

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2025. Т. 70, № 4

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2025. Т. 70, № 4

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

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

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

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

Главный редактор

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

Редакционная коллегия

- А. В. Кильчевский** (*заместитель главного редактора*) – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
М. Е. Никифоров (*заместитель главного редактора*) – Научно-практический центр Национальной академии наук 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** – Даугавпилсский 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-Пяэцка** – Варшавский университет естественных наук, Варшава, Республика Польша
- О. Н. Пугачев** – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- А. И. Рапопорт** – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвийская Республика
- И. А. Тихонович** – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Адрес редакции:

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

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2025. Т. 70, № 4.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *Т. В. Смирнова*

Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 10.10.2025. Выход в свет 28.10.2025. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 72 экз. Заказ 196.

Цена номера: индивидуальная подписка – 15,16 руб., ведомственная подписка – 34,53 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. 4

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

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

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

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

Editor-in-Chief

Oleg Yu. Baranov – Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

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

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

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. Torchik – 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. 4.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

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

Sent for press 10.10.2025. Output 28.10.2025. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
 Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 72 copies. Order 196.
 Number price: individual subscription – 15.16 byn., departmental subscription – 34.53 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

Падутов В. Е., Можаровская Л. В., Кулагин Д. В., Падутов А. В., Кусенкова М. П. Микросателлитный анализ эмбриогенных линий ели европейской <i>Picea abies</i> (L.) Karst.	271
Нестюк А. М., Пантелеев С. В., Падутов А. В., Баранов О. Ю. Аллельное разнообразие промотора гена лейкоантоцианидинредуктазы (<i>PaLAR3</i>) ели европейской в Беларуси.....	284
Орловская О. А., Яцевич К. К., Милько Л. В., Кильчевский А. В. Ассоциация генов, контролирующих синтез крахмала, с основными признаками продуктивности у линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала.....	293
Мацкевич В. С., Демидчик В. В. Изменение уровня экспрессии генов, кодирующих системы стрессового ответа, в корнях <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. под действием токсических уровней Ni^{2+} в среде и влияние на него экзогенного L-гистидина.....	304
Торчик В. И., Слесаренко М. О. Влияние факторов физической природы на всхожесть семян и развитие трехлетних саженцев лиственницы ширококешуйчатой (<i>Larix × eurolepis</i> Henry.).....	316
Биричевская Л. Л., Дайнеко А. В., Шеколова А. С., Зинченко А. И. Ферментативный одnoreакторный препаративный синтез 6-тио-2'-дезоксигуанозина.....	321
Самович Т. В., Чепелева Е. В., Козел Н. В. Каротиногенез в клетках <i>Dunaliella salina</i> штамма IBCE D-1 при культивировании на модифицированных средах в условиях разной освещенности.....	331
Митюкова Т. А., Басалай А. А., Кузнецова Т. Е., Полулях О. Е., Костюченко Н. С. Подходы к коррекции тиреоидного статуса у самок крыс с висцеральным ожирением.....	341

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

CONTENTS

Padutov V. E., Mozharovskaya L. V., Kulagin D. V., Padutov A. V., Kusenkov M. P. Microsatellite analysis of embryogenic lines of the norway spruce <i>Picea abies</i> (L.) Karst.	271
Niastsiuk A. M., Panteleev S. V., Padutov A. V., Baranov O. Yu. Allelic diversity of the Norway spruce leucoanthocyanidin reductase gene (<i>PaLAR3</i>) promoter in Belarus	284
Orlovskaya O. A., Yatsevich K. K., Milko L. V., Kilchevsky A. V. Association of genes controlling starch synthesis with main productivity traits in common wheat lines with the introgressions of the alien genetic material	293
Mackievic V. S., Demidchik V. V. Alterations in expression of stress-responsive genes in <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. roots induced by toxic Ni^{2+} levels and joint application of Ni^{2+} and L-histidine	304
Torchik V. I., Slesarenka M. O. The influence of physical factors on the germination of seeds and the development of three-year-old seedlings of broad-scaled larch (<i>Larix × eurolepis</i> Henry.)	316
Birycheuskaya L. L., Daineka H. V., Shchokalava N. S., Zinchenko A. I. One-pot enzymatic preparative synthesis of 6-thio-2'-deoxyguanosine	321
Samovich T. V., Chepeleva E. V., Kozel N. V. Carotenogenesis in <i>Dunaliella salina</i> cells IBCE D-1 strain during cultivation on modified media under conditions of different illumination	331
Mityukova T. A., Basalai A. A., Kuznetsova T. E., Poluliakh O. Y., Kastsiuchenka M. S. Approaches to correct thyroid status in female rats with visceral obesity	341

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 630*165.7:631.532

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-271-283>

Поступила в редакцию 06.03.2025

Received 06.03.2025

**В. Е. Падутов, Л. В. Можаровская, Д. В. Кулагин,
А. В. Падутов, М. П. Кусенкова**

*Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель,
Республика Беларусь*

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ ЭМБРИОГЕННЫХ ЛИНИЙ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ *PICEA ABIES* (L.) KARST.

Аннотация. Соматический эмбриогенез (как метод микроклонального размножения) может быть использован для промышленного получения посадочного материала хвойных пород. По этой причине необходимо изучение различных генетических нарушений, возникающих в условиях *in vitro*, которые потенциально могут наследоваться получаемыми вегетативными потомками. В настоящей работе представлены результаты исследования соматической изменчивости и уровня миксоплоидности каллусных колоний и регенерантов шести эмбриогенных линий ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.). На различных этапах культивирования соответствующего растительного материала *in vitro* использовалась питательная среда ½ LM, которая дополнялась сахарозой и глутамином, а также, при необходимости, регуляторами роста 2,4-Д, 6-БАП, АБК, ИМК и активированным углем. Микросателлитный анализ образцов проводился с использованием пяти EST-SSR-маркеров: *Pa28*, *Pa33*, *Pa56*, *Pa47*, *Pa52*. Показано, что в образцах трех из шести эмбриогенных линий по локусу *Pa28* было выявлено более двух (три или четыре) аллельных вариантов. Кроме того, в ряде случаев изучаемые ткани имеют выраженные признаки миксоплоидии. Для сопоставления полученных данных проведен соответствующий микросателлитный анализ 33 естественно произрастающих средневозрастных деревьев ели европейской. Только у двух растений выявлены триплоидные клетки, что показывает значительно более низкий уровень геномных или хромосомных aberrаций, чем в культурах *in vitro*.

Ключевые слова: ель европейская, эмбриогенные линии, микросателлитный анализ, соматическая изменчивость, миксоплоидия

Для цитирования: Микросателлитный анализ эмбриогенных линий ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. / В. Е. Падутов, Л. В. Можаровская, Д. В. Кулагин [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 271–283. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-271-283>

**Vladimir E. Padutov, Ludmila V. Mozharovskaya, Dmitriy V. Kulagin,
Alexandr V. Padutov, Marina P. Kusenкова**

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

MICROSATELLITE ANALYSIS OF EMBRYOGENIC LINES OF THE NORWAY SPRUCE *PICEA ABIES* (L.) KARST.

Abstract. The method of somatic embryogenesis could be used for industrial production of clonal planting material. For this reason special attention is paid to the studies of various genetic disorders that arise *in vitro* because of their possibility to be inherited by the vegetative offsprings. In our investigation the levels of somaclonal variability and mixoploidy in callus colonies and plantlets of six embryogenic lines of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) were studied. ½ LM nutrient medium supplemented with sucrose and glutamine was used at different stages of plant tissues and plantlets *in vitro* cultivation. Growth regulators 2,4-D, 6-BAP, ABA, IMC and activated carbon were added to nutrient media if necessary. Microsatellite analysis of samples was carried out using five EST-SSR markers *Pa28*, *Pa33*, *Pa56*, *Pa47*, *Pa52*. It was shown that in samples of three of the six embryogenic lines, more than two (three or four) allelic variants were identified at the *Pa28* locus. In a number of cases, the tissues studied have pronounced signs of mixoploidy. Appropriate microsatellite analysis of samples collected from 33 middle-aged trees of Norway spruce from naturally formed forest stand was additionally carried out in order to compare the results with the data obtained earlier. Only two plants showed the presence of triploid cells, indicating a significantly lower level of genomic or chromosomal aberrations than observed in *in vitro* cultures.

Keywords: Norway spruce, embryogenic lines, microsatellite analysis, somaclonal variability, mixoploidy

For citation: Padutov V. E., Mozharovskaya L. V., Kulagin D. V., Padutov A. V., Kusenкова M. P. Microsatellite analysis of embryogenic lines of the Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. *Vesti Natsyional'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 271–283 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-271-283>

Введение. Диплоидный хромосомный набор ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.), как и у большинства хвойных, включает 24 хромосомы [1]. Размер генома оценивается на уровне $2,0 \cdot 10^{10}$ п. н., частота встречаемости однонуклеотидных замен (SNP) составляет около 0,77 %, коротких инсерций и делеций – 0,05 % [2]. Несмотря на большой размер геномов у голосеменных, который в основном находится в диапазоне от $2,0 \cdot 10^{10}$ до $3,0 \cdot 10^{10}$ п. н. [3], он отличается высокой стабильностью в большинстве таксономических групп. Частота устойчивых хромосомных aberrаций среди представителей семейства Pinaceae относительно невелика, хотя в редких случаях обнаруживаются индивиды хвойных деревьев с повышенной пloidностью, достигшие взрослого состояния [4]. Растения, характеризующиеся как поли-, анеу- или миксоплоиды, в большинстве случаев отличаются сниженной жизнеспособностью по сравнению с диплоидами, обладают рядом аномальных признаков и способны расти обычно только в условиях культуры [5, 6]. При целенаправленном поиске тетраплоидов среди семенного потомства *Picea glauca* (Moench) Voss. и *P. mariana* (Mill.) Britt. они обнаруживались с частотой 0,008 и 0,004 % соответственно [7]. Схожие результаты были получены и для ели европейской. В исследовании С. L. Kiellander [8] среди 1,2 млн семян в лесном питомнике было выделено 93 растения, отличающиеся аномальной морфологией, которые включали 1 триплоид, 22 тетраплоида, 3 миксоплоида и 18 индивидов, хромосомный набор которых установить не удалось. В то же время повышение частоты хромосомных aberrаций среди представителей ели европейской в естественных условиях отмечается на границах видового ареала или при воздействии стрессовых факторов. Например, в Болгарии в условиях Рило-Родопского горного района при анализе метафазных клеток у проростков ели европейской из лесхоза «Гърмен» было выявлено 8,5 % полиплоидных клеток (триплоидные и тетраплоидные), лесхоза «Елешница» – 7 %, лесхоза «Якоруда» – 17,6 %, лесхоза «Добриниште» – 10,6 %. Авторы предполагают, что нарушение числа хромосом (миксоплоидия), появление В-хромосом и хромосомные перестройки в тканях семенного потомства ели европейской в Рило-Родопском горном регионе Болгарии могут быть связаны с адаптацией популяций данного вида, произрастающих в высокогорье на южной границе ареала в зоне естественной радиоактивности [9]. В целом в исследованиях популяций видов хвойных из семейств Pinaceae и Cupressaceae, произрастающих в экстремальных условиях, хромосомная изменчивость часто выявляется на границах ареала, в экологических пределах распространения, а также в антропогенно нарушенных экосистемах и в условиях интродукции [10].

Со значительно большей частотой хромосомные aberrации могут появляться в ходе культивирования тканей и органов хвойных *in vitro*. Это явление носит название «сомаклональная изменчивость» [11]. *In vitro*-индуцированным изменениям может способствовать процедура культивирования тканей растений, состав питательной среды, тип и происхождение эксплантов или количество пассажей в ходе субкультивирования [12]. Так, в исследованиях И. Н. Третьяковой и О. В. Горячкиной с соавторами [13, 14], выполненных на гаплоидных эмбрионных культурах лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), показано наличие выраженной сомаклональной изменчивости. Все шесть изученных линий имели какие-либо мутационные изменения в одном или нескольких из 11 использованных микросателлитных локусов. Результаты соответствующих наблюдений, полученные на эмбрионных линиях и клонально размноженных индивидах ели европейской, имеют противоречивый характер. Одни авторы отмечают высокую стабильность генома и полное соответствие наследственных характеристик вегетативных потомков исходной форме [15, 16]. Другие – выявляют хромосомные aberrации у эмбрионных клеточных линий, культивируемых *in vitro* [10, 14, 15], хотя отмечают, что получаемое в этом случае вегетативное потомство, как правило, генетически однообразно. Эти авторы предполагают наличие хромосомных aberrаций как адаптацию растительного материала к условиям культивирования на клеточном уровне, указывая при этом на то, что у линий, имеющих различное происхождение, частота появления сомаклональной изменчивости может в значительной мере отличаться, а увеличение продолжительности этапа мультипликации эмбрионной культуры приводит к увеличению генотипической и фенотипической изменчивости [11, 17, 18]. Согласно единичным исследованиям представителей рода *Picea* частота сомаклональной изменчивости в вегетативном потомстве по фенотипическим признакам не превышала 2,0 % [11]. Исследованию генетических

нарушений, которые возникают в процессе соматического эмбриогенеза и могут в дальнейшем наследоваться растениями-регенерантами, уделяется особое внимание, поскольку этот метод размножения используется для промышленного получения клонального посадочного материала.

Целью данной работы являлся анализ микросателлитного профиля и генотипической гетерогенности эмбриогенных линий *P. abies* и полученных на их основе регенерантов для определения статуса пloidности клеток в культурах *in vitro* ели белорусского происхождения.

Объекты и методы исследования. Эмбриогенные клеточные линии, используемые в экспериментальных исследованиях, были получены в 2019 (линия 3, происхождение семенного материала – территория ГЛХУ «Червенский лесхоз») и 2021 гг. (линии 1 и 2, ГЛХУ «Жлобинский лесхоз»; линии 4–6, ГЛХУ «Коренёвская экспериментальная лесная база Института леса Национальной академии наук Беларуси») из зрелых зиготических зародышей. Культивирование каллусной ткани осуществляли в термостате при температуре 24 °С на питательной среде ½ LM [19], дополненной 2,4-Д (2,0 мг · л⁻¹), 6-БАП (0,5 мг · л⁻¹), сахарозой (10,0 г · л⁻¹) и глутамином (0,5 г · л⁻¹), гелеобразующий агент – фитогель (5,0 г · л⁻¹). Водородный показатель среды (рН) доводили до 5,8. Продолжительность пассажа составляла 10–14 дней. Созревание соматических зародышей состояло из двух фаз: (1) культивирование эмбриогенного каллуса в течение одной недели на питательной среде ½ LM без регуляторов роста с добавлением активированного угля (10,0 г · л⁻¹) и (2) культивирование на питательной среде ½ LM с повышенным содержанием сахарозы (34,0 г · л⁻¹) и фитогеля (6,0 г · л⁻¹). В качестве регуляторов роста использовали абсцизовую кислоту (30,0 мМ) и ИМК (1,0 мМ) [20, 21]. На этой стадии культуры поддерживали при 16-часовом фотопериоде, интенсивности света 0,2–0,4 клк и температуре 24 °С. Количество зрелых (с развитыми семядолями) соматических эмбрионидов подсчитывали из расчета на 1,0 г свежей массы эмбриогенного каллуса. Продолжительность этапа составляла пять недель. После периода созревания эмбриониды на семядольной стадии отделяли и помещали на среду для прорастания (½ LM без регуляторов роста), дополненную активированным углем (5 г · л⁻¹). Культивирование проходило при температуре 24 °С в течение двух недель в темноте, а в последующем на свету с интенсивностью освещения 0,5–2,0 клк до формирования проростков, имеющих выраженный побег и корень. В опытах использовали от 10 до 20 микрорастений на вариант. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программных средств Microsoft Excel 2007 и Statistica 10.0.

Выделение суммарной ДНК проводили СТАВ-методом [22]. Микросателлитный анализ образцов генотипов эмбриогенных линий ели европейской осуществляли с использованием пяти EST-SSR-маркеров: *Pa28*, *Pa33*, *Pa56*, *Pa47*, *Pa52* [23]. При ПЦР-диагностике применяли ПЦР-смесь на основе Taq/Pfu-ДНК полимераз. Один из праймеров для каждого из локусов на 5'-конце был мечен красителем Fam. Амплификацию проводили по стандартной программе для ПЦР-продуктов менее 300 п. о. [22]. Полученные ампликоны были проанализированы на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Анализ размера и количества ампликонов был произведен с помощью программного обеспечения Gene Mapper v.4.1 (Applied Biosystems, США).

Долю генотипической гетерогенности по SSR-маркерам рассчитывали на основе количественной оценки дисбаланса уровня амплификации аллельных вариантов по формуле:

$$AR = A_X / A_Y,$$

где AR – коэффициент титра аллелей (allele ratio); A_X – высота пика (титр) аллеля X на фореграмме; A_Y – высота пика (титр) аллеля Y на фореграмме.

Аллель с наибольшей высотой пика определяли как аллель X для получения значений ≥ 1 [23, 24]. При оценке хромосомных нарушений использовали коэффициент AR . Образцами с вероятной миксоплоидией при наличии двух аллелей косвенно могли считаться варианты в соотношении пиков, отличные от 1 : 1, 1 : 2 и 1 : 3, которые теоретически должны быть у ди-, три- и тетраплоидных клеток [24, 25].

Результаты и их обсуждение. В 2019 и 2021 гг. были получены линии ели европейской, которые характеризовались наличием полиэмбриогенных масс и способностью формировать полно-

ценные микрорастения. Культивирование осуществлялось в идентичных условиях. Для оценки морфогенного потенциала эмбриогенные линии субкультивировали на соответствующие каждому этапу среды и определяли продукцию соматических зародышей при созревании и последующее формирование микрорастений при прорастании. Обобщенные данные приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. **Морфометрические параметры микрорастений, полученные при созревании и прорастании соматических эмбриондов ели европейской**

Table 1. **Morphometric parameters of microplants obtained during the maturation and germination of somatic embryoids of Norway spruce**

Этап созревания	Этап прорастания		
Количество эмбриондов на 1 г каллусной ткани, шт.	Доля проростков с нормальной морфологией от общего количества, %	Размер побега (среднее $\pm$ ст. откл.), см	размер корня (среднее $\pm$ ст. откл.), см
Л1			
23,0	55,6	1,7 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,3
Л2			
9,0	44,4	0,9 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,1
Л3			
25,0	50,0	1,0 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2
Л4			
50,0	63,3	1,8 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2
Л5			
35,0	55,0	1,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1
Л6			
15,0	13,3	1,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 Л1, Л2, Л3, Л4, Л5, Л6 – линии № 1–6 соответственно.

Анализ результатов, представленных в табл. 1, показал, что доля эмбриондов, развивающихся в жизнеспособные растения, подвержена значительным колебаниям и составляет от 13,3 до 63,3 %. На этапе созревания способность клеточных линий к формированию соматических зародышей сильно варьировала между генотипами (от 9,0 до 50,0 эмбриондов на 1,0 г сырой массы исходной каллусной ткани). Аналогичная тенденция к проявлению изменчивости наблюдалась и после четырех недель культивирования микрорастений: на этапе прорастания средние размеры их надземной части составляли от 0,9 до 1,8 см, подземной – от 0,2 до 0,7 см.

Для генотипов каллусных колоний и проростков эмбриогенных линий ели европейской был проведен микросателлитный анализ. Результаты полученного SSR-профиля представлены в табл. 2. Для образцов генотипов эмбриогенной линии № 1 выявлены однофракционные электрофоретические спектры со следующими размерами продукта: 161 п. н. (локус *Pa28*), 99 п. н. (локус *Pa33*), 131 п. н. (локус *Pa56*), 111 п. н. (локус *Pa47*), 154 п. н. (локус *Pa52*). Наличие однофракционного электрофоретического спектра свидетельствует о гомозиготности исследуемых генотипов по анализируемым SSR-маркерам.

Среди анализируемых образцов эмбриогенной линии № 2 выявлены как однофракционные (111 п. н., локус *Pa47*; 154 п. н., локус *Pa52*), так и двухфракционные (161/167 п. н., локус *Pa28*; 99/101 п. н., локус *Pa33*; 126/131 п. н., локус *Pa56*) спектры, что соответствует гомозиготным или гетерозиготным генотипам по данным SSR-локусам соответственно. Проведен расчет доли генотипической гетерогенности по SSR-маркерам (*Pa28*, *Pa33*, *Pa56*), представленным двумя аллелями, с использованием количественной оценки дисбаланса уровня амплификации аллельных вариантов по коэффициенту *AR* [24–26]. Для образцов каллусных колоний, проростков с нормальной и аномальной морфологией линии № 2 по локусам *Pa28* и *Pa56* значения коэффициента титра аллелей близки к соотношению 1 : 1. По локусу *Pa33* во всех исследованных образцах

был отмечен выраженный дисбаланс аллельных вариантов, при этом значение AR находилось в пределах от 1 : 1,4 до 4,1 : 1. Интересно, что был получен весь спектр значений: 1 : 2, 1 : 3 и 1 : 4. Аллельный дисбаланс для каллусных культур линии № 2 и регенерируемых ими проростков может быть обусловлен полиморфизмом в области отжига праймеров, что приводит к различающимся значениям коэффициентов амплификации [24], или вызван какими-либо хромосомными нарушениями (например, миксоплоидностью) исследуемых образцов, так как подобные явления наблюдаются в ходе соматического эмбриогенеза [27, 28]. Учитывая то, что дисбаланс был существенным (кратным) во всех образцах, такая разница в соотношении титров (высоты пиков) аллелей, в соответствии с литературными данными [29, 30], скорее свидетельствует о соматической изменчивости, которая проявляется у эмбриогенной линии № 2 и в каллусной культуре, и в растениях-регенерантах.

Таблица 2. SSR-профиль эмбриогенных линий ели европейской
Table 2. SSR-profile of embryogenic lines of Norway spruce

Линия	Источник	SSR-маркер, размер продукта (п. н.)				
		<i>Pa28</i>	<i>Pa33</i>	<i>Pa47</i>	<i>Pa52</i>	<i>Pa56</i>
Л1	К1	161	99	111	154	131
	К2	161	99	111	154	131
	НП	161	99	111	154	131
	АП	161	99	111	154	131
Л2	К1	161/167	99/101	111	154	126/131
	К2	161/167	99/101	111	154	126/131
	НП	161/167	99/101	111	154	126/131
	АП	161/167	99/101	111	154	126/131
Л3	К1	161/164	99/101	111	154	120/131
	К2	161/164	99/101	111	154	120/131
	НП	161/164	99/101	111	154	120/131
	АП	161/164	99/101	111	154	120/131
Л4	К1	161/164/167	99	111	154	126/131
	К2	161/164/167	99	111	154	126/131
	НП	161/164/167	99	111	154	126/131
	АП	161/164/167	99	111	154	126/131
Л5	К1	155/161/164/167	99/101	111	154	126
	К2	155/161/164/167	99/101	111	154	126
	НП	155/161/164/167	99/101	111	154	126
	АП	155/161/164/167	99/101	111	154	126
Л6	К1	155/161/164/167	99	111	154	126/131
	К2	155/161/164/167	99	111	154	126/131
	НП	155/161/164/167	99	111	154	126/131
	АП	155/161/164/167	99	111	154	126/131

Примечание. К1 и К2 – каллусные колонии; НП – проростки с нормальной морфологией; АП – проростки с аномальной морфологией.

На основе микросателлитного анализа образцов эмбриогенной линии № 3, так же как и для линии № 2, детектированы однофракционные (111 п. н., локус *Pa47*; 154 п. н., локус *Pa52*) и двухфракционные (161/164 п. н., локус *Pa28*; 99/101 п. н., локус *Pa33*; 120/131 п. н., локус *Pa56*) спектры. Для всех образцов (каллусные колонии и проростки) эмбриогенной линии № 3 по локусам *Pa28*, *Pa33* и *Pa56* наблюдается соотношение дозы аллельных вариантов близкое к 1 : 1.

Микросателлитный анализ эмбриогенной линии № 4 по локусу *Pa28* показал наличие трех аллелей в изучаемых образцах, что говорит о триплоидном генотипе. Таким образом, в электро-

форетических спектрах присутствовали однофракционные (99 п. н., локус *Pa33*; 111 п. н., локус *Pa47*; 154 п. н., локус *Pa52*), двухфракционные (126/131 п. н., локус *Pa56*) и трехфракционные (161/164/167 п. н., локус *Pa28*) варианты. По локусу *Pa56* для образцов каллусных колоний и проростков отмечено соотношение близкое к 1 : 1. Для локуса *Pa28* у каллусных колоний (рис. 1) долевое участие среди аллелей (161/164/167 п. н.) соответствовало следующим соотношениям: для образца K1 – 3 : 1 : 1 (высоты пиков аллелей – 366 : 133 : 155), для образца K2 – 4 : 1 : 1 (высоты пиков аллелей – 465 : 117 : 122). В отличие от каллусных колоний для проростков с нормальной и аномальной морфологией отмечено значительное превалирование аллелей с размерами продукта 161 и 164 п. н. над аллелем 167 п. н.: 31 : 14 : 1 (высоты пиков аллелей – 1839 : 852 : 60) и 10 : 4 : 1 (высоты пиков аллелей – 667 : 252 : 67) соответственно (рис. 2). Не исключено, что наблюдаемое у проростков (рис. 2) проявление рецессивности аллеля длиной 167 п. н. микросателлитного локуса *Pa28* может быть связано с явлением «проскальзывания» полимеразы во время ПЦР-амплификации, которое приводит к образованию дополнительных ПЦР-продуктов (визуализируются как дополнительные пики («stutter» пики)), отличающихся от нужного продукта кратно длине повторяющейся единицы микросателлита [22, 31, 32]. «Stutter» пики могут давать 5–15 % погрешности в высоте и площади пиков, перекрывающихся с ними по размеру, а также могут диагностироваться до или после основного пика [31–33]. И если учитывать, что в каллусных культурах данный аллель встречается с частотой, сходной с аллелем 164 п. н., то, по-видимому, у проростков мы имеем дело не с появлением артефакта, а с проявлением какого-то варианта селективного отбора. В целом, принимая во внимание изменение дозы аллеля 167 п. н. в разных тканях, а также изменение в них же соотношений и других аллельных вариантов (161/164 п. н. – 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1) по одному и тому же микросателлитному локусу, по всей видимости, эмбриогенную линию № 4 следует рассматривать как миксоплоид.

