастание панциря неидентифицированными животными, морфологически проявляющими черты, характерные для рачьих пиявок. Ввиду предположения о возможном паразитическом образе жизни обнаруженных организмов было принято решение об их удалении с панциря раков и сохранении методом консервирования. Таким образом, целью настоящей работы было проведение диагностических исследований, направленных на видовую идентификацию обнаруженных организмов и оценку потенциальной угрозы для популяции исчезающего вида, которым является широкопалый рак.

Материалы и методы исследования. Все собранные экземпляры (101 особь бранхиобделлид), обнаруженные на восьми особях широкопалого рака из р. Доргомысль, помещали в пробирки, содержащие 96%-й этанол, для последующей видовой идентификации. Определение видовой принадлежности осуществляли на основании морфологических признаков, таких как форма тела, размеры, строение челюстей и количество зубов, в соответствии с определителями [14, 15, 18–20]. Каждую особь помещали на калибровочное предметное стекло с размерной линейкой, пропитывали глицерином и измеряли длину под стереоскопическим микроскопом (МБС-9). В качестве основного таксономического признака для описания европейских видов бранхиобделлид использовали форму хитиновых челюстей [10]. В связи с этим для детального изучения применяли их вскрытие. Голова каждого исследованного образца была отделена с помощью энтомологических булавок, а задняя часть тела помещена в пробирку объемом 0,25 мл с 96%-м этанолом для сохранения генетического материала. Идентификация вида по форме челюсти

и количеству зубов проводилась с помощью светового микроскопа (ZEISS Primo Star) при увеличении 40х.

Результаты и их обсуждение. Все исследованные образцы бранхиобделлид из р. Доргомысль имели размеры от 0,5 до 1,8 мм и специфическую листовидную форму тела (рисунок, *a*), уплощенную в дорсовентральном направлении. В результате вскрытия были получены полные данные о строении челюстного аппарата 62 особей. Для всех исследованных бранхиобделлид из р. Доргомысль характерной являлась четырехугольная форма челюстей (рисунок, *b–e*) с центрально расположенным доминирующим зубом. По обе стороны от него отходят маленькие зубцы, количество которых может варьироваться [15]. Зубная формула изолированных челюстей была представлена следующими соотношениями: 5/5 (5 зубов на одной челюсти и 5 – на второй); 5/6; 6/6; 4/5. Наиболее часто встречалась зубная формула 5/5 (66,1 % от общего числа исследуемых особей), реже – 5/6 (29 %). Формула 4/5 была отмечена у нескольких особей (3,3 %), а формула 6/6 – только у одной (1,6 % от исследованной выборки). Согласно информации, содержащейся в ключах по видовой идентификации бранхиобделлид, обнаруженные морфологические признаки исследованных особей рачьих пиявок из р. Доргомысль являлись характерными для вида *Branchiobdella pentadonta* [2, 14, 15, 20].

Большинство видов бранхиобделлид отличаются строением челюстей, что позволяет проводить видовую идентификацию при использовании исключительно данного признака. Однако в научной литературе встречаются сведения о том, что несколько видов европейских бранхиобделлид имеют схожий челюстной аппарат, следовательно, определение их видовой принадлежности является неоднозначным только лишь по данному критерию. Данный вопрос обсуждался в работе S. M. Karaman [21], где было предложено выделить филогенетическую «группу *pentadonta*», которая включает следующие виды: *B. pentadonta* Whitman, 1882, *B. italica* Canegallo, 1928 и *B. balcanica* Moszyński, 1938. S. M. Karaman упоминает [21], что, несмотря на схожесть челюстного аппарата, *B. balcanica* явно отличается от видов *B. pentadonta* и *B. italica* по ряду внешних морфологических признаков: характеризуется сильно уплощенным телом в дорсовентральном направлении и резким расширением тела с IV сегмента, в то время как тела *B. pentadonta* и *B. italica* плавно расширяются к X сегменту, что отмечалось у особей в нашем исследовании. В связи с этим существует вероятность ошибочной идентификации *B. pentadonta* относительно вида *B. italica*. По опубликованным данным, *B. italica* обитает только на двух