Для образцов эмбриогенных линий № 5 и 6 характерно наличие четырех аллелей по локусу *Pa28*, что свидетельствует о тетраплоидном генотипе. При анализе SSR-профиля локуса *Pa28*

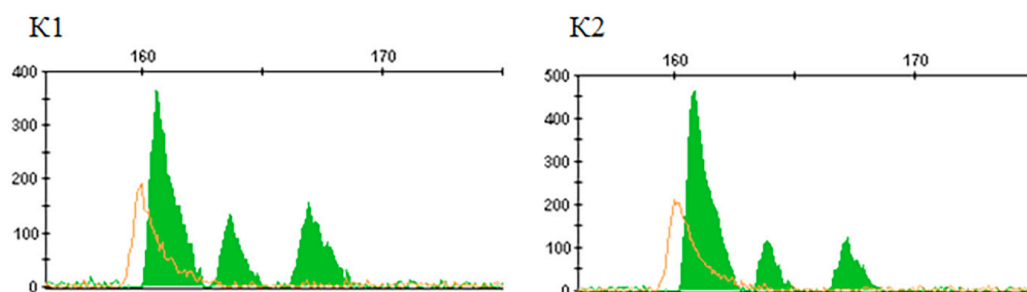


Рис. 1. Микросателлитный спектр по локусу *Pa28* каллусных колоний K1 и K2 эмбриогенной линии № 4 ели европейской

Fig. 1. Microsatellite spectrum for the *Pa28* locus of callus colonies K1 and K2 of embryogenic line No. 4 of Norway spruce

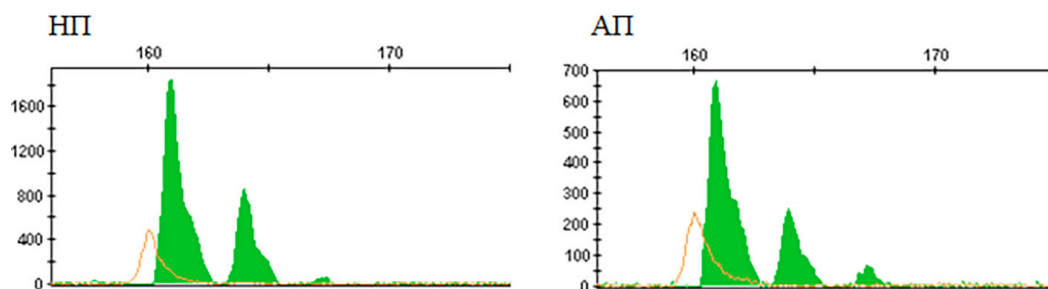


Рис. 2. Микросателлитный спектр по локусу *Pa28* проростков с нормальной (НП) и аномальной (АП) морфологией эмбриогенной линии № 4 ели европейской

Fig. 2. Microsatellite spectrum for the *Pa28* locus of seedlings with normal (NP) and abnormal (AP) morphology of embryogenic line No. 4 of Norway spruce

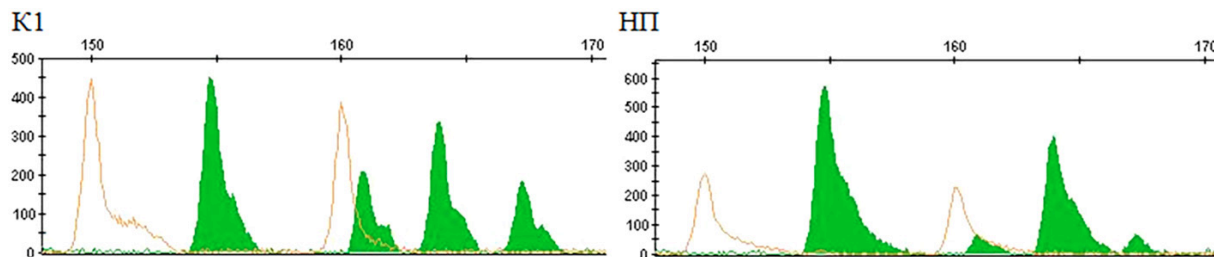


Рис. 3. Микросателлитный спектр по локусу *Pa28* каллусных колоний К1 и проростков с нормальной (НП) морфологией эмбрионной линии № 5 ели европейской

Fig. 3. Microsatellite spectrum for the *Pa28* locus of K1 callus colonies and seedlings with normal (NP) morphology of the embryogenic line No. 5 of Norway spruce

у обеих линий отмечено значительное превалирование аллелей с размерами продукта 155 и 164 п. н. над аллелями 161 и 167 п. н. – высота пиков электрофоретических спектров больше в 2–14 раз (рис. 3). Значительное варьирование в соотношении титров (высоты пиков) аллелей позволяет предположить миксплоидию для обеих эмбрионных линий. По локусу *Pa33*, который был полиморфен у линии № 5, наблюдается выраженный дисбаланс для аллельных вариантов 99 и 101 п. н. по всем проанализированным образцам: от 2 : 1 до 5 : 1. У линии № 6 еще одним (кроме *Pa28*) полиморфным локусом являлся *Pa56*, соотношение доз аллельных вариантов 126 и 131 п. н. для всех образцов было примерно 1 : 1.

В целом электрофоретические профили изучаемых локусов образцов эмбрионных линий № 1–3 содержали одно- и двухфракционные спектры, что соответствует диплоидному набору хромосом, в случае которого выявляются однофракционные (генотип A_xA_x или A_x0) или двухфракционные SSR-спектры (A_xA_y). Для проростков с аномальной морфологией эмбрионной линии № 2 соотношения высоты пиков по локусу *Pa33* аллелей в 99 и 101 п. н. сильно варьируют, что может быть связано с миксплоидностью, однако такие же различия в соотношении пиков не наблюдаются по другому локусу с двумя аллельными вариантами (по *Pa28* соотношения аллельных вариантов по всем образцам – приблизительно 1 : 1). Повышенное появление гомозигот в некоторых SSR-локусах косвенно подтверждает гипотезу о селективном давлении, которое может быть вызвано преимуществами рецессивных или доминантных гомозигот. Так, в работе S. Fluch с соавторами [23] при исследовании ели европейской положительный отбор был подтвержден для двух SSR-локусов, которые показали высокую частоту гомозигот.

Для эмбрионной линии № 4 отмечаются электрофоретические профили, представленные одной, двумя и тремя фракциями (локус *Pa28*). Схожие результаты были получены в работе Т. А. Гродецкой с соавторами [24] при молекулярно-генетической оценке растений клонов осины (*Populus tremula* L.) и тополя белого (*P. alba* L.), для которых на основе кариологического и микросателлитного анализов проведено определение пloidности. В данной работе электрофоретические профили генотипов тополя белого, содержащие три набора хромосом, были представлены одной (генотип $A_xA_xA_x$ или A_x00), двумя ($A_xA_xA_y$ или A_xA_y0) или тремя ($A_xA_yA_z$) фракциями. Исходя из этого, можно предположить, что исследуемая нами эмбрионная линия № 4 может иметь триплоидный генотип. Эмбрионные линии № 5 и 6, кроме одно- и двухфракционных SSR-спектров, по локусу *Pa28* были представлены четырехаллельными вариантами – наличием электрофоретического спектра с четырьмя фракциями, что соответствует тетраплоидному числу хромосом. Как для эмбрионной линии № 4 с тремя аллелями по локусу *Pa28*, так и для линий № 5 и 6 с четырьмя аллельными вариантами по этому же SSR-маркеру отмечен выраженный дисбаланс аллелей, что позволяет предполагать наличие миксплоидии. Миксплоидность чаще встречается при генерировании каллусных культур, чем у растений, однако в исследованиях ели европейской естественного происхождения также отмечено наличие у проростков клеток с разной пloidностью, а также с хромосомными перестройками [9, 34]. Учитывая то, что из шести проанализированных линий ели европейской три имели клетки с отличающимся от диплоидного набором хромосом, нельзя однозначно утверждать об отсутствии хромосомных aberrаций

у линий № 1–3. Отсутствие у них трех- или четырехфракционных спектров может быть связано с ограниченным числом используемых SSR-маркеров для анализа. Для дальнейшей оценки однородности тканей таких эмбрионных линий необходимо использовать также и цитогенетические методы исследования.

Для проведения сравнительного анализа кроме эмбрионных линий нами был дополнительно изучен SSR-профиль (по аналогичным микросателлитным маркерам *Pa28*, *Pa33*, *Pa47*, *Pa52* и *Pa56*) 33 генотипов средневозрастных деревьев ели европейской (табл. 3) естественно произрастающих на территории Беларуси (ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз»). Для SSR-анализа использовались ткани хвои.

Как следует из табл. 3, по локусу *Pa28* встречалось пять аллелей (155, 161, 164, 167 и 173 п. н.). Для 11 деревьев было выявлено по одному аллельному варианту, для 20 – по два, для 2 – по три. Причем в случае трехаллельных образцов доленое участие вариантов было сходным: 1 : 1 : 1. По локусу *Pa33* у естественно произрастающих деревьев, как и у эмбрионных линий, встречалось два аллеля с размерами продукта 99 и 101 п. н. Среди исследуемых генотипов 29 были представлены одним аллельным вариантом, 5 являлись двухфракционными, среди которых присутствовал генотип с дисбалансом аллельных вариантов. В отличие от эмбрионных линий, для которых по локусам *Pa47* и *Pa52* были выявлены только однофракционные спектры (111 и 154 п. н. соответственно), для деревьев отмечены генотипы с двумя аллельными вариантами: размеры продукта 109/111 п. н. и 111/121 п. н. по локусу *Pa47*, 133/154 п. н. – по локусу *Pa52*. Для гетерозиготных деревьев по локусу *Pa47* идентифицированы образцы с соотношением аллелей 1 : 2 (два генотипа) и 1 : 3 (один генотип), по локусу *Pa52* – 1 : 3 (три генотипа). Анализ электрофоретического спектра SSR-локуса *Pa56* генотипов естественно произрастающих деревьев ели европейской, аналогично эмбрионным линиям, выявил три аллельных варианта (120, 126 и 131 п. н.) и присутствие генотипов с однофракционным и двухфракционным спектром. В целом по результатам микросателлитного анализа 33 деревьев из насаждений ели европейской по 5 EST-SSR маркерам число образцов с тремя аллелями составило 6,1 % (два генотипа), у нескольких деревьев выявлен дисбаланс аллельных вариантов.

Т а б л и ц а 3. SSR-профиль 33 генотипов естественно произрастающих деревьев ели европейской

Table 3. SSR-profile of 33 genotypes of naturally growing Norway spruce trees

N_a	SSR-маркер, размер продукта (п. н.) – число образцов				
	<i>Pa28</i>	<i>Pa33</i>	<i>Pa47</i>	<i>Pa52</i>	<i>Pa56</i>
1	155 – 1 161 – 6 164 – 2 167 – 2	99 – 28 101 – 1	111 – 28	154 – 22	126 – 3 131 – 8
2	155/161 – 3 155/164 – 4 161/164 – 8 161/167 – 2 164/167 – 1 167/173 – 2	99/101 – 4	109/111 – 4 111/121 – 1	133/154 – 11	120/131 – 5 126/131 – 17
3	155/161/164 – 1 161/164/167 – 1	–	–	–	–

П р и м е ч а н и е. N_a – число аллельных вариантов у генотипа.

Результаты сравнения SSR-профилей образцов эмбрионных линий и естественно произрастающих деревьев показывают, что они согласуются для локусов *Pa33*, *Pa47*, *Pa52*, *Pa56* как по размерам продукта, так и по оценке дисбаланса уровня амплификации аллельных вариантов. По локусу *Pa28* у эмбрионных линий установлено присутствие трех- (линия № 4) и четырехфракционных спектров (линии № 5 и 6), у естественно произрастающих деревьев выявлены генотипы с тремя аллелями. По локусам *Pa33*, *Pa47* и *Pa52* у ряда проанализированных образцов

выявлены спектры аллельных вариантов, кратно отличающиеся от соотношения 1 : 1, что может косвенно свидетельствовать о миксоплоидии.

Заключение. По результатам проведенного исследования установлено, что все проанализированные нами микросателлитные локусы ели европейской были полиморфны: *Pa33* и *Pa52* имели по два аллеля, *Pa47* и *Pa56* – по три, *Pa28* – по пять. Эмбрионные линии содержали основную часть аллельных вариантов, выявленных в природных популяциях (11 и 15 аллелей соответственно).

Среди 33 естественно произрастающих деревьев ели европейской были идентифицированы два генотипа (6,1 %) с тремя аллельными вариантами по локусу *Pa28*, при этом долевое участие вариантов в исследованных образцах было сходным, что говорит не только о наличии, но и преобладании триплоидных клеток. Как следует из литературных данных, при семенном размножении в лесных питомниках, а также в естественных популяциях среди хвойных видов в небольшом количестве встречаются миксоплоиды и полиплоиды, причем их число увеличивается в стрессовых условиях окружающей среды (край ареала, антропогенно нарушенные территории и т. д.), что авторы связывают с адаптацией растений к неблагоприятным и экстремальным условиям произрастания, интродукцией в новых условиях [9, 35–37].

Микросателлитный анализ каллусных колоний и проростков эмбрионных линий позволил предположить наличие разного уровня пloidности в культурах *in vitro* ели европейской. Изученные ткани линий № 1–3 идентифицированы как диплоидные, хотя наличие выраженного дисбаланса аллельных вариантов у линии № 2 по ряду локусов позволяет предположить наличие большого количества клеток с хромосомными aberrациями или разной пloidностью. Для линии № 4 выявлен триплоидный генотип, а для линий № 5 и 6 – тетраплоидный. Однако считать эти линии истинными полиплоидами затруднительно, поскольку высота пиков аллельных вариантов, и, следовательно, частота встречаемости клеток с теми или иными аллелями сильно различаются. Наиболее вероятным объяснением этого факта является миксоплоидность эмбрионных линий № 4–6, что составляет 50 % от проанализированных линий. Полученные нами данные показывают высокую вероятность возникновения соматоклональной изменчивости в культуре тканей *in vitro* у ели европейской.

Если в обсуждении выйти немного за пределы целевой установки исследования, то следует отметить следующее. Природа высокой частоты изменчивости данных линий может как иметь наследственный характер (зависеть от генотипа родительских деревьев), так и быть связана с условиями формирования эмбрионных линий и зиготических зародышей [38, 39]. Исследованные нами линии ели европейской культивировались в идентичных условиях, поэтому различия, выявленные между линиями, могут быть объяснены только влиянием генотипа, которое может обуславливаться не только степенью предрасположенности генома культивируемых клеток к повышенной мутабельности, но и генотипической гетерогенностью клеток родительских организмов, от которых происходят культуры *in vitro*. Для оценки последнего фактора необходимо проведение анализа родительских деревьев. Но и при этих условиях отцовский генотип может остаться скрытым от исследователя, если в работе используются семена, которые формируются в результате неконтролируемого опыления [40, 41]. Поэтому для оценки наследования дисбаланса аллельных вариантов необходимо получение каллусных культур из семян от контролируемого скрещивания родительских организмов, для которых известны их генетические паспорта.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Козубов, Г. М. Современные голосеменные: (морфолого-систематический обзор и кариология) / Г. М. Козубов, Е. Н. Муратова. – Л.: Наука, 1986. – 192 с.
2. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution / B. Nystedt, N. R. Street, A. Wetterbom [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 497, N 7451. – P. 579–584. <https://doi.org/10.1038/nature12211>
3. Efficient Multi-Sites Genome Editing and Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in *Picea glauca* / Y. Cui, J. Zhao, Y. Gao [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – Art. 751891. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.751891>
4. Бородин, Н. А. Полиплоидия в интродукции древесных растений / Н. А. Бородин. – М.: Наука, 1982. – 176 с.
5. Мацкевич, Н. В. Охрана редких генотипов лесных деревьев и кустарников / Н. В. Мацкевич. – М.: Агропромиздат, 1987. – 207 с.

6. Ohri, D. Polyploidy in Gymnosperms-A Reappraisal / D. Ohri // *Silvae Genetica*. – 2021. – Vol. 70, N 1. – P. 22–38. <https://doi.org/10.2478/sg-2021-0003>
7. Winton, L. L. Natural polyploidy in juvenile white and black spruce / L. L. Winton // *Minnesota Forestry Notes*. – 1964, N 144. – 2 p.
8. Kiellander, C. L. Polyploidy in *Picea abies* / C. L. Kiellander // *Hereditas*. – 1950. – Vol. 36, N 3. – P. 513–516.
9. Ташев, А. Н. Число хромосом и хромосомные перестройки у ели обыкновенной *Picea abies* (L.) Н. Karst. в лесах Рило-Родопского горного массива Болгарии / А. Н. Ташев, Т. С. Седельникова, А. В. Пименов // *Сибирский лесной журнал*. – 2015, № 5. – С. 77–86.
10. Karyological and Cytogenetic Studies of Coniferous Plants Growing under Extreme Conditions / E. N. Muratova, T. S. Sedel'nikova, O. V. Goryachkina, A. V. Pimenov // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2023. – Vol. 16, N 5. – P. 564–574. <https://doi.org/10.1134/S1995425523050074>
11. Гуляева, Е. Н. Соматическая изменчивость у хвойных в культуре *in vitro* / Е. Н. Гуляева, Р. В. Игнатенко, Н. А. Галибина // *Экологическая генетика*. – 2020. – Т. 18, № 3. – С. 301–315.
12. Sarmast, M. K. Somaclonal Variation in Conifers / M. K. Sarmast, Z. R. Ghaleh, M. Alizadeh // *Somaclonal Variation: Basic and Practical Aspects* / ed. C. Sánchez-Romero. – Cham, 2024. – P. 123–142. https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9_7
13. Megagametophyte *in vitro* tissue culture of *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* and somaclonal variation / I. Tretyakova, A. Ivanitskaya, M. Park [et al.] // *Proceedings of the 3rd International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on “Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies”*, Vitoria-Gasteiz, Spain, 8–12 September 2014 / eds.: Y. S. Park, J. M. Bonga. – 2015. – P. 45–57. – URL: <https://www.iufro.org/media/fileadmin/publications/proceedings-archive/20902-vitoria-gasteiz14-proceedings.pdf> (дата обращения: 10.02.2025).
14. Cytogenetic Stability of Young and Long-Term Embryogenic Cultures of *Larix sibirica* / O. V. Goryachkina, M. E. Park, I. N. Tretyakova [et al.] // *Cytologia*. – 2018. – Vol. 83, N 3. – P. 323–329. <https://doi.org/10.1508/cytologia.83.323>
15. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis / L. Harvengt, J. F. Trontin, I. Reymond [et al.] // *Planta*. – 2001. – Vol. 213, N 5. – P. 828–832. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>
16. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method / T. Hazubska-Przybyl, P. Chmielarz, M. Michalak [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC). – 2013. – Vol. 113. – P. 303–313. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0270-2>
17. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches / J. L. Fourre, P. Berger, L. Niquet, P. André // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – Vol. 94. – P. 159–169. <https://doi.org/10.1007/s001220050395>
18. Genetic variation in microsatellite stability of somatic embryo plants of *Picea abies*: A case study using six unrelated full-sib families / A. Helmersson, G. Jansson, P. V. Bozhkov, S. Von Arnold // *Scandinavian Journal of Forest Research*. – 2008. – Vol. 23, N 1. – P. 2–11. <https://doi.org/10.1080/02827580701820043>
19. Litvay, J. D. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) / J. D. Litvay, D. C. Verma, M. A. Johnson // *Plant Cell Reports*. – 1985. – Vol. 4, N 6. – P. 325–328. <https://doi.org/10.1007/bf00269890>
20. Морфогенез эмбрионных культур ели европейской белорусского происхождения на различных этапах культивирования / М. П. Кусенкова, Т. Пшибул-Хазубска, Д. В. Кулагин [и др.] // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси*. – Гомель, 2020. – Вып. 80. – С. 55–62.
21. Кусенкова, М. П. Прорастание соматических эмбрионов ели европейской, полученных при различной продолжительности культивирования эмбрионного каллуса на питательных средах для созревания / М. П. Кусенкова // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси*. – Гомель, 2021. – Вып. 81. – С. 169–177.
22. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
23. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.) / S. Fluch, A. Burg, D. Kopecky [et al.] // *BMC Research notes*. – 2011. – Vol. 4. – Art. 401. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-401>
24. Молекулярно-генетический анализ размноженных *in vitro* клонов *Populus alba* L. и *Populus tremula* L. с использованием микросателлитных маркеров / Т. А. Гродецкая, О. Ю. Баранов, С. Г. Ржевский [и др.] // *Лесотехнический журнал*. – 2021. – Т. 11, № 3. – С. 16–30.
25. Баранов, О. Ю. Использование молекулярно-генетических маркеров для анализа плоидности осины и березы / О. Ю. Баранов, В. Балюцкас // *Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси*. – Гомель, 2009. – Вып. 69. – С. 129–135.
26. Development of novel EST-SSR markers for ploidy identification based on *de novo* transcriptome assembly for *Misgurnus anguillicaudatus* / B. Feng, S. V. Yi, M. Zhang, X. Zhou // *PloS one*. – 2018. – Vol. 13, N 4. – P. e0195829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195829>
27. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn / A. Betekhtin, M. Rojek, J. Jaskowiak [et al.] // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12, N 3. – P. e0173537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537>
28. Somaclonal Variation – Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants / G. Duta-Cornescu, N. Constantin, D.-M. Pojoga [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, N 1. – Art. 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>
29. Шестибратов, К. А. Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы / К. А. Шестибратов, В. Г. Лебедев, А. И. Мирошников // *Биотехнология*. – 2008. – № 5. – С. 3–22.
30. Соматическая изменчивость *Iris pseudacorus* L. По данным RAPD- и цитогенетического анализа / М. М. Козыренко, Е. В. Артюхова, Е. В. Болтенков, Л. С. Лауве // *Биотехнология*. – 2004. – № 2. – С. 13–23.

31. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: $(CA/GT)_n$ and $(A/T)_n$ microsatellites / D. Shinde, Y. L. Lai, F. Z. Sun, N. Arnheim // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31, N 3. – P. 974–980. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg178>
32. Галинская, Т. В. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять / Т. В. Галинская, Д. М. Щепетов, С. Н. Лысенков // *Генетика*. – 2019. – Т. 55, № 6. – С. 617–632.
33. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples / D. Kristt, M. Israeli, R. Narinski [et al.] // *Journal of Biomolecular Techniques*. – 2005. – Vol. 16, N 4. – P. 378–389.
34. Седельникова, Т. С. Изменчивость числа хромосом как фактор микроэволюции и адаптации хвойных / Т. С. Седельникова // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2016. – Т. 18. – С. 24–28.
35. Князева, С. Г. Кариологический обзор хвойных растений на основе базы данных по хромосомным числам / С. Г. Князева, Е. Н. Муратова // *Хвойные бореальной зоны*. – 2010. – Т. 27, № 1–2. – С. 97–101.
36. Горячкина, О. В. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно нарушенных районах г. Красноярска и его окрестностей / О. В. Горячкина, О. А. Сизых // *Хвойные бореальной зоны*. – 2012. – Т. 30, № 1–2. – С. 46–51.
37. Кунах, В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений / В. А. Кунах // *Биополимеры и клетка*. – 1995. – Т. 11. – № 6. – С. 5.
38. Kumar, P. S. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* / P. S. Kumar, V. L. Mathur // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2004. – Vol. 78, N 3. – P. 267–271. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025669.11442.3e>
39. Mishiba, K.-I. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. / K.-I. Mishiba, K.-I. Tawada, M. Mii // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. – 2006. – Vol. 42, N 1. – P. 83–88. <https://doi.org/10.1079/IVP2005724>
40. Шмаков, В. Н. Соматический эмбриогенез представителей рода *Larix*: состояние и перспективы / В. Н. Шмаков, Ю. М. Константинов // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2020. – Т. 24. – № 6. – С. 575–588.
41. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* in vitro / И. Н. Третьякова, М. Э. Пак, А. С. Иваницкая, Н. В. Орешкова // *Физиология растений*. – 2016. – Т. 63, № 6. – С. 812–822.

References

1. Kozubov G. M., Muratova E. N. *Modern gymnosperms: (morphological and systematic review and karyology)*. Leningrad, Nauka Publ., 1986. 192 p. (in Russian).
2. Nystedt B., Street N. R., Wetterbom A., Zuccolo A., Lin Y.-Ch., Scofield D. G., Vezzi F. [et al]. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 2013, vol. 497, no. 7451, pp. 579–584. <https://doi.org/10.1038/nature12211>
3. Cui Y., Zhao J., Gao Y., Zhao R., Zhang J., Kong L. Efficient Multi-Sites Genome Editing and Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in *Picea glauca*. *Frontiers in Plant Science*, 2021, vol. 12, art. 751891. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.751891>
4. Borodina N. A. *Polyploidy in the introduction of woody plants*. M., Nauka Publ., 1982. 176 p. (in Russian).
5. Matskevich N. V *Protection of rare genotypes of forest trees and shrubs*. M., Agropromizdat Publ., 1987. 207 p. (in Russian).
6. Ohri D. Polyploidy in Gymnosperms-A Reappraisal. *Silvae Genetica*, 2021, vol. 70, no. 1, pp. 22–38. <https://doi.org/10.2478/sg-2021-0003>
7. Winton L. L. Natural polyploidy in juvenile white and black spruce. *Minnesota Forestry Notes*, 1964, no. 144. 2 p.
8. Kiellander C. L. Polyploidy in *Picea abies*. *Hereditas*, 1950. vol. 36, no. 3, pp. 513–516.
9. Tashev A. N., Sedel'nikova T. S., Pimenov A. V. Chromosome number and chromosomal rearrangements in Norway spruce *Picea abies* (L.) H. Karst. in the forests of the Rila-Rhodope mountain range of Bulgaria. *Sibirskii lesnoi zhurnal* [Siberian Forest Journal], 2015, no. 5, pp. 77–86 (in Russian).
10. Muratova E. N., Sedel'nikova T. S., Goryachkina O. V., Pimenov A. V. Karyological and Cytogenetic Studies of Coniferous Plants Growing under Extreme Conditions. *Contemporary Problems of Ecology*, 2023, vol. 16, no. 5, pp. 564–574. <https://doi.org/10.1134/S1995425523050074>
11. Gulyaeva E. N., Ignatenko R. V., Galibina N. A. Somaclonal variability in conifers in vitro culture. *Ekologicheskaya genetika* [Ecological Genetics], 2020, vol. 18, no. 3, pp. 301–315 (in Russian).
12. Sarmast M. K., Ghaleh Z. R., Alizadeh M. Somaclonal Variation in Conifers. *Somaclonal Variation: Basic and Practical Aspects*. Cham, 2024, pp. 123–142. https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9_7
13. Tretyakova I., Ivanitskaya A., Park M., Voroshilova E., Oreshkova N., Krutovsky K. Megagametophyte in vitro tissue culture of *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* and somaclonal variation. *Proceedings of the 3rd International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on "Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies"*, Vitoria-Gasteiz, Spain, 8–12 September 2014. 2015, pp. 45–57. Available at: <https://www.iufro.org/media/fileadmin/publications/proceedings-archive/20902-vitoria-gasteiz14-proceedings.pdf> (accessed 10.02.2025).
14. Goryachkina O. V., Park M. E., Tretyakova I. N., Badaeva E. D., Muratova E. N. Cytogenetic Stability of Young and Long-Term Embryogenic Cultures of *Larix sibirica*. *Cytologia*, 2018, vol. 83, no. 3, pp. 323–329. <https://doi.org/10.1508/cytologia.83.323>
15. Harvengt L., Trontin J. F., Reymond I., Canlet F., Paques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta*, 2001, vol. 213, no. 5, pp. 828–832. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>

16. Hazubska-Przybyl T., Chmielarz P., Michalak M., Dering M., Bojarczuk K. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2013, vol. 113, pp. 303–313. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0270-2>
17. Fourre J. L., Berger P., Niquet L., Andre P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, vol. 94, pp. 159–169. <https://doi.org/10.1007/s001220050395>
18. Helmersson A., Jansson G., Bozhkov P. V., Von Arnold S. Genetic variation in microsatellite stability of somatic embryo plants of *Picea abies*: A case study using six unrelated full-sib families. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2008, vol. 23, no. 1, pp. 2–11. <https://doi.org/10.1080/02827580701820043>
19. Litvay, J. D., Verma D. C., Johnson M. A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*, 1985, vol. 4, no. 6, pp. 325–328. <https://doi.org/10.1007/bf00269890>
20. Kusenkova M. P., Pshibyl-Khazubska T., Kulagin D. V., Konstantinov A. V., Tret'yakova I. N., Pak M. E., Shuklina A. S., Pakhomova A. P., Padutov V. E. Morphogenesis of embryogenic cultures of Norway spruce of Belarusian origin at different stages of cultivation. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forestry and silviculture: collection of scientific papers]. Gomel, 2020, iss. 80, pp. 55–62 (in Russian).
21. Kusenkova M. P. Germination of somatic embryoids of Norway spruce obtained with different duration of cultivation of embryogenic callus on nutrient media for maturation. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forestry and silviculture: collection of scientific papers]. Gomel, 2021, iss. 81, pp. 169–177 (in Russian).
22. Padutov V. E., Baranov O. Yu., Voropaev E. V. *Methods of molecular genetic analysis*. Minsk: Yunipol Publ., 2007. 176 p. (in Russian).
23. Fluch S., Burg A., Kopecky D., Homolka A., Spiess N., Vendramin G. G. Characterization of variable EST-SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research notes*, 2011, vol. 4, art. 401. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-401>
24. Grodetskaya T. A., Baranov O. Yu., Rzhetskii S. G., Fedulova T. P., Shabanova E. A., Konstantinov A. V., Mashkina O. S. Molecular genetic analysis of *in vitro* propagated clones of *Populus alba* L. and *Populus tremula* L. using microsatellite markers. *Lesotekhnicheskii zhurnal* [Forestry journal], 2021, vol. 11, no. 3, pp. 16–30 (in Russian).
25. Baranov O. Yu., Balyutskas V. Use of molecular genetic markers for ploidy analysis of aspen and birch. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov* [Problems of forestry and silviculture: collection of scientific papers]. Gomel, 2009, iss. 69, pp. 129–135 (in Russian).
26. Feng B., Yi S. V., Zhang M., Zhou X. Development of novel EST-SSR markers for ploidy identification based on de novo transcriptome assembly for *Misgurnus anguillicaudatus*. *PloS one*, 2018, vol. 13, no. 4, p. e0195829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195829>
27. Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rymantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 3, p. e0173537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537>
28. Duta-Cornescu G., Constantin N., Pojoga D.-M., Nicuta D., Simon-Gruita A. Somaclonal Variation – Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 1, art. 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>
29. Shestibratov K. A., Lebedev V. G., Miroshnikov A. I. Forest biotechnology: methods, technologies and perspectives. *Biotechnology in Russia*, 2008, no. 5, pp. 1–34 (in Russian).
30. Kozyrenko M. M., Artyukhova E. V., Boltenkov E. V., Lauve L. S. Somaclonal variability of *Iris pseudacorus* L. according to RAPD and cytogenetic analysis. *Biotechnology in Russia*, 2004, no. 2, pp. 11–22 (in Russian).
31. Shinde D., Lai Y. L., Sun F. Z., Arnheim N. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: $(CA/GT)_n$ and $(A/T)_n$ microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, no. 3, pp. 974–980. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg178>
32. Galinskaya T. V., Shchepetov D. M., Lysenkov S. N. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Russian Journal of Genetics*, 2019, vol. 55, no. 6, pp. 657–671 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1022795419060048>
33. Kristt D., Israeli M., Narinski R., Or H., Yaniv I., Stein J., Klein T. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2005, no. 16, no. 4, pp. 378–389.
34. Sedel'nikova T. S. Variability of chromosome number as a factor of microevolution and adaptation of conifers. *Faktori eksperimental'noi evolyutsii organizmiv* [Factors of experimental evolution of organisms], 2016, vol. 18, pp. 24–28 (in Russian).
35. Knyazeva S. G., Muratova E. N. Karyological review of conifers based on the chromosome number database. *Khvoynye boreal'noi zony* [Conifers of the boreal zone], 2010, vol. 27, no. 1–2, pp. 97–101 (in Russian).
36. Goryachkina O. V., Sizykh O. A. Cytogenetic reactions of coniferous plants in anthropogenically disturbed areas of Krasnoyarsk and its environs. *Khvoynye boreal'noi zony* [Conifers of the boreal zone], 2012, vol. 30, no. 1–2, pp. 46–51 (in Russian).
37. Kunakh V. A. *Genomic variability of plant somatic cells*. *Biopolimery i kletka* [Biopolymers and the cell], 1995, vol. 11, no. 6, p. 5 (in Russian).
38. Kumar P. S., Mathur V. L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, vol. 78, no. 3, pp. 267–271. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025669.11442.3e>

39. Mishiba K.-I., Tawada K.-I., Mii M. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2006. vol. 42, no. 1, pp. 83–88. <https://doi.org/10.1079/IVP2005724>

40. Shmakov V. N., Konstantinov Yu. M. Somatic embryogenesis of representatives of the genus *Larix*: status and prospects. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding], 2020, vol. 24, no. 6, pp. 575–588 (in Russian).

41. Tret'yakova I. N., Pak M. E., Ivanitskaya A. S., Oreshkova N. V. Features of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica* in vitro. *Fiziologiya rastenii* [Plant Physiology], 2016, vol. 63, no. 6, pp. 812–822 (in Russian).

Информация об авторах

Падутов Владимир Евгеньевич – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: forestgen@mail.ru

Можаровская Людмила Валентиновна – канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: milamozh@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9106-1877>

Кулагин Дмитрий Валерьевич – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: aqua32@mail.ru

Падутов Александр Владимирович – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: apadutov@yandex.by

Кусенкова Марина Петровна – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: marinaggu@mail.ru

Information about the authors

Vladimir E. Padutov – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: forestgen@mail.ru

Ludmila V. Mozharovskaya – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Senior Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: milamozh@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9106-1877>

Dmitriy V. Kulagin – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: aqua32@mail.ru

Alexandr V. Padutov – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: apadutov@yandex.by

Marina P. Kusenкова – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: marinaggu@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 575.174.015.3:575.83

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-284-292>

Поступила в редакцию 28.07.2025

Received 28.07.2025

А. М. Нестюк¹, С. В. Пантелеев², А. В. Падутов², О. Ю. Баранов³

¹Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

³Отделение биологических наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

АЛЛЕЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА ЛЕЙКОАНТОЦИАНИДИНРЕДУКТАЗЫ (*PaLAR3*) ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ В БЕЛАРУСИ

Аннотация. В статье изложены результаты генетической оценки разнообразия аллельных вариантов промотора гена *PaLAR3*, детерминирующего отдельные этапы метаболизма флавоноидов ели европейской (*Picea abies* (L.) H. Karst.). Активность образования производных флаван-3,4-диола-(+)-катехина зависит от структуры промотора гена *PaLAR3* и влияет на формирование устойчивости ели европейской к корневой гнили, вызываемой фитопатогенным грибом *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen.

Экспериментальный материал для исследований был собран в 2017–2023 гг. с 950 деревьев ели европейской, произрастающих в различных регионах Беларуси как на лесосеменных плантациях I и II порядков, так и в лесных культурах.

В результате молекулярно-генетического анализа промотора гена *PaLAR3* выявлено 8 размерных вариантов ампликонов, относящихся к 2 основным группам аллелей: А (А – 470 н. о., А₁ – 488 н. о.) – восприимчивый к *H. parviporum* фенотип ели; В (В – 345 н. о., В₁ – 342 н. о., С – 376 н. о., С₁ – 394 н. о., D – 331 н. о. и D₁ – 339 н. о.) – устойчивый фенотип. Проведенный анализ встречаемости аллельных вариантов среди всех изученных деревьев показал, что наибольшей представленностью характеризовалась восприимчивая группа аллелей А (65,40 %) и непосредственно аллель А (62,75 %). Группа В (34,60 %) включала в себя доминирующий аллельный вариант В (32,35 %) и его редкие разновидности с частотой встречаемости менее 1 %.

Ключевые слова: ель европейская, *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen, флавоноиды, лейкоантоцианидинредуктаза, генотип, ДНК-маркеры

Для цитирования: Аллельное разнообразие промотора гена лейкоантоцианидинредуктазы (*PaLAR3*) ели европейской в Беларуси / А. М. Нестюк, С. В. Пантелеев, А. В. Падутов, О. Ю. Баранов // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 284–292. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-284-292>

Antonina M. Niastsiuk¹, Stanislav V. Panteleev², Alexander V. Padutov², Oleg Yu. Baranov³

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

²Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

³Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ALLELIC DIVERSITY OF THE NORWAY SPRUCE LEUCOANTHOCYANIDIN REDUCTASE GENE (*PaLAR3*) PROMOTER IN BELARUS

Abstract. The article presents the results of a genetic evaluation of the diversity of allelic variants of the *PaLAR3* gene promoter, which determines some stages of flavonoid metabolism in Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.). The activity of production of flavan-3,4-diol-(+)-catechin derivatives depends on the structure of the *PaLAR3* gene promoter and affects the formation of resistance of Norway spruce to spruce root rot, a condition induced by the phytopathogenic fungus *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen.

The experimental material for the research was collected from 950 trees of European spruce during the period 2017–2023. These trees were growing in various regions of Belarus both in forest seed plantations of the 1st and 2nd generation and in forest crops.

A molecular genetic analysis of the *PaLAR3* gene promoter revealed eight amplicon size variants belonging to two major allele groups: А (А – 470 bp, А₁ – 488 bp) – susceptible phenotype of spruce to *H. parviporum*; В (В – 345 bp, В₁ – 342 bp, С – 376 bp, С₁ – 394 bp, D – 331 bp, and D₁ – 339 bp) – resistant phenotype. The analysis of the occurrence of allelic variants among all the trees studied showed that the susceptible А allele group (65.40 %), and А allele (62.75 %) directly had the highest representation. Group В (34.60 %), included the dominant allele variant В (32.35 %) and its rare variants, with an incidence of less than 1 %.

Keywords: Norway spruce, *Heterobasidion parviporum* Niemelä & Korhonen, flavonoids, leucoanthocyanidin reductase, genotype, DNA markers

For citation: Niastiuk A. M., Panteleev S. V., Padutov A. V., Baranov O. Yu. Allelic diversity of the Norway spruce leucoanthocyanidin reductase gene (*PaLAR3*) promoter in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 284–292 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-284-292>

Введение. Лейкоантоцианидинредуктаза (LAR) представляет собой растительный фермент из класса оксидоредуктаз, входящий в состав метаболического пути биосинтеза флавоноидов и катализирующий обратимую реакцию превращения (+)-катехина в лейкоантоцианидин. Многие из флавоноидов являются растительными пигментами, характеризуются выраженными антиоксидантными свойствами, участвуют в защитных реакциях против воздействия негативных абиотических факторов, обладают антимикробной, антифунгальной и инсектицидной активностью. Благодаря последнему флавоноиды представляют собой фактор устойчивости растений к патогенам и вредителям [1–6].

Проведенные М. Линдом с соавт. молекулярно-генетические исследования деревьев ели европейской (*Picea abies* (L.) Н. Karst.) позволили идентифицировать 13 ДНК-маркеров, ассоциированных с количественным содержанием (+)-катехина в древесине [7]. Кроме того, на основании лабораторных тестов по оценке интенсивности скорости роста (FGS) мицелия *Heterobasidion annosum* s. l. (Fr.) Bref. в заболони деревьев ели европейской с повышенным содержанием (+)-катехина было отобрано 4 QTL, связанных с резистентностью деревьев к патогену. Последующее секвенирование наиболее информативного ДНК-маркера QTL GQ03204_B13.1 показало его сходство с геном *lar3* ели сизой (*P. glauca* (Moench) Voss). Проведенный структурно-функциональный анализ гена *PaLAR3* (*P. abies LAR3*) показал, что его размер в среднем для *P. abies* составляет $\approx 2,8$ тыс. н. о., включает промоторную часть, 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), 5 экзонов, 4 интрона и 3'-нетранслируемую область (3'-НТО) [8]. Последующее генотипирование 773 деревьев ели европейской из природных популяций Швеции позволило идентифицировать 69 полиморфных позиций (64 SNPs и 5 InDels), локализованных в различных участках гена и формирующих в сочетаниях 15 аллельных вариантов последовательностей 2 основных гаплогрупп *PaLAR3A* и *PaLAR3B* [8].

Изучение нуклеотидного полиморфизма транслируемых последовательностей аллелей гаплогруппы *PaLAR3A* показало отсутствие достоверной взаимосвязи SNPs с уровнем биосинтеза (+) катехина. Так, например, несмотря на наличие аминокислотной замены (N175K) даже и в активном центре фермента *PaLAR3*, это не приводило к изменению его каталитической активности.

В то же время у деревьев *P. abies*, содержащих аллели линии *PaLAR3B* в гомозиготной или гетерозиготной форме, наблюдалась повышенная транскрипционная активность гена, и, как следствие, высокое содержание (+)-катехина в древесине интактных растений. Данный хемотип растений определял снижение интенсивности роста мицелия *H. parviporum* в заболонной части древесины инфицированных деревьев ели. Согласно литературным данным наиболее вероятными наследственными предикторами, обуславливающими различия в количественном содержании мРНК, являются вариация числа копий генов между индивидами (CNV) или особенности нуклеотидной структуры промоторной части генов [9]. Проведенный анализ промоторов аллелей генетических линий *PaLAR3A* и *PaLAR3B* показал, что они имеют существенные структурные отличия. Так, промотор *PaLAR3A* содержал в своем составе 35 нуклеотидных участков, не встречающихся в структуре *PaLAR3B*, и наоборот, 22 участка были уникальны по отношению к *PaLAR3B*. Также значительным отличием промоторов являлось число повторов 129-нуклеотидного мотива, который в 3 копиях был представлен в *PaLAR3A* и в 2 копиях – в *PaLAR3B*. При этом одна из копий повторяющегося мотива в *PaLAR3B* являлась неполноразмерной [8]. Изменения нуклеотидной структуры промотора способны напрямую влиять на уровень его сродства с РНК-полимеразами, и, как следствие, определять эффективность инициации процесса транскрипции [10].

Материалы и методы исследования. Экспериментальный материал для исследований (хвоя) был собран в 2017–2023 гг. с 950 деревьев ели европейской, произрастающих в различных регионах

Беларуси: лесосеменные плантации II (ЛСП II, 15 объектов) и I (ЛСП I, 1 объект) порядков, лесные культуры (5 объектов).

Получение препаратов суммарной ДНК проводилось с помощью модифицированного СТАВ-метода [11]. ПЦР-амплификация маркерного участка промотора гена *PaLAR3* выполнялась с применением коммерческой смеси DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

В ходе предварительного исследования нами были использованы 2 пары специфических праймеров – *palar3aF/palar3aR* и *palar3bF/palar3bR* [8], позволяющие диагностировать 2 основные гаплогруппы *PaLAR3*. Данные праймеры фланкируют регионы в 3'-НТО *PaLAR3* [8] и напрямую не могут быть использованы для изучения полиморфизма промоторной области. Исходя из этого, нами были разработаны праймеры для типирования вариантов промотора гена *PaLAR3*. Для идентификации промоторов гаплогруппы *PaLAR3A* использованы *PaLAR3-SusF/PaLAR3-SusR*, промоторов гаплогруппы *PaLAR3B* – *PaLAR3-ResF/PaLAR3-ResR*. Анализ полиморфизма длины диагностического участка промотора *PaLAR3* выполнялся с помощью *PaPrLAR3F/PaPrLAR3R*. Разработка дизайна праймеров была выполнена на основании результатов выравнивания последовательностей референсных депозитов аллелей *PaLAR3A* (ID KX574229.1) и *PaLAR3B* (ID KX574230.1), представленных в базе данных NCBI GenBank. Нуклеотидные структуры праймеров приведены в табл. 1. Схематическое расположение мест отжига праймеров относительно последовательностей аллелей гаплогрупп А и В промотора гена *PaLAR3* приведены на рис. 1.

Таблица 1. Нуклеотидные структуры праймеров, использованных для анализа промотора гена *PaLAR3*

Table 1. Nucleotide structures of primers used to analyze the *PaLAR3* gene promoter

Название	Нуклеотидная последовательность 5'–3'	Размер ампликона, п. н.
PaLAR3-ResF	AAATCGATCAGAATTTGACCAGAAA	254 (гаплогруппа В)
PaLAR3-ResR	CAATGGACGGAGGGGCTAA	
PaLAR3-SusF	CCCAGTTAGCCCCCTCCG	315 (гаплогруппа А)
PaLAR3-SusR	TCACATTTTCAGTCCGGCCAT	
PaPrLAR3F (5'-метка FAM)	AGGAAGGCAAAATAGGACTG	476 (аллель А, ID KX574229.1), 347 (аллель В, ID KX574230.1)
PaPrLAR3R	TTTTTGCGGTTTGTTTT	

Амплификацию проводили по следующей программе для всех используемых праймеров: 1-й этап (1 цикл) – денатурация $t = 3$ мин, $T = 95$ °C; 2-й этап (35 циклов) – денатурация $t = 20$ с, $T = 95$ °C, отжиг $t = 20$ с, $T = 60$ °C, элонгация $t = 20$ с, $T = 72$ °C; 3-й этап (1 цикл) – элонгация $t = 7$ мин, $T = 72$ °C; 4-й этап (1 цикл) – охлаждение реакционной смеси $t = 5$ мин, $T = 4$ °C.

Электрофоретическое разделение продуктов полимеразной цепной реакции проводили в 2%-м нативном агарозном геле и в денатурирующих условиях (для PaPrLAR3) с применением полиакриламидного носителя. Последнее выполняли с применением генетического анализатора

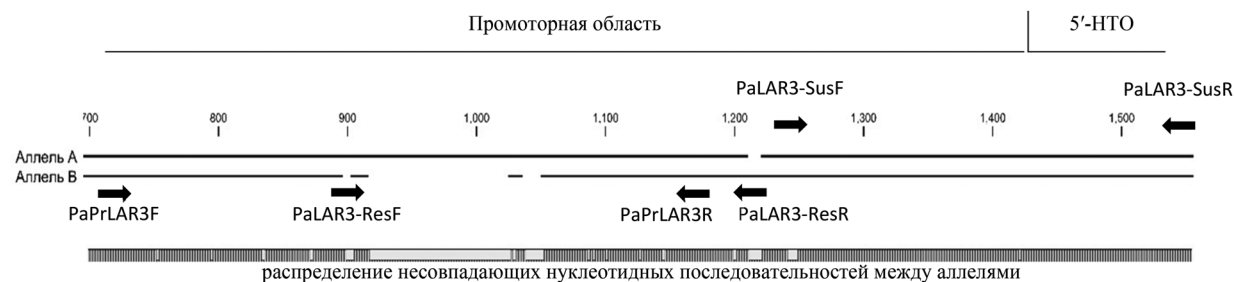


Рис. 1. Графическая схема выравнивания нуклеотидных последовательностей аллелей А (ID KX574229.1) и В (ID KX574230.1) промотора гена *PaLAR3* с указанием мест отжига праймеров

Fig. 1. Graphic scheme of the A (ID KX574229.1) and B (ID KX574230.1) alleles *PaLAR3* gene promoter nucleotide sequences alignment, with sites of primer annealing

3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями компании-изготовителя.

Расчет размеров выявляемых электрофоретических фракций в агарозном геле производился с помощью программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, США). Анализ данных фракционирования при использовании генетического анализатора выполнялся на основе программного обеспечения Gene Mapper 4.1 (Thermo Fisher Scientific).

Для проведения верификации отдельных аллельных вариантов однофракционные ПЦР-продукты секвенировали с применением генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific) на основании использования набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1 (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу компании-изготовителя. Интерпретация результатов производилась с помощью программы Sequence Analysis 5.1.1 (Thermo Fisher Scientific), выравнивание последовательностей – CLC Sequence Viewer (Qiagen, США).

Результаты и их обсуждение. В результате проведенной ПЦР-амплификации образцов ДНК ели европейской с использованием группаспецифических праймеров серий PaLAR3-Res и PaLAR3-Sus по отдельности на электрофореграммах выявлялись однофракционные спектры. Применительно к каждому образцу наличие продуктов амплификации только для одного типа праймеров указывало на гомозиготный генотип промотора – AA или BB, двух типов одновременно – гетерозиготный (AB). Электрофоретические спектры образцов и их генетическая интерпретация приведены на рис. 2.

Как видно на рис. 2, изменчивость размеров амплифицируемых вариантов PaLAR3A и PaLAR3B не выявлялась.

В случае использования праймеров серии PaPrLAR3 электрофоретические профили содержали одно-, двух- и трехфракционные спектры (рис. 3). Исходя из диплоидного статуса ($2n = 24$) вегетативных тканей ели европейской и кодоминантного характера проявления амплифицируемых аллельных вариантов, гомозиготные образцы на электрофореграммах должны были быть представлены однофракционными спектрами, гетерозиготные – двухфракционными. Наличие широкого разнообразия структуры электрофоретических спектров ПЦР-продуктов (рис. 3), по всей видимости, может быть объяснено не только аллельным полиморфизмом промотора гена *PaLAR3*, но и в ряде случаев вариацией числа копий локусов, фланкированных праймерами PaPrLAR3F и PaPrLAR3R. Прямое секвенирование ПЦР-продуктов образцов, содержащих комплексные спектры, не представлялось возможным.

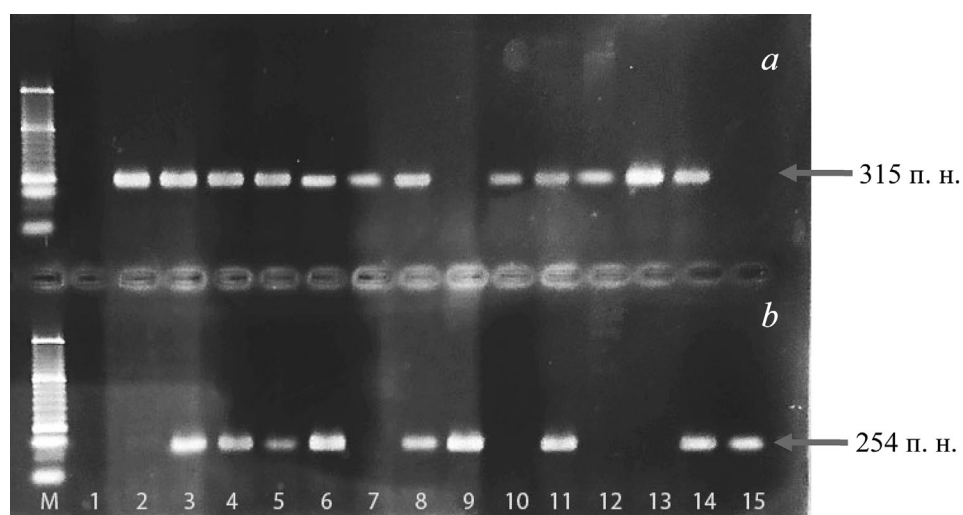


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймеров серий PaLAR3-Sus (a) и PaLAR3-Res (b): М – маркер молекулярных масс; 1 – отрицательный контроль; 2, 7, 10, 12, 13 – генотип AA; 3–6, 8, 11, 14 – генотип AB; 9, 15 – генотип BB

Fig. 2. Electropherogram of PCR products using PaLAR3-Sus (a) and PaLAR3-Res (b): primers: M – size standard; 1 – negative control; 2, 7, 10, 12, 13 – AA genotype; 3–6, 8, 11, 14 – AB genotype; 9, 15 – BB genotype

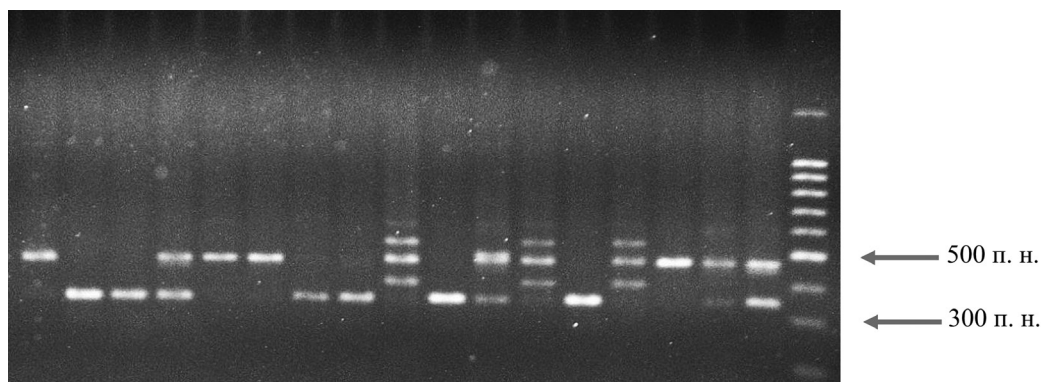


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймеров серии PaPrLAR3 (клоны ели европейской, ЛСП II порядка, Крупский лесхоз)

Fig. 3. Electrophorogram of PCR products using primers of the PaPrLAR3 series (clones of European spruce, LSP of the II order, Krupsky forest enterprise)

Следует отметить, что варьирование числа копий локусов является наиболее вероятным вариантом интерпретации комплексности спектров образцов, поскольку полиплоидные деревья ели европейской до настоящего времени в литературе описаны не были, а разработанные универсальные праймеры PaPrLAR3 *in silico* были комплементарны только участкам последовательностей промотора гена *PaLAR3* депозитов, представленных в международной генетической базе данных NCBI GenBank. Вследствие комплексного характера выявляемых электрофоретических спектров результаты молекулярно-генетического анализа деревьев вносились в базу данных в виде генетической формулы, а не генотипа.

Обозначение выявляемых электрофоретических вариантов, как указывалось ранее, было выполнено в соответствии с электрофоретической подвижностью FAM-меченных денатурированных цепей ампликонов (рис. 4). В результате изучения 950 деревьев ели европейской, произрастающих в лесных культурах и на лесосеменных плантациях, было идентифицировано 8 размерных вариантов промотора *PaLAR3*, 2 из которых относились к группе А (А – 470 н. о., А₁ – 488 н. о.), 6 – к группе В (В – 345 н. о., В₁ – 342 н. о., С – 376 н. о., С₁ – 394 н. о., D – 331 н. о. и D₁ – 339 н. о.). Отнесение размерных вариантов к той или иной группе было основано на их избирательной амплификации с групп-специфическими праймерами серии PaLAR3-Sus (гаплогруппа А) или PaLAR3-Res (гаплогруппа В).