Branchiobdella pentadonta из р. Доргомысль: *a* – внешний вид; *b* – челюсть с 5 зубами; *c* – челюсть с 6 зубами; *d, e* – челюстной аппарат от одной особи с зубной формулой 5/5

Branchiobdella pentadonta from the Dorgomysl River: *a* – habitus; *b* – jaw with 5 teeth; *c* – jaw with 6 teeth; *d, e* – jaws from one individual with dental formula 5/5

представителях рода *Astropotamobius* и инвазивном красном болотном раке [9], ареал обитания которых не распространяется на территорию Республики Беларусь.

Согласно опубликованным данным, форма челюстей и количество зубов у *B. pentadonta* может варьироваться. Типичными являются формулы челюстного аппарата 5/5 или 5/6, характеризующиеся крупным центральным зубом и двумя мелкими боковыми зубами, расположенными симметрично [15, 22–24]. Тем не менее в литературе также встречаются сведения о других вариациях строения челюстей, включая формулы 3/6, 4/5, 5/7 и 6/6 [15, 20, 25, 26]. Таким образом, результаты нашего исследования особей *B. pentadonta* из р. Доргомысль демонстрируют разнообразие в строении челюстного аппарата, соответствующее ранее описанному для данного вида.

Размерный диапазон обследованных нами особей из р. Доргомысль находился в пределах от 0,5 до 1,8 мм, а это относительно низкие значения по сравнению опубликованными данными. При первом описании данного вида С. О. Whitman [22] указал размеры тела от 3 до 4,5 мм для *B. pentadonta*, уточнив, что отбирались только крупные особи. Авторы дальнейших исследований подтвердили информацию касательно максимальной длины тела (до 4,5 мм), дополнительно указав на то, что для данного вида характерны небольшие размеры [2, 15, 18]. Противоречивые значения, касающиеся длины тела живых особей *B. pentadonta*, были описаны в определителе О. В. Чекановской [26] и варьировались от 4,5 до 6 мм, а в работе Е. Г. Бошко [14] размерный диапазон характеризовался значениями от 1,8 до 3,5 мм. В обоих случаях в качестве хозяина для *B. pentadonta* указывали широкопалого рака. По данным М. А. Subchev et al. [20], размер зафиксированных особей *B. pentadonta* из Литвы не превышал 4 мм. Необходимо отметить, что важным показателем является состояние бранхиобделлид на момент сбора данных, поскольку при сравнениях общих длин исследованных организмов зафиксированные образцы, как правило, имеют меньший размер тела, чем живые особи. Кроме того, необходимо учитывать используемый фиксатор, так как различные консервирующие растворы могут вызывать разную степень усадки образцов [2].

В нашей работе указаны размеры тел зафиксированных особей, что частично объясняет относительно небольшой размер представителей *B. pentadonta* из р. Доргомысль по сравнению с данными, опубликованными в научной литературе. Однако даже при сравнении размеров тел образцов данного вида (из широкопалого рака) подтверждается общая замеченная тенденция: максимальный размер тела бранхиобделлид из р. Доргомысль значительно меньше (до 1,8 мм), чем длина тела живых особей из бассейна р. Днестр, (до 3,5 мм) [14], а также меньше зафиксированных образцов *B. pentadonta*, снятых с *A. astacus* в Литве (до 4 мм) [20]. Размер тел живых организмов напрямую связан с онтогенезом, однако неуместным является утверждение о том, что исследованная выборка *B. pentadonta* была представлена исключительно ювенильными особями, так как у данного вида размножение может происходить в течение всего года [26].