Проведенный анализ встречаемости аллельных вариантов среди всех изученных деревьев ели европейской показал, что наибольшей представленностью характеризовалась восприимчивая к *H. parviporum* гаплогруппа А (65,40 %) и непосредственно аллель А (62,75 %) (табл. 2). Гаплогруппа

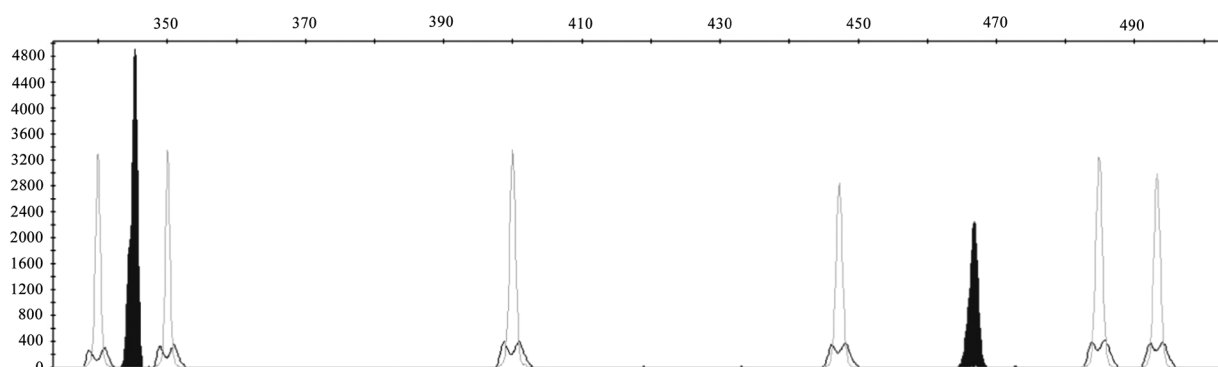


Рис. 4. Электрофореграмма меченных денатурированных ПЦР-продуктов гетерозиготного образца BER3 (генетическая формула А, В) с использованием праймеров серии PaPrLAR3

Fig. 4. Electrophorogram of labeled denatured PCR products of a heterozygous BER3 sample (genetic formula A, B) using PaPrLAR3 series primers

группа В (34,60 %) включала в себя доминирующий вариант В (32,35 %) и его редкие разновидности с частотой встречаемости менее 1 %.

Редкие варианты аллельной группы В (устойчивой) в основном были выявлены в объектах, относящихся к лесосеменным плантациям. Также следует отметить, что в изученной выборке деревьев ели европейской указанные аллели (В₁, С, С₁, D, D₁) не были диагностированы в гомозиготной форме, а идентифицировались только в составе комбинаций с другими вариантами.

Т а б л и ц а 2. Значения частот встречаемости выявленных аллельных вариантов промотора гена *PaLAR3* в изученной выборке

Table 2. The frequency of the *PaLAR3* gene promoter allelic variants in the stands

Лесхоз	Количество проанализированных деревьев	Тип насаждения	Аллельные группы/аллели, %							
			А		В					
			А	А ₁	В	В ₁	С	С ₁	D	D ₁
Барановичский	50	ЛСП II порядка	60,00	3,00	36,00	1,00	0	0	0	0
Березинский	45	ЛСП II порядка	60,00	2,22	35,56	0	2,22	0	0	0
Глубокский опытный	48	ЛСП II порядка	65,63	4,17	30,20	0	0	0	0	0
Горецкий	44	ЛСП II порядка	71,58	1,14	26,14	0	1,14	0	0	0
Гродненский	50	ЛСП II порядка	49,00	1,00	49,00	0	0	1,00	0	0
Жлобинский	50	Лесные культуры	81,00	0	19,00	0	0	0	0	0
Ивацевичский	51	ЛСП II порядка	60,78	3,93	33,33	0,98	0,98	0	0	0
Крупский	50	ЛСП II порядка	56,00	3,00	33,00	0	1,00	6,00	1,00	0
Лепельский	44	ЛСП II порядка	69,32	1,14	28,40	0	0	0	1,14	0
Лиозненский	51	ЛСП II порядка	68,63	2,94	25,49	0	0,98	0,98	0,98	0
Ляховичский	50	ЛСП II порядка	67,00	1,00	31,00	0	1,00	0	0	0
Могилёвский	50	ЛСП II порядка	75,00	0	24,00	0	1,00	0	0	0
Могилёвский	25	Лесные культуры	72,00	2,00	24,00	0	0	2,00	0	0
Могилёвский	25	Лесные культуры	68,00	2,00	28,00	0	2,00	0	0	0
Могилёвский	25	Лесные культуры	64,00	4,00	32,00	0	0	0	0	0
Оршанский	50	ЛСП II порядка	50,00	4,00	44,00	0	0	1,00	0	0
Полоцкий	51	ЛСП II порядка	60,78	4,90	27,45	1,96	0,98	1,96	0,98	0,98
Рогачёвский	49	Лесные культуры	65,31	4,08	28,57	0	0	0	2,04	0
Скидельский	47	ЛСП II порядка	47,87	4,26	45,74	0	1,06	0	1,06	0
Сморгонский	45	ЛСП II порядка	52,22	2,22	41,11	0	2,22	1,11	1,11	0
Чериковский	50	ЛСП I порядка	63,00	4,00	29,00	2,00	1,00	1,00	0	0
В целом	950		62,75	2,65	32,35	0,25	0,75	0,75	0,45	0,05

Особую селекционную ценность представляют собой деревья с сочетанием вариантов аллельной группы В (В, В₁, С, С₁, D, D₁), детерминирующих повышенную устойчивость к еловой корневой губке (*H. parviporum*). Растения, содержащие аллель В в гомозиготной форме, были выявлены как на ЛСП (4–32 %), так и в большинстве исследованных лесных культур (8–16 %). Сочетания В/В₁, В/С и С₁/D₁ были идентифицированы только на ЛСП I (Чериковский лесхоз) и II (Ивацевичский опытный лесхоз, Полоцкий лесхоз) порядков. Исходя из редкой встречаемости комбинаций В/В₁, В/С и С₁/D₁, все выявленные на ЛСП деревья с указанными вариантами, по всей видимости, являются ракетами одних и тех же клонов, высаженных на разных селекционно-семеноводческих объектах. Образец с формулой В/С₁ был представлен единичными образцами в выборках из Могилёвского (лесные культуры), Гродненского и Лиозненского (ЛСП II порядка) лесхозов.

Проведенный сравнительный анализ генетических структур лесных культур и ЛСП показал, что каждая из этих категорий насаждений характеризуется значительным диапазоном значений частот встречаемости аллельных вариантов. Так, для наиболее распространенного аллеля А они составили 64–81 и 48–75 % соответственно.

Применительно к ЛСП их генетическая структура главным образом определяется перечнем клонов на изучаемом участке, представленностью их рамет (долевым участием) и схемой размещения. Таким образом, уровень различий между генетическими структурами отдельных ЛСП будет изменяться исходя из количественного соотношения рамет тех или иных клонов. По всей видимости, данный аспект объясняет более широкий диапазон изменчивости частот аллелей на ЛСП по сравнению с лесными культурами.

Изучение литературных материалов, связанных с генотипированием промотора гена *PaLAR3* ели европейской, показало, что частота встречаемости гаплогруппы А у образцов из Швеции и Финляндии варьировала в диапазоне 60–80 % [8, 12–15]. Данные результаты являются сходными с полученными нами значениями частот для белорусских насаждений. Еще одним аспектом, который отмечают исследователи в изученных выборках ели европейской, является соответствие их генетической (аллельной) структуры генотипической (коэффициент инбридинга $F_{is} \approx 0$), что, по всей видимости, указывает на отсутствие движущего естественного отбора в популяциях ели природного происхождения по признаку устойчивости к корневой губке путем повышения содержания (+)-катехина в древесине. Авторами выдвинут ряд предположений, объясняющих роль гена *PaLAR3* в формировании повышенной устойчивости к *H. parviporum* в зависимости от особенностей фенотипа дерева, способа передачи корневой губки, генотипическими особенностями штаммов патогенов, а также зараженности последних миковирусами [12–15].

Полученные нами данные о генетической и генотипической структуре ЛСП позволяют определить клоны, продуцирующие семена с наибольшим количеством устойчивого потомства, а также рассчитать доленое участие данных генотипов в общей выборке. Так, например, в случае ЛСП II порядка, расположенных в Гродненском, Оршанском, Скидельском и Сморгонском лесах, в семенном потомстве от открытого опыления для деревьев с генотипом ВВ расчетное количество сеянцев с повышенным содержанием (+)-катехина в древесине составит от 17 до 24 %, со средним содержанием – 48–50 %.

Заключение. На основании результатов изучения аллельного разнообразия промотора гена *PaLAR3* ели европейской на территории Беларуси можно сделать следующие выводы: в независимости от местопроизрастания деревьев ели европейской (на ЛСП I и II порядков или в насаждении) наблюдается полиморфизм промотора гена *PaLAR3* и неравномерная встречаемость его аллельных вариантов. Всего нами выделено 8 размерных вариантов, представленных как в гомозиготной, так и в гетерозиготной формах и относящихся к 2 основным группам – группа А (А – 470 н. о., А₁ – 488 н. о.) – восприимчивый к грибу *H. parviporum* фенотип ели, и В (В – 345 н. о., В₁ – 342 н. о., С – 376 н. о., С₁ – 394 н. о., D – 331 н. о. и D₁ – 339 н. о.) – устойчивый фенотип. Наибольшей представленностью характеризовалась восприимчивая группа А (65,40 %) и непосредственно аллель А (62,75 %), в то время как группа В (34,60 %) включала в себя доминирующий вариант В (32,35 %) и его редкие разновидности с частотой встречаемости менее 1 %. Наибольшую селекционную ценность представляют деревья, содержащие сочетания вариантов аллельной группы В (В, В₁, С, С₁, D, D₁), детерминирующих повышенную устойчивость к еловой корневой губке (*H. parviporum*).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № B22M-055).

Acknowledgements. The work was supported by the BRFFR (grant No. B22M-055).

Список использованных источников

1. Induced Responses in Phenolic Metabolism in Two Norway Spruce Clones after Wounding and Inoculations with *Ophiostoma polonicum*, a Bark Beetle-Associated Fungus / F. Brignolas, B. Lacroix, F. Lieutier [et al.] // Plant Physiology. – 1995. – Vol. 109. N 3. – P. 821–827. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.821>
2. Phenolic predictors for Norway spruce resistance to the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and an associated fungus, *Ceratocystis polonica* / F. Brignolas, F. Lieutier, D. Sauvard [et al.] // Canadian Journal of Forest Research. – 1998. – Vol. 28, N 5. – P. 720–728. <https://doi.org/10.1139/x98-037>
3. Intra- and inter-provenance variability in phloem phenols of *Picea abies* and relationship to a bark beetle-associated fungus / F. Lieutier, F. Brignolas, D. Sauvard [et al.] // Tree Physiology. – 2003. – Vol. 23. N 4. – P. 247–256. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.4.247>

4. Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to *Heterobasidion* spp. infection / M. Danielsson, K. Lundén, M. Elfstrand [et al.] // BMC Plant Biology. – 2011. – Vol. 11. – Art. 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-154>
5. Indications of heightened constitutive or primed host response affecting the lignin pathway transcripts and phenolics in mature Norway spruce clones / C. G. Fossdal, N. E. Nagy, A. M. Hietala [et al.] // Tree Physiology. – 2012. – Vol. 32, N 9. – P. 1137–1147. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps073>
6. Genetical Genomics Identifies the Genetic Architecture for Growth and Weevil Resistance in Spruce / I. Porth, R. White, B. Jaquish [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 9. – Art. e44397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044397>
7. A *Picea abies* Linkage Map Based on SNP Markers Identifies QTLs for Four Aspects of Resistance to *Heterobasidion parviporum* Infection / M. Lind, T. Källman, J. Chen [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 7. – Art. e101049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101049>
8. Different alleles of a gene encoding leucoanthocyanidin reductase (*PaLAR3*) influence resistance against the fungus *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies* / M. Nemesio-Gorritz, A. Hammerbacher, K. Ihrmark [et al.] // Plant Physiology. – 2016. – Vol. 171, N 4 – P. 2671–2681. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00685>
9. Relative Impact of Nucleotide and Copy Number Variation on Gene Expression Phenotypes / B. E. Stranger, M. S. Forrest, M. Dunning [et al.] // Science. – 2007. – Vol. 315, N 5813. – P. 848–853. <https://doi.org/10.1126/science.1136678>
10. Bansal, M. Role of DNA sequence based structural features of promoters in transcription initiation and gene expression / M. Bansal, A. Kumar, V. R. Yella // Current Opinion in Structural Biology. – 2014. – Vol. 25. – P. 77–85. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2014.01.007>
11. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
12. *PaLAR3* genotype variability for enhanced resistance against *Heterobasidion parviporum* in Norway spruce: Insights into allelic frequencies, disease response, and the role of mycoviruses / M. Kashif, E. Terhonen, L. Hamberg [et al.] // Biological Control. – 2024. – Vol. 198. – Art. 105633. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105633>
13. Leucoanthocyanidin Reductase 3 (*PaLAR3*) Locus in Norway Spruce (*Picea abies*) and Its Link to Resistance Against *Heterobasidion parviporum* / B. Durodola, N. Hanström, K. Blumenstein, M. Haapanen [et al.] // Forest Pathology. – 2024. – Vol. 54, N 5. – P. e12889. <https://doi.org/10.1111/efp.12889>
14. Root Rot Resistance Locus *PaLAR3* Is Delivered by Somatic Embryogenesis (SE) Pipeline in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) / J. Edesi, M. Tikkinen, M. Elfstrand [et al.] // Forests. – 2021. – Vol. 12, N 2. – P. 193. <https://doi.org/10.3390/f12020193>
15. Allele *PaLAR3B* in root rot resistance locus does not influence the infection pressure by *Heterobasidion parviporum* through root contacts / E. Terhonen, M. Kashif, T. Piri [et al.] // Forest Pathology. – 2022. – Vol. 52, N 5. – Art. e12769. <https://doi.org/10.1111/efp.12769>

References

1. Brignolas F., Lacroix B., Lieutier F., Sauvard D., Drouet A., Claudot A. C., Yart A., Berryman A. A., Christiansen E. Induced Responses in Phenolic Metabolism in Two Norway Spruce Clones after Wounding and Inoculations with *Ophiostoma polonicum*, a Bark Beetle-Associated Fungus. *Plant Physiology*, 1995, vol. 109, no. 3, pp. 821–827. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.821>
2. Brignolas F., Lieutier F., Sauvard D., Christiansen E., Berryman A. A. Phenolic predictors for Norway spruce resistance to the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and an associated fungus, *Ceratocystis polonica*. *Canadian Journal of Forest Research*, 1998, vol. 28, no. 5, pp. 720–728. <https://doi.org/10.1139/x98-037>
3. Lieutier F., Brignolas F., Sauvard D., Yart A., Galet C., Brunet M., van de Sype H. Intra- and inter-provenance variability in phloem phenols of *Picea abies* and relationship to a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiology*, 2003, vol. 23, no. 4, pp. 247–256. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.4.247>
4. Danielsson M., Lundén K., Elfstrand M., Hu J., Zhao T., Arnerup J., Ihrmark K., Swedjemark G., Borg-Karlson A.-K., Stenlid J. Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to *Heterobasidion* spp. Infection. *BMC Plant Biology*, 2011, vol. 11, art. 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-154>
5. Fossdal C. G., Nagy N. E., Hietala A. M., Kvaalen H., Slimestad R., Woodward S., Solheim H. Indications of heightened constitutive or primed host response affecting the lignin pathway transcripts and phenolics in mature Norway spruce clones. *Tree Physiology*, 2012, vol. 32, no. 9, pp. 1137–1147. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps073>
6. Porth I., White R., Jaquish B., Alfaro R., Ritland C., Ritland K. Genetical Genomics Identifies the Genetic Architecture for Growth and Weevil Resistance in Spruce. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 9, art. e44397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044397>
7. Lind M., Källman T., Chen J., Ma X.-F., Bousquet J., Morgante M., Zaina G., Karlsson B., Elfstrand M., Lascoux M., Stenlid J. A *Picea abies* linkage map based on SNP markers identifies QTLs for four aspects of resistance to *Heterobasidion parviporum* infection. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 7, art. e101049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101049>
8. Nemesio-Gorritz M., Hammerbacher A., Ihrmark K., Källman T., Olson Å., Lascoux M., Stenlid J., Gershenzon J., Elfstrand M. Different alleles of a gene encoding leucoanthocyanidin reductase (*PaLAR3*) influence resistance against the fungus *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies*. *Plant Physiology*. 2016, vol. 171, no. 4, pp. 2671–2681. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00685>
9. Stranger B. E., Forrest M. S., Dunning M., Ingle C. E., Beazley C., Thorne N. [et al.]. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, 2007, vol. 315, no. 5813, pp. 848–853. <https://doi.org/10.1126/science.1136678>

10. Bansal M., Kumar A., Yella V. R. Role of DNA sequence based structural features of promoters in transcription initiation and gene expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, vol. 25, pp. 77–85. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2014.01.007>
11. Padutov V. E., Baranov O. Yu., Voropaev E. V. *Méthodes d'analyse génétique moléculaire*. Minsk, Yunipol Publ., 2007. 176 p. (in Russian).
12. Kashif M., Terhonen E., Hamberg L., Piri T., Haapanen M., Pöykkö S., Vainio E. J., Hantula J. *PaLAR3* genotype variability for enhanced resistance against *Heterobasidion parviporum* in Norway spruce: Insights into allelic frequencies, disease response, and the role of mycoviruses. *Biological Control*, 2024, vol. 198, art. 105633. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105633>
13. Durodola B., Hanström N., Blumenstein K., Haapanen M., Hantula J., Kashif M., Piri T., Terhonen E. Leucoanthocyanidin Reductase 3 (*PaLAR3*) Locus in Norway Spruce (*Picea abies*) and Its Link to Resistance Against *Heterobasidion parviporum*. *Forest Pathology*, 2024, vol. 54, no. 5, pp. e12889. <https://doi.org/10.1111/efp.12889>
14. Edesi J., Tikkinen M., Elfstrand M., Olson Å., Varis S., Egertsdotter U., Aronen T. Root Rot Resistance Locus *PaLAR3* Is Delivered by Somatic Embryogenesis (SE) Pipeline in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Forests*, 2021, vol. 12, no. 2, p. 193. <https://doi.org/10.3390/f12020193>
15. Terhonen E., Kashif M., Piri T., Haapanen M., Hantula J. Allele *PaLAR3B* in root rot resistance locus does not influence the infection pressure by *Heterobasidion parviporum* through root contacts. *Forest Pathology*, 2022, vol. 52, no. 5, art. e12769. <https://doi.org/10.1111/efp.12769>

Информация об авторах

Нестюк Антонина Михайловна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: antonina.nestyuk95@gmail.com

Пантелеев Станислав Викторович – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: stasikdesu@mail.ru

Падутов Александр Владимирович – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: apadutov@yandex.by

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

Information about the authors

Antonina M. Niastsiuk – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antonina.nestyuk95@gmail.com

Stanislav V. Panteleev – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: stasikdesu@mail.ru

Alexander V. Padutov – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: apadutov@yandex.by

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

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.21:633.11

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-293-303>

Поступила в редакцию 17.03.2025

Received 17.03.2025

О. А. Орловская, К. К. Яцевич, Л. В. Милько, А. В. Кильчевский

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ СИНТЕЗ КРАХМАЛА, С ОСНОВНЫМИ ПРИЗНАКАМИ ПРОДУКТИВНОСТИ У ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИНТРОГРЕССИЯМИ ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Аннотация. Эндосперм пшеницы на 65–85 % состоит из крахмала, содержание которого в значительной степени определяет массу зерна. В данной работе в коллекции 40 линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Triticum dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. kiharae* и их родительских форм исследовали полиморфизм девяти генов, контролирующих синтез крахмала, для выявления связи их аллельных вариантов с признаками продуктивности в условиях Беларуси, а также оценили влияние чужеродного генетического материала на продуктивность пшеницы. Полиморфизм не обнаружен только для генов *TaCWI-5D* и *TaAGP-L-1B*. Установлен значимый вклад генов *TaSus2-2B*, *TaSus1-7A*, *TaCWI-4A*, *TaAGP-S1-7A*, *TaBT1-6B* в изменчивость массы зерен; генов *TaSus2-2A*, *TaSus1-7A*, *TaCWI-4A* – в изменчивость числа зерен с колоса; генов *TaSus2-2A* и *TaSus2-2B* – в изменчивость продуктивной кустистости. Частота встречаемости благоприятных гаплотипов у сородичей пшеницы незначительно уступала таковой у сортов, у интрогрессивных линий (ИЛ) – была на уровне сортов. Включение чужеродного генетического материала в геном пшеницы не оказало отрицательного влияния на основной показатель продуктивности – массу 1000 зерен, которая в среднем за 4-летний период у ИЛ (38,51 г) была достоверно выше, чем у сортов (36,91 г).

Ключевые слова: мягкая пшеница, сородичи пшеницы, интрогрессивные линии пшеницы, гены, регулирующие синтез крахмала, продуктивность

Для цитирования: Ассоциация генов, контролирующих синтез крахмала, с основными признаками продуктивности у линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала / О. А. Орловская, К. К. Яцевич, Л. В. Милько, А. В. Кильчевский // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 293–303. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-293-303>

Olga A. Orlovskaya, Kanstantsyia K. Yatsevich, Larisa V. Milko, Alexander V. Kilchevsky

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

ASSOCIATION OF GENES CONTROLLING STARCH SYNTHESIS WITH MAIN PRODUCTIVITY TRAITS IN COMMON WHEAT LINES WITH THE INTROGRESSIONS OF THE ALIEN GENETIC MATERIAL

Abstract. Given that wheat endosperm comprises 65–85 % starch, its content significantly influences the weight of the grain. In the present study, a total of 40 common wheat lines with the genetic material of *Triticum dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta*, and *T. kiharae*, in addition to their parent forms, were collected for genetic analysis. The objective was to study the polymorphism of nine genes that control starch synthesis to identify the association of allelic variants of these genes with productivity traits in Belarus. Furthermore, the study sought to assess the influence of alien genetic material on wheat productivity. A polymorphism was not detected only for *TaCWI-5D* and *TaAGP-L-1B* genes. The genes *TaSus2-2B*, *TaSus1-7A*, *TaCWI-4A*, *TaAGP-S1-7A*, and *TaBT1-6B* significantly contributed to the variability of the thousand kernel weight, while *TaSus2-2A*, *TaSus1-7A*, and *TaCWI-4A* were associated with the grain number per spike and *TaSus2-2A* and *TaSus2-2B* with the productive tillering. The favorable haplotypes frequency in wheat relatives was slightly lower than that of varieties, while in introgressive lines it was at the level of varieties. The introgression of the alien genetic material into the wheat genome did not adversely affect the main productivity indicator – the thousand kernel weight, which on average, during the 4-year period, was significantly higher in introgression lines (38.51 g) than in varieties (36.91 g).

Keywords: common wheat, wheat relatives, wheat introgressive lines, genes controlling starch synthesis, productivity

For citation: Orlovskaya O. A., Yatsevich K. K., Milko L. V., Kilchevsky A. V. Association of genes controlling starch synthesis with main productivity traits in common wheat lines with the introgressions of the alien genetic material. *Vestsi Natsyianal'най akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 293–303 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-293-303>

Введение. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из важнейших продовольственных культур во всем мире, спрос на производство которой продолжает расти из-за потери сельскохозяйственных угодий, изменения климата и увеличения численности населения [1]. Потребность в пшенице ежегодно увеличивается на 1,7 %, в то время как рост урожайности – только на 1,1 % [2]. В связи с этим повышение урожайности зерна является актуальной задачей, решение которой позволит обеспечить продовольственную безопасность.

Эндосперм пшеницы на 65–85 % состоит из крахмала, содержание которого в значительной степени определяет массу зерна [3]. Синтез крахмала протекает при участии множества ферментов и транспортеров. Основным субстратом для синтеза крахмала – сахароза, которая расщепляется за счет деятельности двух ферментов: инвертазы и сахарозосинтазы. Инвертаза – гидролаза, которая катализирует превращение сахарозы в глюкозу и фруктозу, которые могут расходоваться на синтез крахмала и компонентов клеточных стенок [4]. Сахарозосинтаза представляет собой гликозилтрансферазу, которая при участии УДФ-глюкозопирофосфорилазы (UDP-glucose pyrophosphorylase) превращает сахарозу в глюкозо-1-фосфат (glucose-1-phosphate, G1P). G1P после катализа АДФ-глюкозофосфорилазой (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase) преобразуется в предшественник крахмала – АДФ-глюкозу (ADP-glucose, ADP-Glc), которая для синтеза крахмала транспортируется в амилопласт белком BT1 [5]. В работе мы исследовали гены *TaSus2-2A*, *TaSus2-2B*, *TaSus1-7A*, *TaSus1-7B*, *TaCWI-4A*, *TaCWI-5D*, *TaAGP-S1-7A*, *TaAGP-L-1B*, *TaBT1-6B*, которые играют важную роль в синтезе крахмала и ассоциированы с признаками, определяющими урожайность пшеницы (продуктивная кустистость, число зерен с колоса и масса 1000 зерен).

Известно, что сородичи мягкой пшеницы используются для расширения генофонда культивируемых сортов, так как являются источником многих хозяйственно ценных генов [6, 7]. Нами созданы линии пшеницы с включением генетического материала *T. dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf., *T. dicoccum* Schrank ex Schuebl., *T. durum* Desf., *T. spelta* L., *T. kiharae* Dorof. et Migusch. и выявлен положительный эффект чужеродного генетического материала на питательную ценность зерна [8, 9]. В данной работе в коллекции интрогрессивных линий (ИЛ) пшеницы и их родительских форм исследовали полиморфизм генов, контролирующих синтез крахмала, для выявления связи аллельных вариантов данных генов с признаками продуктивности в условиях Беларуси, а также оценили влияние чужеродного генетического материала на основные показатели продуктивности пшеницы.

Материалы и методы исследования. Изучали 32 ИЛ, полученные нами от скрещивания сортов яровой мягкой пшеницы (Рассвет, Саратовская 29, Фестивальная, Белорусская 80, Pitic S62) с образцами следующих видов рода *Triticum*: тетраплоидных *T. dicoccoides*, *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccum* к-45926, *T. durum* и гексаплоидных *T. spelta* к-1731, *T. kiharae*. Также в исследование включено 8 гибридов, полученных от скрещивания в прямом и обратном направлениях современных сортов яровой мягкой пшеницы белорусской селекции Дарья, Тома, Ласка, Любава с интрогрессивной линией 29 Рассвет × *T. dicoccoides*. Образцы сородичей пшеницы получены из коллекции ВИР. Растения выращивали на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2021–2024 гг. (г. Минск) на дерново-подзолистой супесчаной почве. Данные о среднесуточных температурах и количестве выпавших осадков в период исследования получены с метеорологической станции Минск (53.96° с. ш., 27.70° в. д.) [10].