На размер тела разных популяций животных влияет множество факторов, нередко связанных с биологическими особенностями вида. Популяции одного вида также могут различаться по размеру, что часто объясняется влиянием разных условий окружающей среды [27]. Однако в нашем исследовании средой обитания популяции *B. pentadonta* является широкопалый рак – стенобионтный к множеству факторов окружающей среды вид, крайне чувствительный к любым изменениям в среде его обитания [28]. Следовательно, не стоит ожидать, что популяции *B. pentadonta* испытывают значительное влияние различных факторов окружающей среды в своем ареале обитания, так как хозяин данного вида предпочитает определенные узко-специфичные и стабильные условия. В связи с особенностями хозяина *B. pentadonta* – широкопалого рака – как чрезвычайно редкого вида, популяции которого являются изолированными, малые размеры тела *B. pentadonta* в р. Доргомысль могут быть вызваны эффектом инбридинга. Исследования различных водных организмов показывают, что долгая генетическая изоляция популяций может приводить к данному процессу, что нередко выражается в уменьшении размеров тела таких организмов [29]. Дополнительно нельзя исключать и тот факт, что указанные выше заметные отличия в максимальных размерах тела могут указывать на возможное криптическое разнообразие внутри *B. pentadonta* в регионе, так как, по последним опубликованным данным, для другого европейского вида бранхиобделлид было выявлено и описано его значительное разнообразие [30].

Факт наличия возможного разнообразия представляет собой отдельный фундаментальный научно-исследовательский интерес в области изучения филогеографических и эволюционных процессов данной группы животных.

Идентифицированный в данном исследовании вид *B. pentadonta* является широко распространенным в Западной, Центральной и части Восточной Европы и встречается от юга Балканского полуострова до Финляндии [31]. По данным М. А. Subchev [2], *B. pentadonta* описана в 22 европейских странах. Поэтому обнаружение данного вида на территории Республики Беларусь являлось ожидаемым. *Branchiobdella pentadonta* зарегистрирована на четырех видах европейских раков: *A. astacus*, *P. leptodactylus*, *A. pallipes*, *A. torrentium*, а также отмечалась на инвазивном *F. limosus*. Известно, что *B. pentadonta* может сосуществовать на одном хозяине с другими бранхиобделлидами, такими как *B. kozarovi*, *B. balcanica*, *B. astaci*, *B. parasita* и *B. hexadonta* [2]. В связи с этим стоит ожидать, что данный вид может иметь достаточно широкое распространение в популяциях раков в Беларуси, так как на территории страны все виды раков являются потенциальными хозяевами для *B. pentadonta*.

Бранхиобделлиды, вероятно, самая известная группа эпibiонтов, живущая совместно с раками. Большинство видов, описанных в Европе, считаются эпикомменсалами речных раков, но некоторые из них являются паразитами [3]. В опубликованной литературе взаимоотношения *B. pentadonta* с хозяевами часто описывали как паразитические [32]. Однако исследования в области питания *B. pentadonta* не предоставляют доказательств, что данный вид может причинять вред своим хозяевам [21]. Следовательно, нет оснований считать, что *B. pentadonta*, обитающая в популяции *A. astacus* из р. Доргомысль, является угрозой для данного редкого вида рака. Также существуют сведения, указывающие на положительное влияние бранхиобделлид на речных раков. Однако эти данные касаются американских и азиатских видов рачьих пиявок [6, 7]. Исследования, посвященные взаимоотношениям европейских видов бранхиобделлид с раками, ограничены и в основном описаны для паразита *B. astaci* [5, 33] и эктосимбионта *B. parasita* [3].

Взаимодействие с раками обязательно для эмбрионального развития рачьих пиявок [34]. Распределение бранхиобделлид напрямую зависит от ареала распространения хозяев, что способствует переносу генов и формирует генетическую структуру обоих компонентов взаимоотношений «хозяин–эктосимбионт». Известно, что сокращение числа популяций широкопалого рака привело к сильному снижению разнообразия *B. parasita* в исследованном регионе [30]. Учитывая тот факт, что в Беларуси быстро сокращаются популяции широкопалого рака [35], вместе с ними, вероятнее всего, исчезает и разнообразие их эпibiонтов, которое в настоящее время остается неизвестным. Описанная нами *B. pentadonta* из р. Доргомысль является первой регистрацией данного вида, а также первой описанной достоверной находкой бранхиобделлид в популяции широкопалого рака в республике. Обнаруженная нами популяция *B. pentadonta* заметно отличается размерным диапазоном от известных опубликованных данных, что представляет собой отдельный научный интерес в области изучения биоразнообразия, биологии сохранения и эволюционных взаимоотношений данного вида и речных раков.

Заключение. Таким образом, в популяции широкопалого рака из р. Доргомысль (Мстиславский р-н, Могилевская обл.) идентифицированы бранхиобделлиды, также известные как рачьи пиявки. Все обнаруженные экземпляры (101 особь) были определены как *B. pentadonta* по таким ключевым морфологическим признакам, как форма и размер тела, строение челюстного аппарата и количество зубов. Обнаруженная нами популяция *B. pentadonta* является эктосимбионтом, не наносящим вред широкопалому раку. В научно-исследовательском плане интерес представляет заметное различие размеров тела исследованных особей в сравнении с опубликованными данными. Обследованные нами бранхиобделлиды имели размеры тела от 0,5 до 1,8 мм, что значительно ниже, чем указано в других работах, посвященных данному виду.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Annelida (Clitellata): Oligochaeta, Branchiobdellida, Hirudinida and Acanthobdellida / F. R. Govedich, B. B. Bain, W. E. Moser [et al.] // Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. – 3rd ed. – Burlington, 2010. – Chap. 12. – P. 385–436. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374855-3.00012-1>

2. Subchev, M. A. The genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida, Clitellata, Branchiobdellida): a review of its European species / M. A. Subchev // Acta Zoologica Bulgarica. – 2014. – Vol. 66, N 1. – P. 5–20.
3. Grabda, E. The problems of parasitism of the species of the genus *Branchiobdella* Odier 1823 / E. Grabda, J. Wierzbicka // Polskie Archiwum Hydrobiologii. – 1969. – Vol. 16, N 1. – P. 179–183.
4. Wierzbicka, J. The food of *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida) dwelling on crayfish and the occurrence of the fish parasite *Argulus* Müller, 1785 (Crustacea) on the carapace of *Pontastacus leptodactylus* (Esch.) / J. Wierzbicka, P. Śmietana // Acta Ichthyologica et Piscatoria. – 1999. – Vol. 29, N 1. – P. 93–99. <https://doi.org/10.3750/aip1999.29.1.08>
5. Мажилис, А. А. О заболеваемости широкопалого рака в некоторых озерах Литвы / А. А. Мажилис, А. И. Григялис // Биология речных раков водоемов Литвы: сб. ст. / Акад. наук Лит. ССР, Ин-т зоологии и паразитологии; редкол.: Г. И. Мацквичене (отв. ред.) [и др.]. – Вильнюс, 1979. – С. 121–127.
6. Lee, J. H. Commensalism or mutualism: conditional outcomes in a branchiobdellid – crayfish symbiosis / J. H. Lee, T. W. Kim, J. C. Choe // Oecologia. – 2009. – Vol. 159, N 1. – P. 217–224. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1195-7>
7. Servants, scoundrels, and hitchhikers: current understanding of the complex interactions between crayfish and their ectosymbiotic worms (Branchiobdellida) / J. Skelton, K. J. Farrell, R. P. Creed [et al.] // Freshwater Science. – 2013. – Vol. 32, N 4. – P. 1345–1357. <https://doi.org/10.1899/12-198.1>
8. Fard, A. N. First report of *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 (Annelida: Clitellata) in Iran, and its distribution in the eastern Euro-Mediterranean subregion / A. N. Fard, S. R. Gelder // Acta zoologica bulgarica. – 2011. – Vol. 63, N 1. – P. 105–108.
9. Gelder, S. R. Distribution of native and exotic branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) on their respective crayfish hosts in northern Italy, with the first record of native *Branchiobdella* species on an exotic North American crayfish / S. R. Gelder, G. B. Delmastro, J. N. Rayburn // Journal of Limnology. – 1999. – Vol. 58, N 1. – P. 20–24. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.1999.20>
10. Subchev, M. A. Description of *Branchiobdella bulgariensis* sp. n. (Branchiobdellida) from Bulgaria / M. A. Subchev, B. Rimcheska // Acta zoologica bulgarica. – 2021. – Vol. 73, N 3. – P. 331–338.
11. Gelder, S. R. Description of *Branchiobdella turkestanensis* n. sp. (Annelida: Clitellata) following a reexamination of specimens in the Natural History Museum Vienna, Austria / S. R. Gelder // Zootaxa. – 2024. – Vol. 5477, N 5. – P. 579–586. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5477.5.5>
12. Native European branchiobdellids on non-native crayfishes: Report from the Czech Republic / M. Bláha, F. Ložek, M. Buřič [et al.] // Journal of Limnology. – 2018. – Vol. 77, N 1. – P. 164–168. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1679>