Для выделения ДНК из проростков пшеницы использовали набор реагентов «АртДНК» (АртБиоТех, Республика Беларусь) согласно протоколу производителя. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США). Идентификацию аллельного состава гена *TaSus2-2B* проводили при помощи методики, предложенной в работе [3], гена *TaSus1-7A* – в работе [11], *TaCWI-4A* – [12], *TaAGP-S1-7A* – [13], *TaBT1-6B* – [5]. Для выявления SNP полиморфизмов в генах *TaSus2-2A*, *TaSus1-7B*, *TaAGP-L-1B*, *TaCWI-5D* применяли метод секвенирования по Сэнгеру. Реакцию секвенирования проводили с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), разделение продуктов секвенирующей реакции – на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific),

компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, – в программе Chromas v.1.45.

Результаты эксперимента обобщены с использованием методов описательной статистики и дисперсионного анализа. Статистическую обработку данных осуществляли в программных пакетах Statistica 10.0. Оценку различий показателей продуктивности между группами (сорта, образцы видов *Triticum*, ИЛ) выполняли при помощи дисперсионного анализа и критерия Тьюки.

Результаты и их обсуждение. В коллекции, состоящей из сортов мягкой пшеницы, родственных видов и ИЛ, созданных с их участием, проанализированы признаки, которые определяют урожайность пшеницы: продуктивная кустистость, число зерен с колоса и масса 1000 зерен. Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверный вклад в изменчивость данных признаков генотипа, условий года выращивания и их взаимодействия ($p < 0,001$). Оценка различий показателей продуктивности между группами (сорта, образцы видов рода *Triticum* и ИЛ) на основании дисперсионного анализа и теста множественных сравнений Тьюки позволила установить то, что на протяжении всего периода исследования сородичи пшеницы значительно превосходили сорта мягкой пшеницы по продуктивной кустистости (за исключением 2024 г.), но уступали по числу зерен с колоса (рис. 1).

В среднем за четыре года масса 1000 зерен у изученных сортов находилась в пределах 32,7–42,1 г и достоверно не отличалась от данного показателя у сородичей пшеницы (35,7–41,0 г). Среди родительских генотипов наиболее высокими значениями по данному признаку характеризовались сорт Любава и образец *T. kiharae*. Масса 1000 зерен у родственных видов по сравнению с сортами была значимо выше в 2021 г., но ниже в 2022 г., а в 2023 и 2024 гг. статистически достоверных отличий между данными группами не обнаружено. ИЛ по изученным признакам, как правило, были ближе к сортам на протяжении всего исследования (рис. 1). Следует отметить, что включение чужеродного генетического материала в геном пшеницы не оказало отрицательного влияния

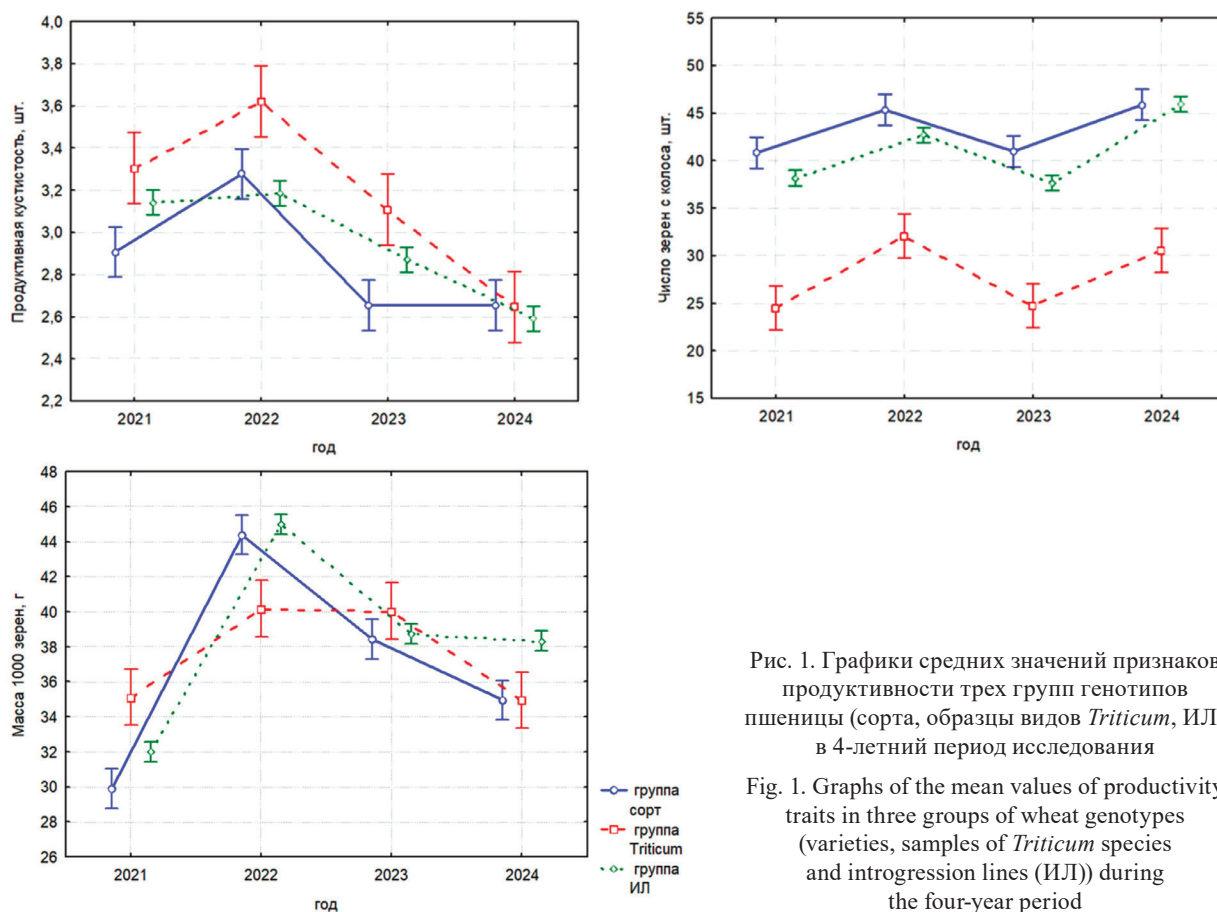


Рис. 1. Графики средних значений признаков продуктивности трех групп генотипов пшеницы (сорта, образцы видов *Triticum*, ИЛ) в 4-летний период исследования

Fig. 1. Graphs of the mean values of productivity traits in three groups of wheat genotypes (varieties, samples of *Triticum* species and introgression lines (ИЛ)) during the four-year period

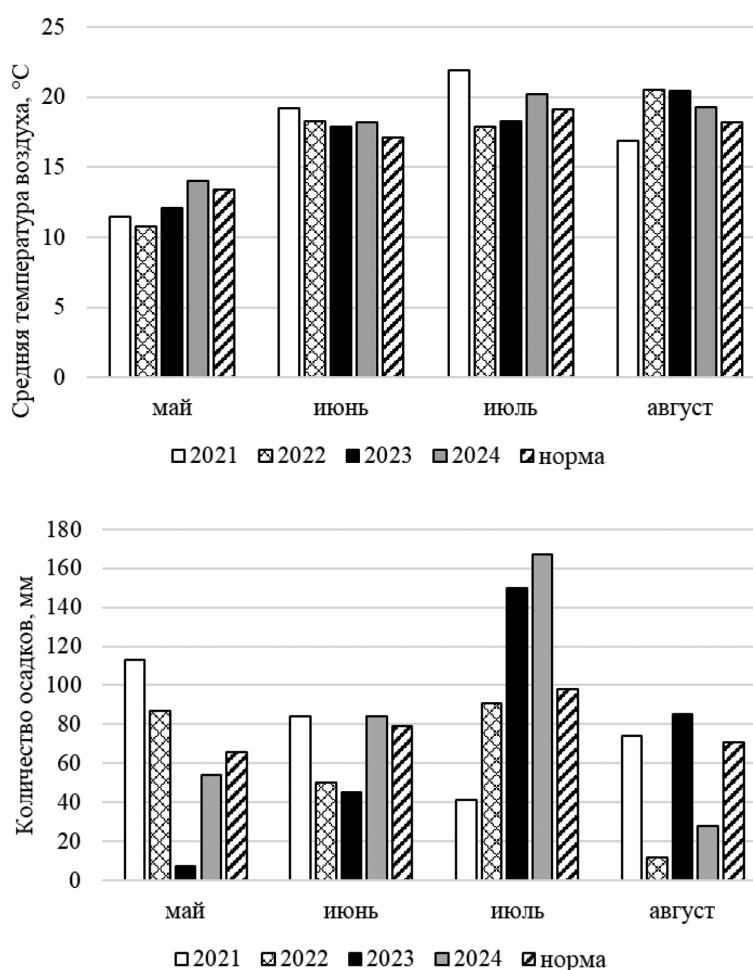


Рис. 2. Метеорологические условия в период вегетации яровой пшеницы с 2021 по 2024 г.

Fig. 2. Weather conditions during the spring wheat growing season from 2021 to 2024

на основной показатель продуктивности – массу 1000 зерен. В среднем у ИЛ она была достоверно выше (38,51 г), чем у сортов (36,91 г). Самые высокие значения массы 1000 зерен (42,56–51,22 г) выявлены для линий с генетическим материалом *T. durum* и *T. kiharae*: линии 195-3, 196-1, 226-7, 19, 25-2. ИЛ характеризовались также большим числом продуктивных побегов по сравнению с сортами (в среднем 2,94 и 2,87 шт. соответственно), но меньшим числом зерен с колоса (41,11 и 43,25 шт. соответственно).

В период налива зерна яровой пшеницы (июль) самые неблагоприятные условия для формирования будущего урожая сложились в 2021 г.: отклонение температуры воздуха от климатической нормы составило +3,4 °C, при этом количество выпавших осадков было значительно ниже нормы (рис. 2). Можно отметить, что температурный и гидрологический режимы в июле были наиболее приближены к норме в 2022 г. (рис. 2), что поспособствовало наилучшему наливу зерна за весь период исследования (рис. 1). Образцы сородичей пшеницы и ИЛ, в отличие от сортов, продемонстрировали способность формировать более выполненное зерно в засушливых условиях 2021 г., что представляет ценность для селекции.

Размер и массу зерна пшеницы в значительной степени определяет содержание крахмала, который является одним из основных компонентов сухого вещества зерна. Фермент сахарозосинтаза катализирует первый этап превращения сахарозы в крахмал, в связи с чем большой интерес представляет изучение генов, кодирующих данный фермент (*TaSus1* и *TaSus2*), которые локализованы на хромосомах 7A/7B/7D и 2A/2B/2D соответственно [11]. Китайскими учеными в локусах *TaSus2-2A*, *TaSus2-2B*, *TaSus1-7A* и *TaSus1-7B* были идентифицированы два, два, пять

и два гаплотипа соответственно. Отличия между гаплотипами в основном были обнаружены внутри интронных последовательностей и значительно коррелировали с различиями по массе 1000 зерен. Изучение современных сортов пшеницы и ландрас в различных условиях среды выявили следующие предпочтительные гаплотипы: *Hap-A* (*TaSus2-2A*), *Hap-H* (*TaSus2-2B*), *Hap-I* и *Hap-2* (*TaSus1-7A*), *Hap-T* (*TaSus1-7B*) [3, 11].

Молекулярно-генетический анализ генов *TaSus2-2A*, *TaSus2-2B* и *TaSus1-7A* в нашей коллекции показал, что большая часть генотипов имеет гаплотипы *Hap-A* (96,36 %), *Hap-L* (83,64 %) и *Hap-3* (50,91 %) соответственно. В локусе *TaSus1-7B* у всех исследованных генотипов выявлен благоприятный гаплотип *Hap-T* (инсерция TGGTGTG в 11 интроне). Исключение составил только образец *T. kiharae*, у которого в 11 интроне обнаружена новая инсерция TGGTATA, обозначенная нами как гаплотип *Hap-Tk*. Данный образец характеризуется одним из самых высоких значений по массе 1000 зерен (41,0 г) среди родительских генотипов, в связи с чем можно предположить, что полиморфный вариант *Hap-Tk*, так же как и *Hap-T*, является благоприятным.

Значительная роль в формировании урожайности отводится и такому ферменту, как инвертаза клеточной стенки, которая катализирует расщепление сахарозы до глюкозы и фруктозы и тесно связана с урожайностью сельскохозяйственных растений [12]. У пшеницы гены *TaCWI* локализованы на хромосомах 4A, 5B и 5D. В кодирующих или промоторных областях *TaCWI-5B* полиморфизма не выявлено. Известно, что два SNP в промоторной области *TaCWI-4A* определяют два гаплотипа (*Hap-4A-C* и *Hap-4A-T*), а четыре SNP и два Indel в гене *TaCWI-5D* – *Hap-5D-C* и *Hap-5D-G*. *TaCWI-4A* регулирует баланс между массой 1000 зерен и числом зерен с колоса, при этом для *Hap-4A-C* характерно значимо большее число зерен в колосе, а для *Hap-4A-T* – высокая масса 1000 зерен [12]. В нашей коллекции подавляющее большинство генотипов имело гаплотип *Hap-4A-C*, число зерен в колосе которых в среднем составило 40,95 шт., что было значимо выше, чем у *Hap-4A-T* (18,68 шт.). Благоприятный гаплотип *Hap-5D-C* установлен у всех изученных нами генотипов.

AGPase считается ключевым ферментом, участвующим в синтезе крахмала в эндосперме пшеницы. Он катализирует превращение глюкозо-1-фосфата в АДФ-глюкозу. Данный фермент состоит из двух малых (SSU) и двух больших (LSU) субъединиц, имеющих цитозольную и пластидную изоформы. В большинстве растительных клеток AGPase присутствует исключительно в пластидах (SSU II и LSU II), но у зерновых культур обнаруживается главным образом в цитозоле (SSU I и LSU I) [14]. Поскольку 65–95 % общей активности AGPase в эндосперме пшеницы приходится на цитоплазму, то большая часть ADP-Glc для синтеза крахмала синтезируется в цитоплазме, в связи с чем белок BT1, ответственный за трансмембранную транспортировку ADP-Glc, также играет жизненно важную роль в биосинтезе крахмала. Известно, что у пшеницы гены *TaAGP-SI* и *TaAGP-L*, кодирующие специфичные для эндосперма SSU I и LSU I, локализованы на гомеологичных хромосомах 7-й и 1-й группы соответственно. Исследование 245 образцов пшеницы выявило полиморфные сайты только у *TaAGP-SI-7A* и *TaAGP-L-1B*, на основании которых выделено по два гаплотипа (*Hap-I* и *Hap-II*) для каждого гена, ассоциированные с массой 1000 зерен [13]. В работе Y. Wang et al. [5] продемонстрировано, что *TaBT1* в основном экспрессируется в развивающихся зернах, а снижение уровня экспрессии данного гена приводит к уменьшению общего содержания крахмала и массы 1000 зерен у пшеницы. Изучение трех гомеологичных генов *TaBT1*, расположенных на хромосомах 6A, 6B и 6D, выявило полиморфизм только в локусе *TaBT1-6B*, где 24 полиморфных участка образуют три гаплотипа (*Hap1*, *Hap2* и *Hap3*). Показано, что гаплотипы *Hap-I TaAGP-SI-7A*, *Hap-I TaAGP-L-1B*, *Hap1* и *Hap2 TaBT1-6B* ассоциированы с высокой массой зерен пшеницы [5, 13].

В нашей выборке полиморфизм установлен для генов *TaAGP-SI-7A* (76,4 % имел гаплотип *Hap-I* и 23,6 % – *Hap-II*) и *TaBT1-6B* (2,5 % – *Hap1* и 97,5 % – *Hap2*), в то время как *TaAGP-L-1B* был представлен только благоприятным гаплотипом *Hap-I*.

Значимая связь с массой 1000 зерен выявлена нами для всех генов за исключением *TaSus2-2A* (таблица), что находит подтверждение в работах зарубежных ученых. Например, изучение влия-

ния аллелей 14 генов на массу 1000 зерен в двух различных выборках пшеницы из коллекции CIMMYT (EYT2015-16 и WAMI) также не показало ассоциацию генов *TaSus2* с данным признаком [15].

Ассоциация с признаками «число зерен с колоса» и «продуктивная кустистость» показана главным образом для генов, кодирующих фермент сахарозсинтазу (таблица). Возможно, это связано с тем, что данный фермент кроме важной роли в биосинтезе крахмала выполняет также ряд других функций: участвует в дыхании растительных клеток, биосинтезе клеточной стенки и в обеспечении энергией для загрузки ассимилятов во флоэму [16, 17].

**Сравнение средних значений признаков продуктивности у генотипов пшеницы
с различными гаплотипами генов, контролирующих синтез крахмала**

**Comparison of mean productivity traits of different haplotypes
of genes controlling starch synthesis in wheat genotypes**

Ген/гаплотип	Масса 1000 зерен, г	Число зерен в колосе, шт.	Продуктивная кустистость, шт.
<i>TaSus2-2A</i>			
<i>Hap-A</i>	38,14 ± 0,15	40,65 ± 0,20	2,98 ± 0,01
<i>Hap-G</i>	37,97 ± 0,63	30,94 ± 0,78	3,62 ± 0,09
<i>p</i>	0,83	0,000	0,000
<i>TaSus2-2B</i>			
<i>Hap-H</i>	39,04 ± 0,31	40,90 ± 0,41	2,87 ± 0,03
<i>Hap-L</i>	37,96 ± 0,16	40,18 ± 0,22	2,97 ± 0,02
<i>p</i>	0,006	0,18	0,008
<i>TaSus1-7A</i>			
<i>Hap-1</i>	33,04 ± 0,43	31,82 ± 0,52	2,96 ± 0,05
<i>Hap-2</i>	37,34 ± 0,23	44,00 ± 0,28	2,97 ± 0,02
<i>Hap-3</i>	39,68 ± 0,20	38,90 ± 0,28	2,94 ± 0,02
<i>p</i>	0,000	0,000	0,47
<i>TaCWI-4A</i>			
<i>Hap-4A-C</i>	37,97 ± 0,15	40,95 ± 0,20	2,96 ± 0,01
<i>Hap-4A-T</i>	41,03 ± 0,86	18,68 ± 0,61	2,95 ± 0,10
<i>p</i>	0,005	0,000	0,96
<i>TaAGP-S1-7A</i>			
<i>Hap-I</i>	37,19 ± 0,16	40,31 ± 0,23	2,95 ± 0,02
<i>Hap-II</i>	41,53 ± 0,32	40,25 ± 0,38	2,94 ± 0,03
<i>p</i>	0,000	0,89	0,89
<i>TaBT1-6B</i>			
<i>Hap1</i>	39,85 ± 0,80	40,54 ± 0,76	2,88 ± 0,07
<i>Hap2</i>	38,07 ± 0,15	40,29 ± 0,20	2,96 ± 0,01
<i>p</i>	0,02	0,81	0,27

Примечание. *p* – уровень значимости различий между гаплотипами. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

В нашей коллекции подавляющее большинство генотипов имело благоприятные гаплотипы генов *TaSus2-2A* (*Hap-A*), *TaSus1-7B* (*Hap-T*), *TaCWI-4A* (*Hap-4A-C*) и *TaCWI-5D* (*Hap-5D-C*), *TaAGP-L-1B* (*Hap-I*), *TaBT1-6B* (*Hap2*) (рис. 3), что объясняется доминированием данных гаплогенов.

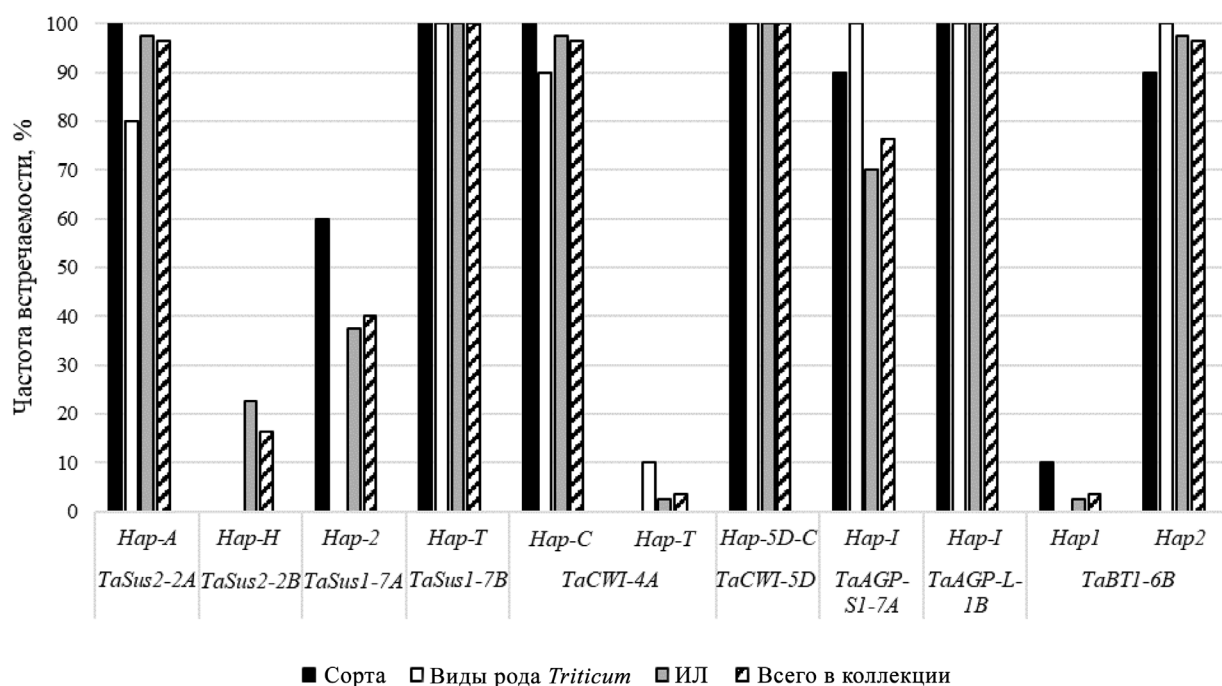


Рис. 3. Частота встречаемости благоприятных гаплотипов генов, ассоциированных с признаками продуктивности, в четырех группах генотипов пшеницы (сорта, образцы видов *Triticum*, ИЛ, всего в коллекции)

Fig. 3. Frequency of favorable gene haplotypes associated with productivity traits in four groups of wheat genotypes (varieties, samples of *Triticum* species, introgression lines and total in the collection)

типов во всех регионах мира, выращивающих пшеницу. Например, в Европе доля сортов с *Hap-A* и *Hap-T* составила 95,4 и 87,4 %, в Северной Америке – 90,2 и 86,4 %, в Китае – 73,0 и 73,9 % соответственно [11]. Изучение коллекции пшеницы, включающей сорта из Европы (84), Америки (436), Канады (54), Мексики (53), России (83) и Австралии (51), показало высокую частоту *Hap-4A-C* и *Hap-5D-C* во всех регионах. Сильный положительный отбор *Hap-5D-C* отмечен в большинстве стран, только несколько сортов (главным образом из Мексики и Австралии) имели гаплотип *Hap-5D-G* [12].

Согласно литературным данным благоприятными гаплотипами гена *TaSus2-7A* являются *Hap-1* и *Hap-2*, при этом в выборке сортов из Европы и Северной Америки наиболее широко представлен *Hap-2* [11]. В нашей коллекции у большей части сортов также обнаружен данный гаплотип (60 %), и в целом в коллекции таких образцов было 40 % (рис. 3). Однако наряду с *Hap-2* большое количество исследованных нами генотипов имело *Hap-3* (50,9 %), которые также характеризовались высокими показателями по зерновой продуктивности (таблица). Кроме того, в нашей выборке с высокой массой 1000 зерен ассоциирован гаплотип *Hap-II TaAGP-S1-7A*, что не согласуется с данными, полученными при анализе коллекции китайских сортов [13]. Противоречивые результаты об ассоциациях известных генов с признаками продуктивности в различных популяциях пшеницы встречаются и в других исследованиях. Например, выявленные ранее у китайских сортов пшеницы благоприятные аллели генов *TaGs3-D1* [18] и *TaTGW6* [19] у генотипов из коллекции CIMMYT снижали TGW [15]. Существует предположение, что генетические эффекты генов зависят от условий окружающей среды и генетического окружения, что необходимо учитывать при использовании генов в маркер-сопутствующей селекции.

Генотипов с *Hap-H* гена *TaSus2-2B* в нашем исследовании было значительно меньше (16,4 %), чем с неблагоприятным *Hap-L* (83,6 %), что подтверждается данными литературы, согласно которым направленный отбор по *Hap-H* типу характерен для сортов китайской селекции, но

не мировой. Так, в коллекциях из 348 современных сортов китайской селекции и 200 сортов озимой пшеницы Китая доля сортов *Hap-H* типа составила более 50 % [3, 20]. Среди образцов европейской селекции гаплотип *Hap-H* выявлен только для 13 % сортов, а в коллекциях СИММУТ доля таких образцов была еще ниже – 0,3–0,4 % [3, 15].

Частота встречаемости благоприятных гаплотипов у сородичей пшеницы, как правило, была незначительно меньше, чем у сортов, у ИЛ – на уровне сортов (рис. 3). Можно отметить, что у образца *T. kiharae* выявлен гаплотип *Hap-4A-T TaCWI-4A*, ассоциированный с высокой массой 1000 зерен, в то время как у остальных родительских генотипов – *Hap-4A-C*, ассоциированный с высоким числом зерен в колосе.

У всех генотипов нашей коллекции выявлены благоприятные гаплотипы генов *TaAGP-L-1B*, *TaCWI-5D* и *TaSus1-7B*, однако сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей полиморфных участков данных генов показал, что образцы родственных видов (*T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. kiharae*) отличаются от сортов мягкой пшеницы. Например, в гене *TaSus1-7B* у *T. dicoccum* к-45926 установлено 2 SNP, у *T. dicoccoides* – 3 SNP, у *T. kiharae* – 16 SNP. Кроме того, у *T. kiharae* в 11 интроне обнаружена новая инсерция TGGTATA. Следует отметить, что полиморфные варианты обнаружены главным образом в промоторе *TaAGP-L-1B* или интронных областях генов *TaCWI-5D* и *TaSus1-7B* и могут приводить к изменению экспрессии генов. Существенное отличие *T. kiharae* от остальных изученных генотипов пшеницы связано с его происхождением. Известно, что данный искусственно синтезированный вид (*AtAtGGDD*) относится к группе *Timopheevi*, в то время как *T. aestivum* (AABBDD) – к группе *Emmer*. В/Г геномы полиплоидных пшениц значительно дивергировали относительно друг друга. В целом хромосомы G-генома *T. timopheevii* имеют больше сходных признаков с хромосомами S-генома *Aegilops speltoides* по сравнению с В-геномом пшениц группы *Emmer* (*T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. aestivum*). Зарубежными учеными также показан большой полиморфизм генов *TaSus1* [11] и *TaCWI* [12] у сородичей пшеницы по сравнению с современными сортами, что указывает на существенное сокращение аллельного разнообразия данных генов в процессе полиплоидизации, доместикации и селекции пшеницы.