13. Subchev, M. A. *Branchiobdella* (Annelida: Clitellata) Species Found in the Crayfish Collection of the Natural History Museum of Denmark / M. A. Subchev // Acta zoologica bulgarica. – 2013. – Vol. 65, N 4. – P. 571–572.
14. Бошко, Е. Г. Малощетинковые черви речных раков некоторых водоемов Украины. Сообщение 1. Сем. Branchiobdellidae / Е. Г. Бошко // Вестник зоологии. – 1983. – Т. 17, № 2. – С. 13–20.
15. Колесникова, М. Ю. Новые сведения о распространении бранхиобделлид (Clitellata: Branchiobdellida) в водоемах Харьковской области / М. Ю. Колесникова // Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия: Биология. – 2007. – Вып. 6, № 788. – С. 97–103.
16. Кесслер, К. Ф. Русские речные раки / К. Ф. Кесслер. – СПб.: Тип. В. Безобразова и К°, 1875. – 94 с.
17. Скуратович, Е. Г. Регистрация *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 в популяции длиннопалого рака из Краснослободского водохранилища (Солигорский район, Минская область) / Е. Г. Скуратович, К. Сливинска // Зоологические чтения: материалы VII Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию д-ра биол. наук И. Н. Сержанина, Гродно, 22–24 марта 2023 г. / Гродн. гос. ун-т им. Я. Купалы; редкол.: О. В. Янчуревич (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2023. – С. 268–269.
18. Neseemann, H. Süßwasserfauna von Mitteleuropa Bd.6/2, Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea / H. Neseemann, E. Neubert. – Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verl., 1999. – 192 p.
19. Subchev, M. A. A new branchiobdellid – *Branchiobdella kozarovi* sp. n. (Oligochaeta, Branchiobdellidae) from Bulgaria / M. A. Subchev // Acta zoologica bulgarica. – 1978. – Vol. 9. – P. 78–80.
20. The Genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Branchiobdellida) in Lithuania, with an Overview and an Identification Key to the Species in the Baltic Countries / M. A. Subchev, G. Vaitonis, G. Višinskienė [et al.] // Acta Zoologica Bulgarica. – 2024. – Vol. 76, N 1. – P. 3–10.
21. Karaman, S. M. Beitrag zur Kenntnis der europaischen Branchiobdelliden (Clitellata, Branchiobdelloidea) / S. M. Karaman // Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie. – 1970. – Vol. 55, N 3. – P. 325–333.
22. Whitman, C. O. A new species of *Branchiobdella* / C. O. Whitman // Zoologischer Anzeiger. – 1982. – Vol. 5. – P. 636–637.
23. Gelder, S. R. A report on branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and a taxonomic key to the species in northern Italy, including the first record of *Cambarincola mesochoreus* on the introduced American red swamp crayfish / S. R. Gelder, G. B. Delmastro, M. Ferraguti // Bollettino di zoologia. – 1994. – Vol. 61, N 2. – P. 179–183. <https://doi.org/10.1080/11250009409355880>
24. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates / eds.: D. C. Rogers, J. H. Thorp. – Oxford: Academic Press, 2019. – 945 p.
25. Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России / под ред.: В. Р. Алексеева, С. Я. Цалолыхина. – М.: СПб.: Т-во науч. изд. КМК, 2016. – Т. 2. – 456 с.
26. Чекановская, О. В. Водные малощетинковые черви фауны СССР / О. В. Чекановская. – М., Л.: Изд-во Акад. наук СССР, 1962. – 411 с.
27. Mousseau, T. A. Adaptation to seasonality in a cricket: Patterns of phenotypic and genotypic variance in body size and diapause expression along a cline in season length / T. A. Mousseau, D. A. Roff // Evolution. – 1989. – Vol. 43, N 7. – P. 1483–1496. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02598.x>
28. Первый опыт содержания яйценосных самок и получения личинок широкопалого рака на сбросной подогретой воде теплоэлектростанции / В. Ф. Кулеш, А. В. Алехнович, В. И. Кожух [и др.] // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2011. – № 4. – С. 59–63.
29. Kincaid, H. L. Inbreeding in fish populations used for aquaculture / H. L. Kincaid // Aquaculture. – 1983. – Vol. 33, N 1–4. – P. 215–227. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90402-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90402-7)
30. Declining populations of *Astacus astacus* drag European *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata) ectosymbionts to serious biodiversity loss / M. Szenejko, P. Eljasik, R. Panicz, P. Śmietana // Global Ecology and Conservation. – 2023. – Vol. 48. – P. e02719. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02719>

31. Neesemann, H. Die Krebssegel im Gebiet der Oberen Donau (Österreich, Deutschland) mit Bestimmungsschlüssel zu den europäischen Arten (Clitellata, Branchiobdellida) / H. Neesemann // *Lauterbornia*. – 1994. – Vol. 19. – P. 79–93.
32. Цукерзис, Я. М. Речные раки / Я. М. Цукерзис. – Вильнюс: Мокслас, 1989. – 140 с.
33. First Report of *Branchiobdella astaci* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) in Greece, with an overview of its geographical distribution in Europe and an assessment of its pathogenicity on the host / M. A. Subchev, A. S. Sapounidis, P. Papadopoulou, E. T. Koutrakis // *Acta Zoologica Bulgarica*. – 2020. – Vol. 72, N 2. – P. 207–216.
34. Molecular phylogeny of branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and their host-epibiont association with *Austropotamobius* freshwater crayfish / I. Šarić, G. Klobučar, M. Podnar [et al.] // *Invertebrate Systematics* – 2018. – Vol. 32, N 1. – P. 55–68. <https://doi.org/10.1071/isi17028>
35. Чёрная книга инвазивных видов животных Беларуси / В. П. Семенченко, С. В. Буга, А. В. Алехнович [и др.]; редкол.: В. П. Семенченко, С. В. Буга. – Минск: Беларус. навука, 2020. – 164 с.