Заключение. В коллекции из 10 сортов мягкой пшеницы, 5 образцов видов рода *Triticum* и 40 ИЛ, полученных на их основе, определен аллельный состав 9 генов, играющих важную роль в синтезе крахмала (*TaSus2-2A*, *TaSus2-2B*, *TaSus1-7A*, *TaSus1-7B*, *TaCWI-4A*, *TaCWI-5D*, *TaAGP-S1-7A*, *TaAGP-L-1B*, *TaBT1-6B*) и ассоциированных с признаками продуктивности. Полиморфизм не обнаружен только для генов *TaCWI-5D* и *TaAGP-L-1B*. Установлен значимый вклад генов *TaSus2-2B*, *TaSus1-7A*, *TaCWI-4A*, *TaAGP-S1-7A*, *TaBT1-6B* в изменчивость массы 1000 зерен; генов *TaSus2-2A*, *TaSus1-7A*, *TaCWI-4A* – в изменчивость числа зерен с колоса; генов *TaSus2-2A* и *TaSus2-2B* – в изменчивость продуктивной кустистости. Частота встречаемости благоприятных гаплотипов у сородичей пшеницы незначительно уступала таковой у сортов, у ИЛ – была на уровне сортов.

Анализ признаков, определяющих урожайность пшеницы, показал, что в среднем за 4-летний период исследования сородичи мягкой пшеницы значительно превосходили сорта по продуктивной кустистости, уступали по числу зерен с колоса и достоверно не отличались по массе 1000 зерен. Включение чужеродного генетического материала в геном пшеницы не оказало отрицательного влияния на основной показатель продуктивности – массу 1000 зерен, которая в среднем у ИЛ была достоверно выше (38,51 г), чем у сортов (36,91 г). Образцы родственных видов пшеницы и ИЛ, в отличие от сортов, продемонстрировали способность формировать более выполненное зерно в засушливых условиях, что также представляет ценность для селекции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке проекта 2.10.2 ГПНИ «Биотехнологии-2».

Acknowledgements. This work was carried out under the support of project 2.10.2. of the State Program for Fundamental Research “Biotechnology-2”.

Список использованных источников

1. Genetic dissection of quantitative trait loci for grain size and weight by high-resolution genetic mapping in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / T. Li, G. Deng, Y. Su [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2022. – Vol. 135, N 1. – P. 257–271. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03964-2>
2. Combining protein content and grain yield by genetic dissection in bread wheat under low-input management / J. Ma, Y. Xiao, L. Hou, Y. He // Foods. – 2021. – Vol. 10, N 5. – Art. 1058. <https://doi.org/10.3390/foods10051058>
3. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSus2*) active in endosperm development is associated with yield traits / Q. Jiang, J. Hou, C. Hao [et al.] // Functional & Integrative Genomics. – 2011. – Vol. 11, N 1. – P. 49–61. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0188-x>
4. Koch, K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development / K. E. Koch // Current Opinion in Plant Biology. – 2004. – Vol. 7, N 3. – P. 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
5. *TaBT1*, affecting starch synthesis and thousand kernel weight, underwent strong selection during wheat improvement / Y. Wang, J. Hou, H. Liu [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2019. – Vol. 70, N 5. – P. 1497–1511. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz032>
6. Nevo, E. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement / E. Nevo, G. Chen // Plant, Cell and Environment. – 2010. – Vol. 33, N 4. – P. 670–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02107.x>
7. Genome-wide association study for grain micronutrient concentrations in wheat advanced lines derived from wild emmer / J. Liu, L. Huang, T. Li [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – Art. 651283. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.651283>
8. Минеральный состав зерна линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала / О. А. Орловская, С. И. Вакула, Л. В. Хотылева, А. В. Кильчевский // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2023. – Т. 184, № 1. – С. 42–52. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-1-42-52>
9. Эффекты генов *NAM-I* на содержание белка в зерне и показатели продуктивности у линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала в условиях Беларуси / О. А. Орловская, С. И. Вакула, К. К. Яцевич [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2023. – Т. 27, № 3. – С. 197–206. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-26>
10. Погода и климат: [сайт]. – 2004–2025. – URL: <http://www.pogodaiklimat.ru> (дата обращения: 03.03.2025).
11. Global selection on sucrose synthase haplotypes during a century of wheat breeding / J. Hou, Q. Jiang, C. Hao [et al.] // Plant Physiology. – 2014. – Vol. 164, N 4. – P. 1918–1929. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232454>
12. A yield-associated gene *TaCWI*, in wheat: its function, selection and evolution in global breeding revealed by haplotype analysis / Y. Jiang, Q. Jiang, C. Hao [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2015. – Vol. 128, N 1. – P. 131–143. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2417-5>
13. ADP-glucose pyrophosphorylase genes, associated with kernel weight, underwent selection during wheat domestication and breeding / J. Hou, T. Li, Y. Wang [et al.] // Plant Biotechnology Journal. – 2017. – Vol. 15, N 12. – P. 1533–1543. <https://doi.org/10.1111/pbi.12735>
14. Increasing the starch content and grain weight of common wheat by overexpression of the cytosolic AGPase large subunit gene / G. Kang, G. Liu, X. Peng [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2013. – Vol. 73. – P. 93–98. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.09.003>
15. Validation of candidate gene-based markers and identification of novel loci for thousand-grain weight in spring bread wheat / D. Sehgal, S. Mondal, C. Guzman [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2019. – Vol. 10. – Art. 1189. <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.01189>
16. Carbon partitioning to cellulose synthesis / C. H. Haigler, M. Ivanova-Datcheva, P. S. Hogan [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2001. – Vol. 47, N 1. – P. 29–51. <http://doi.org/10.1023/A:1010615027986>
17. Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development / H. Fallahi, G. N. Scofield, M. R. Badger [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2008. – Vol. 59, N 12. – P. 3283–3295. <http://doi.org/10.1093/jxb/ern180>
18. Functional markers developed from *TaGS3*, a negative regulator of grain weight and size, for marker-assisted selection in wheat / W. Zhang, H. Li, L. Zhi [et al.] // The Crop Journal. – 2020. – Vol. 8, N 6 – P. 943–952. <http://doi.org/10.1016/j.cj.2020.03.003>
19. *TaTGW6-A1*, an ortholog of rice *TGW6*, is associated with grain weight and yield in bread wheat / M. Hanif, F. Gao, J. Liu [et al.] // Molecular Breeding. – 2016. – Vol. 36, N 1. – Art. 1. <https://doi.org/10.1007/s1032-015-0425-z>
20. Variation in allelic frequencies at loci associated with kernel weight and their effects on kernel weight-related traits in winter wheat / T. Li, H. Liu, C. Mai [et al.] // The Crop Journal. – 2019. – Vol. 7, N 1. – P. 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.08.002>

References

1. Li T., Deng G., Su Y., Yang Z., Tang Y., Wang J., Zhang J., Qiu X., Pu X., Yang W., Li J., Liu Z., Zhang H., Liang J., Yu M., Wei Y., Long H. Genetic dissection of quantitative trait loci for grain size and weight by high resolution genetic mapping in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, vol. 135, no. 1, pp. 257–271. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03964-2>

2. Ma J., Xiao Y., Hou L., He Y. Combining protein content and grain yield by genetic dissection in bread wheat under low-input management. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 5, art. 1058. <https://doi.org/10.3390/foods10051058>
3. Jiang Q., Hou J., Hao C., Wang L., Ge H., Dong Y., Zhang X. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSus2*) active in endosperm development is associated with yield traits. *Functional & Integrative Genomics*, 2011, vol. 11, no. 1, pp. 49–61. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0188-x>
4. Koch K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, vol. 7, no. 3, pp. 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
5. Wang Y., Hou J., Liu H., Li T., Wang K., Hao C., Liu H., Zhang X. *TaBTL*, affecting starch synthesis and thousand kernel weight, underwent strong selection during wheat improvement. *Journal of Experimental Botany*, 2019, vol. 70, no. 5, pp. 1497–1511. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz032>
6. Nevo E., Chen G. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell and Environment*, 2010, vol. 33, no. 4, pp. 670–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02107.x>
7. Liu J., Huang L., Li T., Liu Y., Yan Z., Tang G., Zheng Y., Liu D., Wu B. Genome-wide association study for grain micronutrient concentrations in wheat advanced lines derived from wild emmer. *Frontiers in Plant Science*, 2021, vol. 12, art. 651283. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.651283>
8. Orlovskaya O. A., Vakula S. I., Khotyleva L. V., Kil'chevskii A. V. Mineral composition of bread wheat lines with introgressions of the alien genetic material. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii* [Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding], 2023, vol. 184, no. 1, pp. 42–52 (in Russian). <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-1-42-52>
9. Orlovskaya O. A., Vakula S. I., Yatsевич K. K., Khotyleva L. V., Kil'chevskii A. V. Effect of *NAM-1* genes on the protein content in grain and productivity indices in common wheat lines with foreign genetic material introgressions in the conditions of Belarus. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2023, vol. 27, no. 3, pp. 197–206 (in Russian). <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-26>
10. *Weather and climate*. Available at: <http://www.pogodaiklimat.ru> (accessed 03.03.2025) (in Russian).
11. Hou J., Jiang Q., Hao C., Wang Y., Zhang H., Zhang X. Global selection on sucrose synthase haplotypes during a century of wheat breeding. *Plant Physiology*, 2014, vol. 164, no. 4, pp. 1918–1929. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232454>
12. Jiang Y., Jiang Q., Hao C., Hou J., Wang L., Zhang H., Zhang S., Chen X., Zhang X. A yield-associated gene *TaCWL*, in wheat: its function, selection and evolution in global breeding revealed by haplotype analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, vol. 128, no. 1, pp. 131–143. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2417-5>
13. Hou J., Li T., Wang Y., Hao C., Liu H., Zhang X. ADP-glucose pyrophosphorylase genes, associated with kernel weight, underwent selection during wheat domestication and breeding. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, vol. 15, no. 12, pp. 1533–1543. <https://doi.org/10.1111/pbi.12735>
14. Kang G., Liu G., Peng X., Wei L., Wang C., Zhu Y., Ma Y., Jiang Y., Guo T. Increasing the starch content and grain weight of common wheat by overexpression of the cytosolic AGPase large subunit gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, vol. 73, pp. 93–98. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.09.003>
15. Sehgal D., Mondal S., Guzman C., Garcia Barrios G., Franco C., Singh R., Dreisigacker S. Validation of candidate gene-based markers and identification of novel loci for thousand-grain weight in spring bread wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10, art. 1189. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01189>
16. Haigler C. H., Ivanova-Datcheva M., Hogan P. S., Salnikov V. V., Hwang S., Martin K., Delmer D. P. Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Molecular Biology*, 2001, vol. 47, no. 1, pp. 29–51. <http://doi.org/10.1023/A:1010615027986>
17. Fallahi H., Scofield G. N., Badger M. R., Chow W. S., Furbank R. T., Ruan Y.-L. Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *Journal of Experimental Botany*, 2008, vol. 59, no. 12, pp. 3283–3295. <http://doi.org/10.1093/jxb/ern180>
18. Zhang W., Li H., Zhi L., Su Q., Liu J., Ren X., Meng D., Zhang N., Ji J., Zhang X. Functional markers developed from *TaGS3*, a negative regulator of grain weight and size, for marker-assisted selection in wheat. *The Crop Journal*, 2020, vol. 8, no. 6, pp. 943–952. <http://doi.org/10.1016/j.cj.2020.03.003>
19. Hanif M., Gao F., Liu J., Wen W., Zhang Y., Rasheed A., Xia X., He Z., Cao S. *TaTGW6-A1*, an ortholog of rice *TGW6*, is associated with grain weight and yield in bread wheat. *Molecular Breeding*, 2016, vol. 36, no. 1, art. 1. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0425-z>
20. Li T., Liu H., Mai C., Yu G., Li H., Meng L., Jian D., Yang L., Zhou Y., Zhang H., Li H. Variation in allelic frequencies at loci associated with kernel weight and their effects on kernel weight-related traits in winter wheat. *The Crop Journal*, 2019, vol. 7, no. 1, pp. 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.08.002>

Информация об авторах

Орловская Ольга Александровна – канд. биол. наук, доцент, заместитель заведующего лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Orlovskaya@igc.by. <https://orcid.org/0000-0002-1187-1317>

Information about the authors

Olga A. Orlovskaya – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Deputy Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Orlovskaya@igc.by. <https://orcid.org/0000-0002-1187-1317>

Яцевіч Констанцыя Константиновна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: K.Yatsevich@igc.by. <https://orcid.org/0009-0001-7040-4671>

Милько Лариса Викентьевна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: L.Milko@igc.by.

Кильчевский Александр Владимирович – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). Заместитель Председателя Президиума НАН Беларуси (пр-т Независимости, 66, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by. <https://orcid.org/0000-0002-0175-9786>

Kanstantsyia K. Yatsevich – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: K.Yatsevich@igc.by. <https://orcid.org/0009-0001-7040-4671>

Larisa V. Milko – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: L.Milko@igc.by

Alexander V. Kilchevsky – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Belarus). Deputy Chairman of the Presidium. The National Academy of Sciences of Belarus (66, Independence Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by. <https://orcid.org/0000-0002-1187-1317>

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 57.033;577.218
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-304-315>

Поступила в редакцию 11.04.2025
 Received 11.04.2025

В. С. Мацкевич¹, В. В. Демидчик²

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СИСТЕМЫ СТРЕССОВОГО ОТВЕТА, В КОРНЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТОКСИЧЕСКИХ УРОВНЕЙ Ni^{2+} В СРЕДЕ И ВЛИЯНИЕ НА НЕГО ЭКЗОГЕННОГО L-ГИСТИДИНА

Аннотация. Никель является для высших растений эссенциальным трэйс-элементом, входящим в состав уреазы, глиоксилазы и ряда гидрогеназ. Однако в высоких концентрациях данный металл подавляет рост и развитие растений. Токсичные для растений уровни Ni^{2+} ($>10^{-5}$ М) характерны для почв, сформированных из вулканических пород, вблизи горнодобывающих и металлургических комбинатов, свалок, мест захоронения отходов. Повышенное содержание уровня никеля в почвах зарегистрировано и на некоторых территориях Беларуси. В представленной работе исследовано воздействие диапазона токсических концентраций Ni^{2+} (0,3–2 ммоль/л NiCl_2) на экспрессию ряда важнейших генов стрессового ответа у модельных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., а также влияние на этот процесс природного защитного агента растений – L-гистидина (Гис), усиленно синтезируемого растениями при никелевом стрессе и способного связывать Ni^{2+} . В ходе проведенных опытов с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) было обнаружено, что введение Ni^{2+} в культивационную среду вызывало дозозависимое увеличение относительной экспрессии генов, кодирующих глутатионредуктазу (*GR1*), НАДФН-оксидазу (*RBOHC*), Ca^{2+} -зависимую протеинкиназу (*CPK6*), каталазу (*CAT2*) и наружу-выпрямляющий K^+ -канал (*GORK1*). Максимальное увеличение наблюдалось при обработке 2 ммоль/л Ni^{2+} и составляло 5,9; 5,0; 3,0; 2,8 и 2,2 раза для транскриптов *RBOHC*, *GR1*, *CPK6*, *CAT2* и *GORK1* соответственно. В случае генов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (*PARP1*), циклина В2 (*CYC2*) и Cu/Zn-супероксиддисмутазы (*CSD2*) уровень транскриптов возрастал при низких уровнях Ni^{2+} , а затем снижался при его более высоких уровнях в среде. Введение Гис совместно с Ni^{2+} предотвращало Ni^{2+} -индуцированное изменение экспрессии генов. Таким образом, в работе продемонстрировано, что растения *A. thaliana* отвечают на избыток Ni^{2+} индукцией экспрессии ферментативных антиоксидантов, белков редокс- и Ca^{2+} -опосредуемой клеточной сигнализации, а также модификацией систем контроля деления и репликации ДНК; данный эффект находится под контролем экзогенного Гис.

Ключевые слова: тяжелые металлы, никель, физиология стресса, L-гистидин, активные формы кислорода, кальциевая сигнализация, редокс-регуляция, экспрессия генов, *Arabidopsis thaliana*

Для цитирования: Мацкевич, В. С. Изменение уровня экспрессии генов, кодирующих системы стрессового ответа, в корнях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. под действием токсических уровней Ni^{2+} в среде и влияние на него экзогенного L-гистидина / В. С. Мацкевич, Демидчик В. В. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 304–315. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-304-315>

Viera S. Mackievic¹, Vadim V. Demidchik²

¹Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ALTERATIONS IN EXPRESSION OF STRESS-RESPONSIVE GENES IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ROOTS INDUCED BY TOXIC Ni^{2+} LEVELS AND JOINT APPLICATION OF Ni^{2+} AND L-HISTIDINE

Abstract. Nickel (Ni) is an essential trace element for higher plants, being a part of urease, glyoxylases and hydrogenases. However, in high concentrations, this metal exerts a pronounced toxic effect. Levels of Ni^{2+} that are toxic to plants ($>10^{-5}$ M) are typical for soils formed from volcanic rocks, near mining and metallurgical plants, landfills, waste disposal sites. Elevated nickel levels are also recorded in the soils of Belarus. In the presented work, we examined the effect of a range of toxic Ni^{2+} concentrations (0.3–2 mM NiCl_2) on the expression of a number of important stress response genes in model plants *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., as well as the effect of a natural plant protective agent, L-histidine (His), which is intensively synthesized by plants under nickel stress and is able to bind Ni^{2+} , on this process. In the experiments conducted

using the Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method, it was found that the introduction of Ni^{2+} into the culture medium caused a dose-dependent increase in the relative expression of genes encoding glutathione reductase (*GR1*), NADPH oxidase (*RBOHC*), Ca^{2+} -dependent protein kinase (*CPK6*), catalase (*CAT2*) and outward-rectifying K^+ channel (*GORK1*). The maximum increase was observed upon treatment with 2 mM Ni^{2+} , relative transcript levels were 5.9, 5.0, 3.0, 2.8 and 2.2 times higher than in control for *RBOHC*, *GR1*, *CPK6*, *CAT2* and *GORK1* respectively. In the case of the genes encoding poly(ADP-ribose)-polymerase (*PARP1*), cyclin B2 (*CYCB2*), and Cu/Zn-superoxide dismutase (*CSD2*), the transcript levels increased at low Ni^{2+} concentrations and then decreased at higher Ni^{2+} concentrations in the medium. The introduction of His, in conjunction with Ni^{2+} , prevented the Ni^{2+} -induced change in gene expression. Thus, it was demonstrated that *A. thaliana* plants respond to excess Ni^{2+} by inducing the expression of enzymatic antioxidants, proteins involved in redox- and Ca^{2+} -mediated cellular signaling. This response is accompanied by alterations in the systems of control cell division and DNA replication, which can be regulated by exogenous His.

Keywords: heavy metals, nickel, stress physiology, L-histidine, reactive oxygen species, calcium signaling, redox regulation, gene expression, *Arabidopsis thaliana*

For citation: Mackievic V. S., Demidchik V. V. Alterations in expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. roots induced by toxic Ni^{2+} levels and joint application of Ni^{2+} and L-histidine. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 304–315 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-304-315>

Введение. Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является одной из важнейших причин снижения продуктивности сельскохозяйственных растений и повреждения дикой флоры [1–3]. Кроме того, токсические металлы, накапливающиеся в растениях, в дальнейшем попадают в пищевые цепи животных и человека. Одним из наиболее опасных тяжелых металлов является никель, содержание которого в почве за последние два десятилетия значительно увеличилось [4]. Данный элемент относится к одним из самых распространенных на Земле, составляя 1,8 % массы нашей планеты и превышая по этому показателю такие элементы, как Ca и Al. Это обуславливает очень высокие концентрации никеля в местах выхода вулканических пород – до нескольких грамм на килограмм сухой почвы (такие почвы называются серпентинными) [5, 6]. Никель также активно добывается (до 2–2,3 млн т в год во всем мире) и используется при производстве нержавеющей стали, цветных сплавов, аккумуляторных батарей, красителей и других продуктов [7]. Это создает дополнительный мощный источник загрязнения биосферы данным металлом.

Для окружающей среды особенно высокую опасность представляют соединения никеля, попадающие в атмосферу с выбросами вулканов, сталеплавильной промышленности, а также утечка ионных форм никеля из городских отходов [5]. В Беларуси средний уровень содержания никеля в почвах составляет около 3,0 мг/кг сухой массы [8]. Однако в некоторых городах (Минск, Борисов, Калинковичи, Полоцк, Гродно, Лида и Светлогорск) содержание никеля превышает предельно допустимую концентрацию (ПДК) и достигает 23–25 мг/кг сухой массы почвы [9–11]. По данным Национальной системы мониторинга окружающей среды, в 2021 г. повышенный уровень никеля (4,4-кратное превышение ориентировочно допустимой концентрации (ОДК)) регистрировался в 27,5 % проб почвы г. Гомеля, в отдельных случаях составляя 88,9 мг/кг сухой массы [12]. В 2022 г. высокое содержание никеля в почвах населенных пунктов (до 2,2 ОДК) было зарегистрировано в г. Гродно, где превышение ОДК фиксировалось в 24,5 % проанализированных проб [11].

Несмотря на то что никель участвует в метаболизме растений, входя в состав уреазы, глиоксилазы и ряда гидрогеназ, его дефицит встречается значительно реже, чем избыточное содержание в почве [13]. В современной физиологии растений никель все чаще рассматривается как микроэлемент, что отражает незначительную потребность в нем растений [14]. Для большинства видов растений содержание никеля в почве, превышающее 50–100 мг/кг сухой массы, является токсичным [15]. Чрезмерные уровни никеля вызывают сильное ингибирование роста клеток и модифицируют дифференцировку тканей, индуцируют некротические симптомы, подавляют фотосинтез и клеточное дыхание, а также вызывает генотоксические эффекты [16–18]. В качестве механизма токсического влияния никеля на организм растения чаще всего рассматривается подавление работы супероксиддисмутаз, каталаз, оксидаз и пероксидаз, что приводит к истощению пула восстановленного аскорбата и тиол-содержащих антиоксидантов, избыточной продукции активных форм кислорода (АФК) и высокотоксичных терминальных продуктов окисления

органических молекул [16, 18–20]. Имеются работы, показывающие, что избыток никеля приводит к значительным изменениям в структуре и функционировании цитоскелета и белков веретена деления растительной клетки, что вызывает ошибки при репликации ДНК [21]. Клеточная стенка также является одной из мишеней токсического влияния никеля [22].

Недавно было установлено, что Ni^{2+} при взаимодействии с органическими лигандами, синтезируемыми растением в ответ на избыток этого металла, приобретает повышенную редокс-активность, схожую с ионами железа и меди [18]. Показано, что комплексы Ni^{2+} с L-гистидином (Гис) способны катализировать продукцию гидроксильных радикалов ($\text{HO}^\bullet$), запуская редокс- и Ca^{2+} -зависимые сигнальные явления в корнях *Arabidopsis thaliana* [18]. Предполагается, что таким образом Гис кроме прямой защиты от Ni^{2+} (хелатирования) способствует восприятию Ni^{2+} растительной клеткой, информация о котором транслируется на генетический уровень, включая механизмы защиты и адаптации.

Несмотря на то что имеются работы, указывающие на вовлечение систем редокс-метаболизма и Ca^{2+} -сигнализации, пока остается неясным, как избыток никеля в среде модифицирует активность важнейших генов, участвующих в детоксикации и производстве АФК, восприятии Ca^{2+} -сигналов и повышении устойчивости генетического аппарата. Неизвестно, как влияет на эти процессы природный стресс-протектант – экзогенный Гис. В этой связи целью настоящей работы являлось установление изменений в экспрессии генов, кодирующих системы редокс-метаболизма, Ca^{2+} -опосредуемой сигнализации и регуляции клеточного цикла, в корнях *A. thaliana* под действием токсических уровней Ni^{2+} , а также при совместном воздействии Ni^{2+} и экзогенного Гис. В качестве тестируемых генов были выбраны следующие: *CAT2*, *CPK6*, *CSD2*, *CYCB2*, *GORK1*, *GRI*, *PARP1*, *RBOHC*, являющиеся одними из наиболее реферируемых в работах по проблеме окислительного стресса, токсичности тяжелых металлов, а также редокс- и Ca^{2+} -опосредуемой сигнализации у высших растений (согласно метаанализу данных по публикациям Web of Science за 2024 г.). Объектом исследования служили корни *A. thaliana* – важнейшего модельного вида в биологии растений.

Объекты и методы исследования. Работа проводилась на корнях 10-дневных проростков *A. thaliana* природного экотипа Columbia-0 (Col-0). Семена были получены из Ноттингемского центра семян *Arabidopsis thaliana* (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, Великобритания). Растения культивировались в стерильных условиях на поверхности среды Мурасиге и Скуга (Duchefa Biochemie, Нидерланды) с добавлением 1 % сахарозы и 0,25 % геллановой камеди (PhytigelTM, Sigma-Aldrich, США), pH 6,0 (KOH), при температуре 22 °C, световом режиме 16 ч свет/8 ч темнота и плотности светового потока 100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Введение в среду выращивания никеля ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; AppliChem, Германия, A3917,0100) и Гис (L-histidine; Sigma-Aldrich, H8000) осуществлялось после прорастания семян на 5-е сутки после помещения в ростовые камеры. На 10-е сутки культивирования (5-е сутки после добавления стрессоров) производилось измерение ростовых характеристик молодых растений. Далее корни отрезались при помощи лезвия, отделялись от среды и замораживались в жидком азоте для молекулярно-генетического анализа.

Выделение РНК осуществлялось при помощи набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрация РНК измерялась на спектрофотометре SmartSpecTM Plus Spectrophotometer (Bio-Rad, США), и 1,5 мкг общей РНК использовалось для синтеза кДНК. Обратная транскрипция проводилась с использованием SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для ПЦР-ПВ применялась система LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, Швейцария) с соответствующими праймерами (дизайн и анализ праймеров осуществлялся в онлайн-приложении Primer3web v.4.1.0 (таблица)) и ПЦР-амплификатор LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Условия ПЦР-ПВ: 95 °C – 5 мин (1 цикл); 95 °C – 10 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с (45 циклов); 95 °C – 30 с, 65 °C – 1 мин, 97 °C – 30 с (1 цикл); 40 °C – 10 мин (1 цикл). Анализ полученных данных производился при помощи LightCycler® 480 Software v.1.5 (Roche). Уровень транскриптов генов рассчитывался при помощи метода $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, нормализация осуществлялась по стандартным референсным генам *ACT2* и *SAND* (таблица). Эксперименты проводились в 5-6 повторях для каждого варианта опыта.

Последовательности праймеров, использованных в работе
Sequences of primers used in the study

Ген (локус)	Последовательности праймеров 5'–3'		Продукт	Источник
<i>ACT2 (AT3G18780)</i>	Прямой	CTTGACCAAGCAGCATGAA	Актин 2	[23]
	Обратный	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT		
<i>SAND (AT2G28390)</i>	Прямой	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	SAND-белок	[23]
	Обратный	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC		
<i>CAT2 (AT4G35090)</i>	Прямой	TCCGTTCCCTGTGCAAAATTG	Каталаза 2	[24]
	Обратный	AACTCCTCCATGACCGTTGGA		
<i>CPK6 (AT2G17290)</i>	Прямой	AGACAACGATGGACGGATTG	Ca ²⁺ -зависимая протеинкиназа 6	[25]
	Обратный	CTCCCTACACCAGCATTTCC		
<i>CSD2 (AT2G28190)</i>	Прямой	GAGCCTTTGTGGTTCACGAG	Cu/Zn- супероксиддисмутаза	[24]
	Обратный	CACACCACATGCCAATCTCC		
<i>CYCB2 (AT2G17620)</i>	Прямой	TCAGTTCCAAGTGCTAACGA	Циклин B2	*
	Обратный	TCCTCCATCTCAACTTCTTCC		
<i>GORK1 (AT5G37500)</i>	Прямой	GGCTGTGAAAGCAGGACAAG	Наружу- выпрямляющий K ⁺ -канал GORK	*
	Обратный	TCGCCTTTAGCAACTGTCTGT		
<i>GR1 (AT3G24170)</i>	Прямой	CTCAAGTGTGGAGCAACCAAAG	Глутатионредуктаза 1	[24]
	Обратный	ATGCGTCTGGTCACACTGC		
<i>PARP1 (AT2G31320)</i>	Прямой	TGCTCTTGAAAGAGAAGGAGAG	Поли(АДФ-рибоза)- полимераза	*
	Обратный	TAATCGAGAACCATGCCATAGG		
<i>RBOHC (AT5G51060)</i>	Прямой	TCACCAGAGACTGGCACAATAAA	НАДФН-оксидаза типа С	[24]
	Обратный	GATGCTCGACCTGAATGCTC		

Примечание. * – праймеры сконструированы в настоящей работе.

Для статистической обработки данных применялись стандартные методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками служили средняя арифметическая величина ($\bar{X}$), среднее квадратичное отклонение (σ) и ошибка средней величины ($S_{\bar{x}}$). Средние значения сравнивались между группами с использованием t-критерия Стьюдента и одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), а значимость различий рассматривалась при $p < 0,05$. Расчеты производились в MS Excel 2016 и SigmaPlot 10.0 (StatSoft, США).

Результаты и их обсуждение. Важнейшим физиологическим процессом растения, ингибируемым тяжелыми металлами, является рост растяжением, в частности, весьма чувствительным является удлинение корня. Это связано с тем, что большинство высших растений относятся к видам-исключателям, для которых характерно предотвращение входа тяжелых металлов в надземные органы на уровне корня (явление «корневого барьера»), приводящее к накоплению металлов в этом органе и подавлению его роста [13, 26, 27]. В настоящей работе для анализа воздействия никеля на рост корней *A. thaliana* были использованы ранее разработанные в нашей лаборатории ростовые тесты в гелевой среде, отличающиеся высокой степенью стандартизации условий и стабильностью данных (рис. 1). Было показано, что статистически достоверное ингибирование роста главного корня модельных растений *A. thaliana* наблюдалось при 0,3 ммоль/л Ni²⁺, а полумаксимальное угнетение роста – при приблизительно 2,6 ммоль/л (оценка проводилась при помощи SigmaPlot 10.0). При 0,3 ммоль/л Ni²⁺ ингибирование составляло 10–12 % ($p < 0,001$), при 0,6 ммоль/л – 20–25 %, при 1 ммоль/л – 30–40 %, при 2 ммоль/л – 45–55 %, при 3 ммоль/л – 50–60 % (рис. 1). Добавление к металлу Гис (лиганда-хелатора Ni²⁺) в соотношении 1 Ni²⁺ : 2 Гис оказывало протекторное влияние, блокируя токсическое действие Ni²⁺ на рост главного корня (рис. 1).

Ингибирование роста, обнаруженное в работе, указывает на то, что использованный концентрационный диапазон никеля (0,3–2 ммоль/л NiCl₂) вызывал угнетение ростовых процессов, т. е.

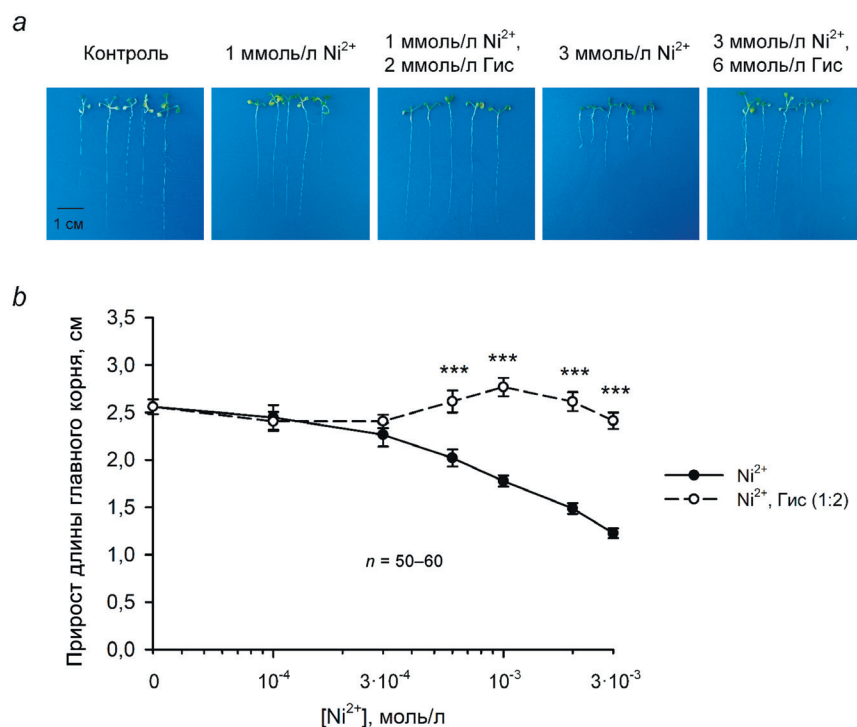


Рис. 1. Эффект Ni^{2+} и Ni-гистидиновых комплексов на рост корней *A. thaliana* (L.) Heynh. экотипа Col-0:
 а – фотографии проростков *A. thaliana*, выращенных в течение 10 сут в контрольных условиях и при добавлении различных концентраций Ni^{2+} и Ni-Гис(II) (Ni^{2+} , Гис в соотношении 1 : 2);
 б – прирост длины главного корня на 5-е сутки после обработки растений Ni^{2+} -содержащими растворами ($X \pm S_x$, $n = 50-60$). Достоверность различий рассчитывалась при помощи теста ANOVA между обработкой Ni^{2+} и Ni-Гис(II): *** – $p < 0,001$

Fig. 1. Effect of Ni^{2+} and Ni-His(II) treatment on root growth in *A. thaliana* (L.) Heynh. ecotype Col-0:
 а – typical ten-day-old seedlings grown in control and in media with Ni^{2+} and Ni-His(II) (Ni^{2+} , His in relation of 1 : 2);
 б – mean root length increment after five days from the introduction of Ni^{2+} to the medium ($X \pm SE$, $n = 50-60$).
 Statistics: Ni^{2+} and Ni-His(II) treatments were compared using ANOVA: *** – $p < 0.001$

проявлял выраженную токсичность, не вызывая при этом летального эффекта. Соответственно, данный диапазон концентраций отражал развитие нелетальной (сублетальной) токсичности и подходил для молекулярно-генетического анализа. Как следует из ростовых тестов, введение вместе с Ni^{2+} аминокислоты Гис снижало токсичность данного тяжелого металла. Согласно ранее полученным данным защитное действие Гис не может быть объяснено только хелатированием Ni^{2+} , а, вероятно, связано с повышением редокс-активности Ni^{2+} в комплексе Ni-Гис(II), обладающим сигнальными свойствами [18].

Дальнейшие опыты были направлены на изучение влияния протестированных концентраций Ni^{2+} и Ni-Гис(II) на экспрессию генов стрессового ответа (рис. 2, 3). Как уже указывалось ранее, в работе анализировалась экспрессия группы генов, кодирующих белки, ассоциированные с ответом растения на абиотические стресс-факторы (таблица). Как следует из данных, приведенных на рис. 2, с ростом концентрации Ni^{2+} наблюдалось многократное возрастание относительной экспрессии генов глутатионредуктазы (*GRI*), НАДФН-оксидазы (*RBOHC*), Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы 6 (*CPK6*), каталазы 2 (*CAT2*) и K^+ -канала, опосредующего выход K^+ из растительных клеток (*GORK1*). При росте растений на среде с 2 ммоль/л Ni^{2+} содержание транскриптов *RBOHC*, *GRI*, *CPK6*, *CAT2* и *GORK1* увеличивалось в 5,9; 5,0; 3,0; 2,8 и 2,2 раза соответственно. В случае генов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (*PARP1*), циклина В2 (*CYCB2*) и Cu/Zn-супероксиддисмутазы (*CSD2*) уровень транскриптов повышался при низких концентрациях Ni^{2+} и снижался на фоне высоких уровней данного металла. Максимальное увеличение экспрессии *CYCB2* и *CSD2* было отмечено при 0,6 ммоль/л Ni^{2+} (по сравнению с контролем на 69 и 144 % соответственно), а *PARP1* – при 1 ммоль/л Ni^{2+} (по сравнению с контролем на 94 %). На фоне 2 ммоль/л Ni^{2+} экспрессия *CSD2*

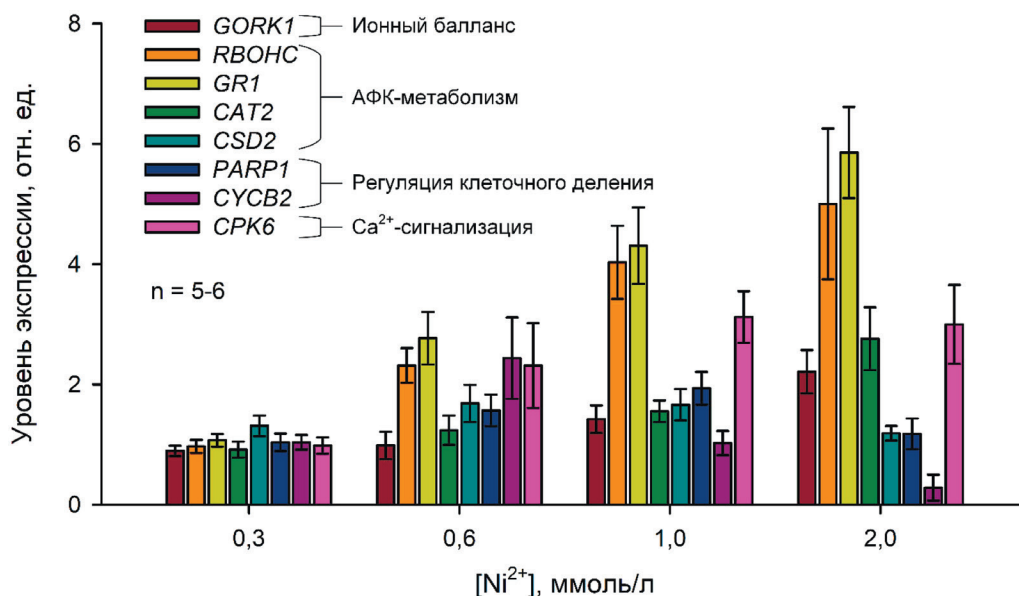


Рис. 2. Изменение относительного содержания транскриптов *CAT2*, *CPK6*, *CSD2*, *CYCB2*, *GORK1*, *GRI*, *PARP1*, *RBOHC* в корнях *A. thaliana* при росте растений на средах с добавлением 0,3–2 ммоль/л Ni^{2+} в течение 5 сут. Значения были нормализованы по референсным генам *ACT2* и *SAND* и соотношены к контрольному уровню ($X \pm S_x$; $n = 5-6$)

Fig. 2. Changes in the transcript levels of *CAT2*, *CPK6*, *CSD2*, *CYCB2*, *GORK1*, *GRI*, *PARP1*, *RBOHC* in *A. thaliana* roots grown on media containing 0.3–2 mM Ni^{2+} during 5 days. The expression levels were normalized by reference house-keeping genes *ACT2* and *SAND* and related to control ($X \pm SE$; $n = 5-6$)

и *PARP1* была лишь на 20 % выше контроля, а в случае с *CYCB2* уровень экспрессии при данной концентрации Ni^{2+} снижался на 70 % по сравнению со значениями в контрольных условиях (рис. 2).

В отдельной группе опытов было проведено сравнительное исследование воздействия 1 ммоль/л Ni^{2+} и смеси, содержащей 1 ммоль/л Ni^{2+} и 2 ммоль/л Гис (рис. 3). Как уже отмечалось, Гис – хелатор Ni^{2+} , биосинтез которого увеличивается как у обычных, так и Ni -толерантных видов, повышая их устойчивость к данному стрессору [28, 29]. Считается, что протекторное действие Гис развивается благодаря связыванию Ni^{2+} , а также активации АФК- и Ca^{2+} -сигнальных путей, запускающих адаптивные процессы [18]. Проведенные в работе тесты показали, что Гис предотвращал Ni^{2+} -индуцированную экспрессию генов, вовлеченных в АФК-метаболизм, ионный баланс, регуляцию клеточного деления и Ca^{2+} сигнализацию растений (рис. 3). При 1 ммоль/л Ni^{2+} уровень экспрессии *GORK1*, *RBOHC*, *GRI*, *CAT2*, *CSD2*, *PARP1*, *CYCB2*, *CPK6* возрастал в 1,6; 8,3; 4,3; 2,1; 1,6; 1,6; 1,1 и 2,9 раза по сравнению с контролем, а при совместной обработке 1 ммоль/л Ni^{2+} и 2 ммоль/л Гис значения изменений экспрессии снижались до 1,1; 1,5; 1,4; 1,5; 1,3; 1,2; 1,5 и 1,2 раза соответственно (рис. 3). Экспрессия оставалась повышенной, т. е. адаптивные явления, вероятно, запускались, но ее уровень был ниже, чем при воздействии одного лишь Ni^{2+} . Это, скорее всего, поддерживало анаболические и ростовые процессы на высоком уровне, так как подавления роста при добавлении Гис к Ni^{2+} не наблюдалось (рис. 1). Наибольшее снижение экспрессии Ni -индуцируемых генов в присутствии Гис было отмечено для *RBOHC*, *GRI*, *CPK6* и *GORK1* – на 82, 69, 58 и 27 % соответственно. Известно, что данные системы могут быть непосредственно вовлечены в АФК-зависимый стрессовый ответ высших растений [30]. *RBOHC* является ключевым ферментом синтеза АФК в апопласте и редокс-зависимого экспансивного роста клеток растений [31]. Ранее было показано, что нокаутные растения, лишённые *RBOHC*, обладают устойчивостью к высоким уровням никеля [18]. Таким образом, избыточная продукция АФК *RBOHC* может лежать в основе токсичности высоких уровней никеля для высших растений. Ионный канал *GORK1*, уровень экспрессии которого также возрастал при воздействии избытка никеля, ответственен за выход K^+ из растительных клеток и за метаболические K^+ -зависимые перестройки в норме и при стрессе [32]. *CPK6* участвует в Ca^{2+} -зависимой передаче сигналов от абсцизовой

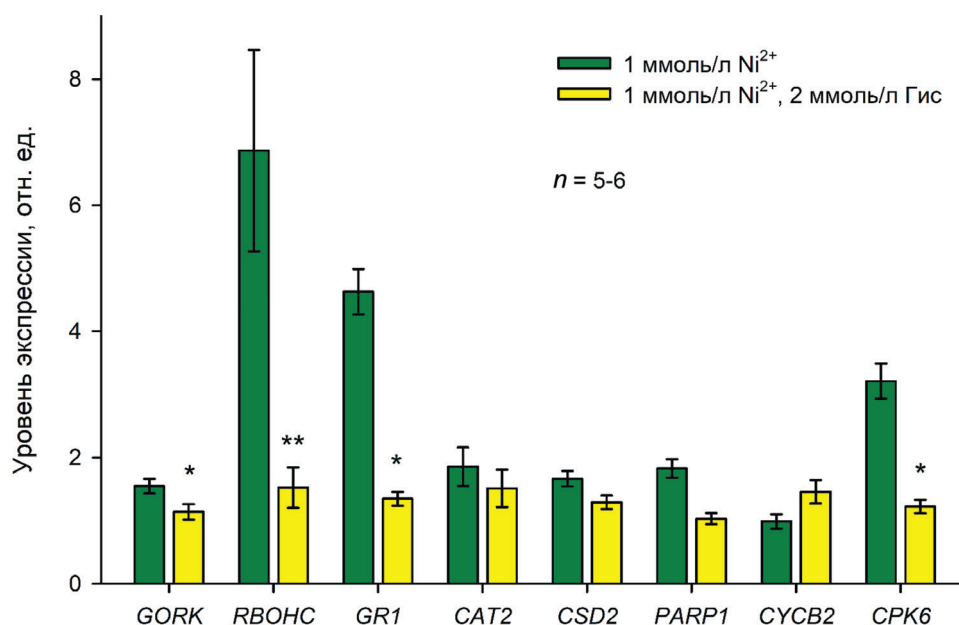


Рис. 3. Изменения относительного содержания транскриптов генов в корнях *A. thaliana*, выращенных на среде с добавлением 1 ммоль/л Ni^{2+} и смеси 1 ммоль/л Ni^{2+} и 2 ммоль/л Гис. Уровни экспрессии были нормализованы по референсным генам *ACT2* и *SAND* и соотнесены к контролю ($X \pm S_x$; $n = 5-6$). Достоверность различий рассчитывалась при помощи теста ANOVA между обработкой Ni^{2+} и Ni -Гис(II): * – $p < 0,050$; ** – $p < 0,01$

Fig. 3. Changes in transcript levels in *A. thaliana* roots grown on the medium, containing 1 mM Ni^{2+} and 1 mM Ni^{2+} , 2 mM His. The expression levels were normalized by reference genes *ACT2* and *SAND* and related to control ($X \pm SE$; $n = 5-6$). Statistics: Ni^{2+} and Ni -His(II) treatments were compared using ANOVA: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$

кислоты, жасмоната и прямой регуляции K^+ -каналов внутреннего выпрямления KAT2 [33], обеспечивая взаимосвязь гормональных, калиевых, метаболических и кальциевых путей сигнализации. GR1 поддерживает уровень ключевого антиоксиданта клеток растений – восстановленного глутатиона, вовлекаясь практически во все явления клеточной редокс-регуляции и репарацию при окислительном повреждении [34]. Несомненно, что за счет снижения экспрессии данных генов биосинтез Гис может способствовать более эффективному поддержанию АФК- и ионного баланса в компартментах растительной клетки.

Добавление Гис не во всех случаях ингибировало Ni^{2+} -индуцируемую экспрессию генов (рис. 2). Для *CYCB2* было отмечено увеличение экспрессии на 30–35 % по сравнению с обработкой Ni^{2+} без Гис (рис. 2). Циклины В-типа, как правило, контролируют переход от фазы G2 к фазе М клеточного цикла, а также участвуют в митозе, влияя на пролиферативную активность клеток [35]. Ранее отмечалось, что повышенная экспрессия *CYCB2* в меристеме корней высших растений может приводить к ускорению роста корней без увеличения размера клеток, т. е. в результате повышенной пролиферации [35]. Соответственно, введение Гис, вероятно, стимулировало деление клеток корня и одновременно ослабляло их растяжение вследствие подавления индукции *RBOHC*. Такая реакция может способствовать латеральному росту корня и контролю его удлинения, обеспечивая быстрое восстановление поврежденных клеток и формирование защитных тканей.

Проведенные опыты показали, что среди протестированных генов по уровню экспрессии наиболее чувствительными к Ni^{2+} являлись *RBOHC* и *GR1*. Выполненные ранее исследования показали, что растения-нокауты, лишённые *RBOHC*, демонстрируют снижение накопления неэссенциальных тяжелых металлов, а также металлов, относящихся к макро- и микроэлементам [36]. Утрата функциональных RBOH C, D и F была способна модифицировать транскрипцию пере-

носчиков тяжелых металлов NRAMP3, NRAMP6 и IRT1, а также K^+ -каналов GORK [36]. Это указывает на то, что воздействие на RBOHC может являться детерминирующим фактором как для токсичности никеля, так и для адаптации к высоким уровням этого металла в среде. Экспрессия *GR1* – маркер окислительного стресса, вызываемого некоторыми тяжелыми металлами, а также изменения общего баланса между произведенными и детоксицированными АФК в клетке [37, 38]. Считается, что активация GR1 при стрессе, вызываемом тяжелыми металлами, может быть обусловлена необходимостью усиленного синтеза протекторных молекул-хелаторов, таких как γ -глутамилцистеин и фитохелатины, из восстановленного глутатиона [39, 40]. В представленной работе впервые показано, что экспрессия *GR1* возрастает при никелевом стрессе, указывая на то, что данное стрессовое воздействие индуцирует сходные с другими тяжелыми металлами и окислителями свойства.

Заключение. Проблема загрязнения никелем почв и токсического влияния этого металла на растения отличается высокой актуальностью. На данном этапе важно понимание реакций растения на избыток никеля на клеточном и молекулярном уровне. В настоящей работе показано, что сублетальные токсические концентрации Ni^{2+} влияют на экспрессию ключевых генов, вовлеченных в АФК-метаболизм, поддержание ионного баланса, Ca^{2+} -сигналикации, регуляции клеточного цикла и пролиферации. Обнаружено многократное возрастание относительной экспрессии генов *GR1*, *RBOHC*, *CPK6*, *CAT2* и *GORK1* на фоне 0,3–2 ммоль/л Ni^{2+} . В случае генов *PARP1*, *CYCB2* и *CSD2* уровень транскриптов повышался при низких и снижался при высоких уровнях Ni^{2+} , что указывает на отличие в стратегиях адаптации генетической экспрессии на фоне разных по токсичности уровней Ni^{2+} в среде. Впервые продемонстрировано, что добавление Гис совместно с Ni^{2+} предотвращает Ni^{2+} -индуцируемые перестройки экспрессии генов стрессового ответа. Наиболее чувствительной к присутствию Гис была экспрессия генов *RBOHC*, *GR1* и *CPK6*. Сделано предположение, что эффект Гис способствует более эффективной настройке адаптационных процессов и высвобождению энергии, позволяющей восстановить рост и развитие растительного организма.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа была выполнена в рамках заданий БРФФИ (№ B25KI-086 «Установление механизмов снижения токсичности тяжелых металлов в высших растениях под действием квантовых точек, содержащих микроэлементы» (совместно с КНР) и B24-060-1 «Роль транспортеров малата в устойчивости высших растений к высоким уровням тяжелых металлов и алюминия в среде»); ГПНИ «Исследование мембранных механизмов модификации ростовых, сигнальных и транспортных процессов в клетках корня при взаимодействии высших растений с редокс-активными тяжелыми металлами» (№ госрегистрации 20241163); подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг., а также гранта Европейского Союза «Адаптация растений к тяжелым металлам и радиоактивному загрязнению» (PIRSES-GA-2013-612587).

Acknowledgements. This work was supported by projects of the BRFFR (No. B25KI-086 “Establishment of mechanisms for reducing the toxicity of heavy metals in higher plants under the influence of quantum dots containing trace elements” (joint with China) and B24-060-1 “The role of malate transporters in the resistance of higher plants to high levels of heavy metals and aluminum in the environment”), and also supported by the State Scientific Research Institute “Study of membrane mechanisms of modification of growth, signaling and transport processes in root cells during interaction of higher plants with redox-active heavy metals” (state registration No. 20241163), subprogram “Molecular and Cellular Biotechnologies 2” of the state research program “Biotechnologies 2” for 2021–2025. This work was also supported by the grant EU PIRSES-GA-2013-612587 (“Plant DNA tolerance – Plant adaptation to heavy metal and radioactive pollution”).