References

1. Govedich F. R., Bain B. A., Moser W. E., Gelder S. R., Davies R. W., Brinkhurst R. O. Annelida (Clitellata): Oligochaeta, Branchiobdellida, Hirudinida and Acanthobdellida. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 3rd ed. Burlington, 2010, chap. 12, pp. 385–436. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374855-3.00012-1>
2. Subchev M. A. The genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida, Clitellata, Branchiobdellida): a review of its European species. *Acta Zoologica Bulgarica*, 2014, vol. 66, no. 1, pp. 5–20.
3. Grabda E., Wierzbicka J. The problems of parasitism of the species of the genus *Branchiobdella* Odier 1823. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 1969, vol. 16, no. 1, pp. 179–183.
4. Wierzbicka J., Śmietana P. The food of *Branchiobdella* Odier, 1832 (Annelida) dwelling on crayfish and the occurrence of the fish parasite *Argulus* Müller, 1785 (Crustacea) on the carapace of *Pontastacus leptodactylus* (Esch.). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 1999, vol. 29, no. 1, pp. 93–99. <https://doi.org/10.3750/aip1999.29.1.08>
5. Mazhilis A. A., Grigyalis A. On the disease of the broad-clawed crayfish in some Lithuanian lakes. *Biologiya rechnykh rakov vodoemov Litvy: sbornik statei* [The biology of the crayfish of the Lithuanian inner waters: collection of scientific works: collection of articles]. Vilnius, 1979, pp. 121–127 (in Russian).
6. Lee J. H., Kim T. W., Choe J. C. Commensalism or mutualism: conditional outcomes in a branchiobdellid – crayfish symbiosis. *Oecologia*, 2009, vol. 159, no. 1, pp. 217–224. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1195-7>
7. Skelton J., Farrell K. J., Creed R. P., Williams B. W., Ames C., Helms B. S., Stoekel J., Brown B. L. Servants, scoundrels, and hitchhikers: current understanding of the complex interactions between crayfish and their ectosymbiotic worms (Branchiobdellida). *Freshwater Science*, 2013, vol. 32, no. 4, pp. 1345–1357. <https://doi.org/10.1899/12-198.1>
8. Fard A. N., Gelder S. R. First report of *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 (Annelida: Clitellata) in Iran, and its distribution in the eastern Euro-Mediterranean subregion. *Acta Zoologica Bulgarica*, 2011, vol. 63, no. 1, pp. 105–108.
9. Gelder S. R., Delmastro G. B., Rayburn J. N. Distribution of native and exotic branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) on their respective crayfish hosts in northern Italy, with the first record of native *Branchiobdella* species on an exotic North American crayfish. *Journal of Limnology*, 1999, vol. 58, no. 1, pp. 20–24. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.1999.20>
10. Subchev M. A., Rimcheska B. Description of *Branchiobdella bulgariensis* sp. N. (Branchiobdellida) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 2021, vol. 73, no. 3, pp. 331–338.
11. Gelder S. R. Description of *Branchiobdella turkestanensis* n. sp. (Annelida: Clitellata) following a reexamination of specimens in the Natural History Museum Vienna, Austria. *Zootaxa*, 2024, vol. 5477, no. 5, pp. 579–586. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5477.5.5>
12. Bláha M., Ložek F., Buřič M., Kouba A., Kozák P. Native European branchiobdellids on non-native crayfishes: Report from the Czech Republic. *Journal of Limnology*, 2018, vol. 77, no. 1, pp. 164–168. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1679>
13. Subchev M. A. *Branchiobdella* (Annelida: Clitellata) Species Found in the Crayfish Collection of the Natural History Museum of Denmark. *Acta Zoologica Bulgarica*, 2013, vol. 65, no. 4, pp. 571–572.
14. Boshko E. G. Oligochaets inhabiting freshwater crayfishes in some waters in Ukraine. Report I. Branchiobdellidae. *Vestnik zoologii* [Bulletin of Zoology], 1983, vol. 17, no. 2, pp. 13–20 (in Russian).
15. Kolesnikova M. Yu. New information on branchiobdellidans (Clitellata: Branchiobdellida) distribution in pools of Khar'kov region. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V. N. Karazina. Seriya Biologiya* [Bulletin of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology], 2007, vol. 6, no. 788, pp. 97–103. (in Russian).
16. Kessler K. F. *Russian river crayfish*. St. Petersburg, Printing house of V. Bezobrazov and Co., 1875. 94 p. (in Russian).
17. Skuratovich E. G., Slivinska K. Registration of *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 in the population of long-clawed crayfish from the Krasnoslobodsk reservoir (Soligorsk district, Minsk region). *Zoologicheskie chteniya: materialy VII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 125-letiyu vydavushchegosya zoologa, doktora biologicheskikh nauk, Ivana Nikolaevicha Serzhanina (22–24 marta 2023 goda, Grodno)* [Zoological readings: materials of the VII international scientific and practical conference dedicated to the 125th anniversary of the outstanding zoologist, doctor of biological sciences, Ivan Nikolaevich Serzhanin (March 22–24, 2023, Grodno)]. Grodno, 2023, pp. 268–269 (in Russian).
18. Neesemann H., Neubert E. *Süßwasserfauna von Mitteleuropa. Annelida. Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 1999, 192 p.
19. Subchev M. A. A new branchiobdellid – *Branchiobdella kozarovi* sp. N. (Oligochaeta, Branchiobdellidae) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 1978, vol. 9, pp. 78–80.
20. Subchev M. A., Vaitonis G., Višinskienė G., Rimcheska B. J., Vagalinski B. L. The Genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Branchiobdellida) in Lithuania, with an Overview and an Identification Key to the Species in the Baltic Countries. *Acta Zoologica Bulgarica*, 2024, vol. 76, no. 1, pp. 3–10.
21. Karaman S. M. Beitrag zur Kenntnis der europäischen Branchiobdelliden (Clitellata, Branchiobdelloidea). *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 1970, vol. 55, no. 3, pp. 325–333.

22. Whitman C. O. A new species of *Branchiobdella*. *Zoologischer Anzeiger*, 1982, vol. 5, pp. 636–637.
23. Gelder S. R., Delmastro G. B., Ferraguti M. A report on branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and a taxonomic key to the species in northern Italy, including the first record of *Cambarincola mesochoreus* on the introduced American red swamp crayfish. *Bollettino di zoologia*, 1994, vol. 61, no. 2, pp. 179–183. <https://doi.org/10.1080/11250009409355880>
24. Rogers D. C., Thorp J. H. (eds.). *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*. Oxford, Academic Press, 2019. 945 p.
25. Alekseev V. R., Tsalolikhin S. Ya. (eds.). *Key to zooplankton and zoobenthos in fresh waters of European Russia*. Moscow, St. Petersburg, Scientific Publications Association KMK, 2016, vol. 2. 457 p. (in Russian).
26. Chekanovskaya O. V. *Aquatic Oligochaeta of the U.S.S.R.* Moscow, Leningrad, Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1962. 411 p. (in Russian).
27. Mousseau T. A., Roff D. A. Adaptation to seasonality in a cricket: Patterns of phenotypic and genotypic variance in body size and diapause expression along a cline in season length. *Evolution*, 1989, vol. 43, no. 7, pp. 1483–1496. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02598.x>
28. Kulesh V. F., Alekhnovich A. V., Kozhukh V. I., Melekh Yu. N., Mikhovich I. D. The first experience of keeping ovigerous females and larva cultivation of noble crayfish in a waste-heat discharged water of a power station. *Rybovodstvo i rybnoe khozyaistvo* [Fish Farming and Fisheries], 2011, vol. 4, pp. 59–63 (in Russian).
29. Kincaid H. L. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture*, 1983, vol. 33, no. 1–4, pp. 215–227 [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90402-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90402-7)
30. Szenejko M., Eljasik P., Panicz R., Śmietana P. Declining populations of *Astacus astacus* drag European *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata) ectosymbionts to serious biodiversity loss. *Global Ecology and Conservation*, 2023, vol. 48, p. e02719. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02719>
31. Nesemann H. Die Krebssegel im Gebiet der Oberen Donau (Österreich, Deutschland) mit Bestimmungsschliissel zu den europiischen Arten (Clitellata, Branchiobdellida). *Lauterbornia*, 1994, vol. 19, pp. 79–93.
32. Tsukerzis Ya. M. *River crayfish*. Vilnius, Mokslas Publ., 1989. 140 p. (in Russian).
33. Subchev M. A., Sapounidis A. S., Papadopoulou P., Koutrakis E. T. First Report of *Branchiobdella astaci* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) in Greece, with an overview of its geographical distribution in Europe and an assessment of its pathogenicity on the host. *Acta Zoologica Bulgarica*, 2020, vol. 72, no. 2, pp. 207–216.
34. Šarić I., Klobučar G., Podnar M., Štambuk A., Maguire I. Molecular phylogeny of branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and their host-epibiont association with *Austropotamobius* freshwater crayfish. *Invertebrate Systematics*, 2018, vol. 32, no. 1, pp. 55–68. <https://doi.org/10.1071/is17028>
35. Semenchenko V. P., Buga S. V., Alekhnovich A. V., Baryshnikova S. V., Boiko S. V., Borodin O. I. [et al.]. *Black Book of Belarus invasive species of animals*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2016. 105 p. (in Russian).

Информация об авторах

Скуратович Елена Григорьевна – науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.g.skuratovich@gmail.com

Сливинска Каролина – науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: karolina.sliwinska@outlook.com

Information about the authors

Elena G. Skuratovich – 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: e.g.skuratovich@gmail.com

Karolina Śliwińska – 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: karolina.sliwinska@outlook.com