Список использованных источников

1. Bergmann, W. Nutritional Disorders of Plants: Development, Visual and Analytical Diagnosis / W. Bergman. – Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1992. – 741 p.
2. Nagajyoti, P. C. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review / P. C. Nagajyoti, K. D. Lee, T. V. M. Sreekanth // Environmental Chemistry Letters. – 2010. – Vol. 8, N 3. – P. 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
3. Barker, A. V. Handbook of Plant Nutrition / A. V. Barker, D. J. Pilbeam. – 2nd ed. – Boca Raton: CRC Press, 2015. – 773 p.
4. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment – A review / B. Shahzad, M. Tanveer, A. Rehman [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2018. – Vol. 132. – P. 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.014>

5. Dalir, N. Root uptake and translocation of nickel in wheat as affected by histidine / N. Dalir, A. H. Khoshgoftarmanesh // *Journal of Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 184. – P. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.05.017>
6. Мацкевич, В. С. Механизм трансмембранного и дальнего транспорта никеля в высших растениях / В. С. Мацкевич, В. В. Демидчик // *Экспериментальная биология и биотехнология*. – 2023. – № 2. – С. 4–29.
7. Welch, R. M. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective / R. M. Welch, R. D. Graham // *Journal of Experimental Botany*. – 2004. – Vol. 55, N 396. – P. 353–364. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh064>
8. Состояние природной среды Беларуси: экологич. бюл. / Е. И. Громадская, Д. В. Цубленок, М. В. Водейко [и др.]; под общ. ред. Е. И. Громадской. – Мн.: РУП «ЦНИИКИВР», 2024. – 196 с.
9. Состояние природной среды Беларуси: экол. бюл. 2013 г. / под ред. В. Ф. Логинова. – Мн.: Ин-т природопользования Нац. акад. наук Беларуси, 2014. – 361 с.
10. Толкач, Г. В. Содержание химических элементов в почвах на территории фермерских (крестьянских) хозяйств Брестского района / Г. В. Толкач, С. С. Позняк // *Экологический вестник*. – 2015. – № 3. – С. 79–88.
11. Состояние природной среды Беларуси: экол. бюл. / Е. И. Громадская, Д. В. Цубленок, М. В. Водейко [и др.]; под общ. ред. Е. И. Громадской. – Мн.: ЦНИИКИВР, 2023. – 151 с.
12. Национальная система мониторинга окружающей среды в Республике Беларусь: результаты наблюдений, 2021 год / под общ. ред. М. И. Лемутовой. – Мн.: Респ. центр по гидрометеорологии, контролю радиоактив. загрязнения и мониторингу окружающей среды, 2022. – 556 с.
13. Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. / H. Marschner; ed. P. Marschner. – 3rd ed. – London: Academic Press, 2012. – 684 p.
14. Alfalahi, A. O. Nanonutrients: Plant Nutritive and Possible Antioxidant Regulators / A. O. Alfalahi, F. W. Abdulqahar // *Nanobiotechnology* / eds.: J. M. Al-Khayri, M. I. Ansari, A. K. Singh. – Cham, 2021. – Ch. 21. – P. 471–498. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73606-4_21
15. Hanikenne, M. Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics / M. Hanikenne, C. Nouet // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2011. – Vol. 14, N 3. – P. 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.003>
16. Nickel in Soils and Plants / eds.: C. Tsadilas, J. Rinklebe, M. Selim. – Boca Raton: CRC Press, 2018. – 432 p.
17. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистидиновых комплексов / В. С. Мацкевич, А. А. Шикер, С. Н. Звонарев [и др.] // *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. – 2020. – № 1. – С. 11–19.
18. L-histidine makes Ni²⁺ ‘visible’ for plant signalling systems: Shading the light on Ni²⁺-induced Ca²⁺ and redox signalling in plants / V. Mackievic, Y. Li, P. Hryvusevich [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2025. – Vol. 220. – Art. 109227. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109227>
19. Physiological, biochemical and transcriptomic responses of *Medicago sativa* to nickel exposure / S. Helaoui, I. Bouhattas, S. Hattab [et al.] // *Chemosphere*. – 2020. – Vol. 249. – Art. 126121. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126121>
20. Transient influx of nickel in root mitochondria modulates organic acid and reactive oxygen species production in nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* / B. Agrawal, K. J. Czymmek, D. L. Sparks, H. P. Bais // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288, N 10. – P. 7351–7362. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.406645>
21. Yemets, A. Cadmium, nickel, copper, and zinc influence on microfilament organization in *Arabidopsis* root cells / A. Yemets, I. Horiunova, Y. Blume // *Cell Biology International*. – 2021. – Vol. 45, N 1. – P. 211–226. <https://doi.org/10.1002/cbin.11485>
22. Nickel Toxicity Targets Cell Wall-Related Processes and PIN2-Mediated Auxin Transport to Inhibit Root Elongation and Gravitropic Responses in *Arabidopsis* / A. Lešková, M. Zvarik, T. Araya, R. F. H. Giehl // *Plant Cell Physiology*. – 2020. – Vol. 61, N 3. – P. 519–535. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz217>
23. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* / T. Czechowski, M. Stitt, T. Altmann [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139, N 1. – P. 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
24. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana* / N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans [et al.] // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2010. – Vol. 101, N 11. – P. 923–930. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2010.06.008>
25. Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases / M. Boudsocq, M. R. Willmann, M. McCormack [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, N 7287. – P. 418–422. <https://doi.org/10.1038/nature08794>
26. Seregin, I. V. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants / I. V. Seregin, A. D. Kozhevnikova // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 53, N 2. – P. 257–277. <https://doi.org/10.1134/s1021443706020178>
27. A Comprehensive Review on the Heavy Metal Toxicity and Sequestration in Plants / R. Riyazuddin, N. Nisha, B. Ejaz [et al.] // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12, N 1. – Art. 43. <https://doi.org/10.3390/biom12010043>
28. Histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel / U. Krämer, J. D. Cotter-Howells, J. M. Charnock [et al.] // *Nature*. – 1996. – Vol. 379, N 6566. – P. 635–638. <https://doi.org/10.1038/379635a0>
29. Constitutively High Expression of the Histidine Biosynthetic Pathway Contributes to Nickel Tolerance in Hyperaccumulator Plants / R. A. Ingle, S. T. Mugford, J. D. Rees [et al.] // *Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17, N 7. – P. 2089–2106. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.030577>
30. Demidchik, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology / V. Demidchik // *Environmental and Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 109. – P. 212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>

31. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth / J. Foreman, V. Demidchik, J. H. F. Bothwell [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 422, N 6930. – P. 442–446. <https://doi.org/10.1038/nature01485>
32. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment / V. Demidchik, D. Straltsova, S. S. Medvedev [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2014. – Vol. 65, N 5. – P. 1259–1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>
33. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK6 regulates drought tolerance under high nitrogen by the phosphorylation of NRT1.1 / Q. Ma, Ch. Zhao, Sh. Hu, K. Zuo // *Journal of Experimental Botany*. – Vol. 74, N 18. – P. 5682–5693. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad277>
34. Evidence of a significant role of glutathione reductase in the sulfur assimilation pathway / A. Cohen, Y. Hacham, Y. Welfe [et al.] // *The Plant Journal*. – 2020. – Vol. 102, N 2. – P. 246–261. <https://doi.org/10.1111/tpj.14621>
35. Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase / J. Lee, A. Das, M. Yamaguchi [et al.] // *The Plant Journal*. – 2003. – Vol. 34, N 4. – P. 417–425. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01736.x>
36. The role of NADPH oxidases in regulating leaf gas exchange and ion homeostasis in *Arabidopsis* plants under cadmium stress / C. Hafsi, A. M. Collado-Arenal, H. Wang [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2022. – Vol. 429. – Art. 128217. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128217>
37. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses / M. Jozefczak, T. Remans, J. Vangronsveld, A. Cuypers // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13, N 3. – P. 3145–3175. <https://doi.org/10.3390/ijms13033145>
38. *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 Plays a Crucial Role in Leaf Responses to Intracellular Hydrogen Peroxide and in Ensuring Appropriate Gene Expression through Both Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Pathways / A. Mhamdi, J. Hager, S. Chaouch [et al.] // *Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 153, N 3. – P. 1144–1160. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153767>
39. Grill, E. Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants / E. Grill, E.-L. Winnacker, M. H. Zenk // *Science*. – 1985. – Vol. 230, N 4726. – P. 674–676. <https://doi.org/10.1126/science.230.4726.674>
40. Chen, J. Characterization of phytochelatin synthase from tomato / J. Chen, J. Zhou, P. B. Goldsbrough // *Physiologia Plantarum*. – 1997. – Vol. 101, N 1. – P. 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01833.x>

References

1. Bergmann W. *Nutritional Disorders of Plants: Development, Visual and Analytical Diagnosis*. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1992. 741 p.
2. Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 2010, vol. 8, no. 3, pp. 199–216. <http://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
3. Barker A. V., Pilbeam D. J. *Handbook of Plant Nutrition*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, 2015. 773 p.
4. Shahzad B., Tanveer M., Rehman A., Cheema S. A., Fahad S., Rehman S., Sharma A. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment – A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, vol. 132, pp. 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.014>
5. Dalir N., Khoshgoftarmanesh A. H. Root uptake and translocation of nickel in wheat as affected by histidine. *Journal of Plant Physiology*, 2015, vol. 184, pp. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.05.017>
6. Matskevich V. S., Demidchik V. V. Mechanism of transmembrane and long-distance transport of nickel in higher plants. *Ekspiermental'naya biologiya i biotekhnologiya* [Experimental Biology and Biotechnology], 2023, no. 2, pp. 4–29 (in Russian).
7. Welch R. M., Graham R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*, 2004, vol. 55, no. 396, pp. 353–364. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh064>
8. Gromadskaya E. I., Tsublenok D. V., Vodeiko M. V., Buko I. Yu., Khomich V. S., Zhivnach S. G., Struk M. I. *State of the natural environment of Belarus: ecological bulletin*. Minsk, RUE “TsNIIKIVR”, 2024. 196 p. (in Russian).
9. Loginov V. F. (ed.). *State of the natural environment of Belarus: ecological bulletin*. 2013. Minsk, Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, 2014. 361 p. (in Russian).
10. Tolkach G. V., Poznyak S. S. Contents of chemical elements in soil in the farms of Brest region. *Ekologicheskii vestnik* [Ecological Bulletin], 2015, no. 3, pp. 79–88 (in Russian).
11. Gromadskaya E. I., Tsublenok D. V., Vodeiko M. V., Khomich V. S., Zhivnach S. G., Struk M. I. *State of the natural environment of Belarus: ecological bulletin*. Minsk, Central research institute for integrated use of water resources, 2023. 151 p. (in Russian).
12. Lemutova M. I. (ed.). *National environmental monitoring system in the Republic of Belarus: observation results, 2021*. Minsk, Belhydromet, 2022. 556 p. (in Russian).
13. Marschner H. *Mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. London, Academic Press, 2012. 684 p.
14. Alfalahi A. O., Abdulqahar F. W. Nanonutrients: Plant Nutritive and Possible Antioxidant Regulators. *Nanobio-technology*, Cham, 2021, ch. 21, pp. 471–498. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73606-4_21
15. Hanikenne M., Nouet C. Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, vol. 14, no. 3, pp. 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.003>
16. Tsadilas C., Rinklebe J., Selim M. (eds.). *Nickel in Soils and Plants*. Boca Raton, CRC Press, 2018. 432 p. <https://doi.org/10.1201/9781315154664>

17. Matskevich V. S., Shiker A. A., Zvonarev S. N., Litskevich K. S., Turovets O. A., Smolich, I. I., Sokolik A. I., Demidchik V. V. Growth inhibition and induction of programmed cell death in the root of *Helianthus annuus* L. triggered by nickel ions and nickel-histidine complexes. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* [Journal of the Belarusian State University. Biology], 2020, no. 1, pp. 11–19 (in Russian).
18. Mackievic V., Li Y., Hryvusevich P., Svistunenko D., Seregin I., Kozhevnikova A., Kartashov A. [et al.]. L-histidine makes Ni^{2+} ‘visible’ for plant signalling systems: Shading the light on Ni^{2+} -induced Ca^{2+} and redox signalling in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2025, vol. 220, art. 109227. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109227>
19. Helaoui S., Boughattas I., Hattab S., Mkhinini M., Alphonse V., Livet A., Bousserhine N., Banni M. Physiological, biochemical and transcriptomic responses of *Medicago sativa* to nickel exposure. *Chemosphere*, 2020, vol. 249, art. 126121. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126121>
20. Agrawal B., Czymmek K. J., Sparks D. L., Bais H. P. Transient Influx of Nickel in Root Mitochondria Modulates Organic Acid and Reactive Oxygen Species Production in Nickel Hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol. 288, no. 10, pp. 7351–7362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.406645>
21. Yemets A., Horiunova I., Blume Y. Cadmium, nickel, copper, and zinc influence on microfilament organization in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biology International*, 2021, vol. 45, no. 1, pp. 211–226. <https://doi.org/10.1002/cbin.11485>
22. Lešková A., Zvarík M., Araya T., Giehl R. F. H. Nickel Toxicity Targets Cell Wall-Related Processes and PIN2-Mediated Auxin Transport to Inhibit Root Elongation and Gravitropic Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 2020, vol. 61, no. 3, pp. 519–535. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz217>
23. Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M. K., Scheible W. R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005, vol. 139, no. 1, pp. 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
24. Vanhoudt N., Vandenhove H., Horemans N., Wannijn J., Van Hees M., Vangronsveld J., Cuypers A. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2010, vol. 101, no. 11, pp. 923–30. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2010.06.008>
25. Boudsocq M., Willmann M. R., McCormack M., Lee H., Shan L., He P., Bush J., Cheng Sh.-H., Sheen J. Differential innate immune signalling via Ca^{2+} sensor protein kinases. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7287, pp. 418–22. <https://doi.org/10.1038/nature08794>
26. Seregin I. V., Kozhevnikova A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 53, no. 2, pp. 257–277. <https://doi.org/10.1134/S1021443706020178>
27. Riyazuddin R., Nisha N., Ejaz B., Khan M. I. R., Kumar M., Ramteke P. W., Gupta R. A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules*, 2021, vol. 12, no. 1, art. 43. <https://doi.org/10.3390/biom12010043>
28. Krämer U., Cotter-Howells J. D., Charnock J. M., Baker A. J. M., Smith J. A. C. Histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 1996, vol. 379, no. 6566, pp. 635–638. <https://doi.org/10.1038/379635a0>
29. Ingle R. A., Mugford S. T., Rees J. D., Campbell M. M., Smith J. A. C. Constitutively High Expression of the Histidine Biosynthetic Pathway Contributes to Nickel Tolerance in Hyperaccumulator Plants. *Plant Cell*, 2005, vol. 17, no. 7, pp. 2089–2106. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.030577>
30. Demidchik, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, vol. 109, pp. 212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
31. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M., Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 2003, vol. 422, no. 6930, pp. 442–446. <https://doi.org/10.1038/nature01485>
32. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S. S., Pozhvanov G. A., Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^{+} -permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 2014, vol. 65, no. 5, pp. 1259–1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>
33. Ma Q., Zhao Ch., Hu Sh., Zuo K. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK6 regulates drought tolerance under high nitrogen by the phosphorylation of NRT1.1. *Journal of Experimental Botany*, 2023, vol. 74, no. 18, pp. 5682–5693. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad277>
34. Cohen A., Hacham Y., Welfe Y., Khatib S., Avise J.-Ch., Amir R. Evidence of a significant role of glutathione reductase in the sulfur assimilation pathway. *The Plant Journal*, 2020, vol. 102, no. 2, pp. 246–261. <https://doi.org/10.1111/tbj.14621>
35. Lee J., Das A., Yamaguchi M., Hashimoto J., Tsutsumi N., Uchimiya H., Umeda M. Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *The Plant Journal*, 2003, vol. 34, no. 4, pp. 417–425. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01736.x>
36. Hafsi C., Collado-Arenal A. M., Wang H., Sanz-Fernández M., Sahrawy M., Shabala S., Romero-Puertas M. C., Sandalio L. M. The role of NADPH oxidases in regulating leaf gas exchange and ion homeostasis in *Arabidopsis* plants under cadmium stress. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, vol. 429, art. 128217. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128217>
37. Jozefczak M., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, vol. 13, no. 3, pp. 3145–3175. <https://doi.org/10.3390/ijms13033145>

38. Mhamdi A., Hager J., Chaouch S., Queval G., Han Y., Taconnat L., Saindrenan P., Gouia H., Issakidis-Bourguet E., Renou J. P., Noctor G. *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 Plays a Crucial Role in Leaf Responses to Intracellular Hydrogen Peroxide and in Ensuring Appropriate Gene Expression through Both Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Pathways. *Plant Physiology*, 2010, vol. 153, no. 3, pp. 1144–1160. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153767>
39. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 1985, vol. 230, no. 4726, pp. 674–676. <https://doi.org/10.1126/science.230.4726.674>
40. Chen J., Zhou J., Goldsbrough P. B. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiologia Plantarum*, 1997, vol. 101, no. 1, pp. 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01833.x>

Інфармацыя аб аўтарах

Мацкевіч Вера Сяргееўна – старшы прэпадаватэль, навуц. супрацоўнік. Беларускі дзяржаўны ўніверсітэт (пр. Незалежнасці, 4, 220030, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: mackievic@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0002-5116-0157>

Демідчык Вадім Віктаравіч – член-карэспандэнт, д-р біол. навук, прафесар, гл. навуц. супрацоўнік. Інстытут эксперыментальнай ботанікі ім. В. Ф. Купрэвіча НАН Беларусі (ул. Акадэміцкая, 27, 220072, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: demidchik@botany.by. <https://orcid.org/0000-0003-3765-8386>

Information about the authors

Viera S. Mackievic – Senior Lecturer, Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mackievic@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0002-5116-0157>

Vadim V. Demidchik – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: demidchik@botany.by. <https://orcid.org/0000-0003-3765-8386>

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 575.224.46:631.531:582.475.2:635.925

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-316-320>

Поступила в редакцию 05.05.2025

Received 05.05.2025

В. И. Торчик, М. О. Слесаренко

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

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ФИЗИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН И РАЗВИТИЕ ТРЕХЛЕТНИХ САЖЕНЦЕВ ЛИСТВЕННИЦЫ ШИРОКОЧЕШУЙЧАТОЙ (*LARIX* × *EUROLEPIS* HENRY.)

Аннотация. В статье приводятся сведения о влиянии факторов физической природы (плазма диэлектрического барьерного разряда атмосферного давления (ДБР), плазма высокочастотного разряда низкого давления (ВЧ), высокочастотное электромагнитное поле (ВЧ ЭМП) и помещения семян в условия вакуума) на всхожесть семян и морфометрические параметры 3-летних саженцев *Larix* × *eurolepis* Henry.

Установлено, что некоторые факторы физической природы оказывают стимулирующее влияние на прорастание семян лиственницы широкочешуйчатой, которое зависит от используемого фактора и продолжительности его воздействия.

Влияние физических факторов на семена сказалось на росте и дальнейшем развитии саженцев. Наибольшее воздействие на прирост, диаметр кроны, длину хвои и высоту растений оказала обработка семян плазмой ДБР атмосферного давления в течение 3 мин, которая снизила соответствующие показатели более чем в 4 раза. Такая обработка может использоваться в селекционных целях для получения карликовых растений.

У саженцев также наблюдалось достаточно широкое варьирование окраски хвои, которое особенно проявилось при нахождении семян в вакуумной среде в течение 15 мин. При этом наряду с типичной светло-зеленой хвоей отмечены саженцы с различным сочетанием в окраске хвои зеленого, белого, серого и голубого цветов.

Ключевые слова: предпосевная обработка, *Larix* × *eurolepis*, плазма, всхожесть, морфометрические параметры, окраска хвои

Для цитирования: Торчик, В. И. // Влияние факторов физической природы на всхожесть семян и развитие трехлетних саженцев лиственницы широкочешуйчатой (*Larix* × *eurolepis* Henry.) / В. И. Торчик, М. О. Слесаренко // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 316–320. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-316-320>

Vladimir I. Torchik, Maryia O. Slesarenka

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

THE INFLUENCE OF PHYSICAL FACTORS ON THE GERMINATION OF SEEDS AND THE DEVELOPMENT OF THREE-YEAR-OLD SEEDLINGS OF BROAD-SCALED LARCH (*LARIX* × *EUROLEPIS* HENRY.)

Abstract. This article presents information on the influence of pre-sowing treatment of *Larix* × *eurolepis* Henry. seeds by physical factors, such as atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma (DBD), low-pressure high-frequency discharge plasma (HF), high-frequency electromagnetic field (HF EMF), and placing seeds in a vacuum environment on seed germination and the morphometric parameters of 3-year-old seedlings.

A stimulatory effect on the germination of *Larix* × *eurolepis* seeds was observed, which depends on the specific treatment factor and the duration of exposure.

Treating the seeds with physical factors affected the growth and development of seedlings. Treating the seeds with atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma (DBD) for three minutes was observed to have the most significant impact on growth, crown diameter, needle length, and plant height, which reduced those parameters by more than fourfold. This seed treatment can be utilized for breeding purposes to obtain dwarf plants.

It was found that there is considerable variation in needle color among seedlings, particularly evident when seeds are placed in a vacuum environment for 15 minutes. In addition to typical light green needles, seedlings with various combinations of green, white, gray, and blue colors in their needle coloration were observed.

Keywords: pre-sowing treatment, *Larix* × *eurolepis*, plasma, germination, morphometric parameters, color of needles

For citation: Torchik V. I., Slesarenka M. O. The influence of physical factors on the germination of seeds and the development of three-year-old seedlings of broad-scaled larch (*Larix* × *eurolepis* Henry.). *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 316–320 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-316-320>

Введение. Развитие зеленого строительства в современных условиях в значительной степени определяется наличием в садово-парковых композициях оригинальных декоративных растений, которые придают своеобразие рельефу местности и органично вписываются в архитектуру городской или сельской застройки. По этой причине во многих странах мира, в том числе и в Беларуси, наряду с интродукционными исследованиями проводятся работы, связанные с поиском путей обновления ассортимента для целей зеленого строительства.

В последнее время для расширения формового разнообразия декоративных растений используется воздействие на них или их семена некоторых факторов физической природы, что, по мнению ряда исследователей, влияет не только на всхожесть, но и стимулирует или снижает энергию роста, а также может вызывать более глубокие изменения морфологических признаков растений. Так, изучено влияние электромагнитного поля (ЭМП) на такие сельскохозяйственные культуры, как пшеница, люпин узколистный, гречиха посевная и т. д. [1–4]. Установлено, что воздействие на семена сосны обыкновенной и ели европейской низкочастотного ЭМП положительно влияет не только на их лабораторную и грунтовую всхожесть, но и на рост корней и годичный прирост сеянцев [5, 6].

Larix × *eurolepis* Henry. – это гибрид между *L. decidua* и *L. kaempferi*, который был получен в 1904 г. Однолетние побеги своим желтоватым цветом напоминают побеги *L. decidua*, но имеют небольшое опушение, как побеги *L. kaempferi*; семенные чешуи молодых шишек отогнуты, что является отличительной чертой японского вида. Взрослые шишки похожи на шишки лиственницы европейской, имея конусовидную форму [7].

У *L.* × *eurolepis* получено несколько декоративных форм, однако они еще не приобрели широкого распространения. Ниже приводится их краткая характеристика по [8]:

'*Ardenne Weeping*' – дерево с сильно свисающими ветвями, сочетающее в себе признаки обоих родительских растений. Размножается прививкой. На штамбе растение имеет плакучую форму кроны. В культуре известна с 1992 г.;

'*Domino*' – крепкое небольшое растение с раскидистой формой кроны и молодой хвоей светло-зеленого цвета, которая к концу лета становится сине-зеленой;

'*Gail*' – невысокий многовершинный карликовый кустарник с округлой кроной, ветки и побеги которого образуют веер. В возрасте 10 лет высота и диаметр растения составляют 30 см. Хвоя светло-зеленая. Получен в 1989 г. из семян *L. decidua* 'Corley' при опылении *L. kaempferi*;

'*Julie*' – кустистая карликовая форма *L. eurolepis* с годичным приростом до 1,5 см. Получена в 1989 г., как и форма 'Gail', однако скорость роста вдвое меньше;

'*Morris Broom*' – шаровидный карликовый куст с серо-зеленой хвоей. В возрасте 10 лет высота и диаметр составляют 60 см. В культуре известен с 2000 г.;

'*Umhausen*' – медленно растущий карликовый кустарник с шаровидной слегка приплюснутой формой кроны. В возрасте 10 лет высота и диаметр составляют 1 м. Хвоя короткая, ярко-зеленая. Известен в США с 1999 г.;

'*Varied Directions*' – дерево с нормальной силой роста и нерегулярной системой ветвления. Нуждается в подвязке. Хвоя очень длинная, светло-зеленая. В возрасте 10 лет высота и диаметр растения составляют 3 м. Получена в 1985 г.

Учитывая, что *L. eurolepis* является гибридом, некоторые признаки которого находятся в рецессивном состоянии, представляло интерес изучение влияния ряда физических факторов на всхожесть семян, рост, устойчивость и декоративные качества семенного потомства вида.

Методика и объекты исследования. Объектами исследования служили семена и 3-летние саженцы лиственницы широкочешуйчатой. Семена были собраны в дендрарии Центрального ботанического сада НАН Беларуси в первой декаде сентября 2021 г. Для каждого вида обработки использовали по 100 семян в 3 повторностях. В марте 2022 г. на семена воздействовали плазмой высокочастотного разряда низкого давления (ВЧ; 7 мин), высокочастотным ЭМП (ВЧ ЭМП; 20 мин), плазмой ДБР атмосферного давления (3 и 7 мин) и помещали в вакуумную среду (вакуум; 15 мин). Через 10–14 дней после обработки семена высевались в открытый грунт одновременно с семенами контрольной группы, не прошедшими стратификацию. Посев линейный, расстояние

между рядами – 5 см. Фиксировали всхожесть каждой группы семян. Годичные сеянцы пересаживались в отдельные контейнеры для дальнейшего выращивания.

Осенью 2024 г. у 3-летних саженцев измеряли высоту, годичный прирост побегов, диаметр кроны и длину хвои, а также проводили оценку их декоративности.

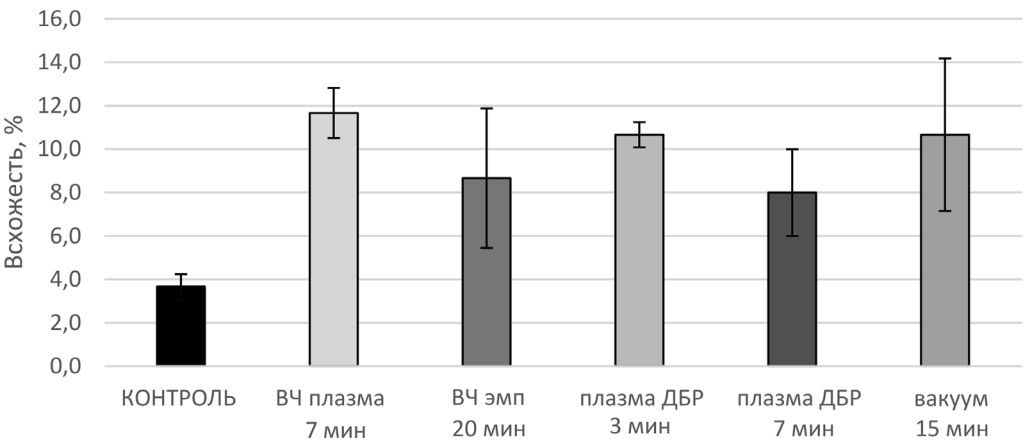
Анализ полученных данных выполняли с помощью таких методов математической статистики, как описательная статистика, тест Шапиро – Уилка для проверки на соответствие распределения показателей нормальному закону [9, 10]. Для установления значимости различий между несколькими независимыми выборками использовали дисперсионный анализ и анализ Краскела – Уоллиса в программе Statistica 10.

Результаты и их обсуждение. Всхожесть семян *L. eurolepis* в зависимости от воздействия факторов физической природы в процессе предпосевной обработки представлена на рисунке.

Анализ данных на рисунке показывает, что все факторы физической природы оказали положительное влияние на всхожесть семян *Larix × eurolepis*. При этом наиболее эффективными оказались ВЧ плазма, вакуум и плазма ДБР, при воздействии которых всхожесть семян была выше на 216,2 и 189,2 % соответственно, чем в контрольном варианте.

Оценка морфометрических параметров (высота, годичный прирост побегов, диаметр кроны и длина хвои) саженцев представлены в таблице.

Установлено, что воздействие ДБР на протяжении 3 мин на семена *Larix × eurolepis* – единственный фактор физической природы, который оказал значительное влияние сразу на все морфометрические показатели саженцев. Так, высота уменьшилась на 75,7 %, диаметр кроны – на 77,8 %, годичный прирост – на 72,5 % и длина хвои – на 20 %.



Влияние факторов физической природы на всхожесть семян *Larix × eurolepis* Henry.

The influence of physical factors on the germination of *Larix × eurolepis* Henry. seeds

Морфометрические параметры саженцев *Larix × eurolepis* Henry., выращенных из семян, находившихся перед посадкой под влиянием физических факторов

The influence of seed treatment by physical factors on the morphometric parameters of *Larix × eurolepis* Henry. sapling

Фактор воздействия на семена	Высота, см	Годичный прирост, см	Диаметр кроны, см	Длина хвои, см
Контроль	41,9 ± 11,6	5,1 ± 0,6	31,1 ± 5,5	2,0 ± 0,1
ВЧ, 7 мин	19,8 ± 2,1 ^{ns}	2,6 ± 0,2 ^{***}	14,5 ± 1,9 ^{**}	1,8 ± 0,1 ^{ns}
ВЧ ЭМП, 20 мин	16,3 ± 2,4 ^{ns}	2,1 ± 0,2 ^{***}	12,0 ± 1,4 ^{**}	1,7 ± 0,1 ^{**}
ДБР, 3 мин	10,2 ± 0,7 ^{**}	1,4 ± 0,1 ^{***}	6,9 ± 0,4 ^{***}	1,6 ± 0,1 ^{***}
ДБР, 7 мин	38,7 ± 3,4 ^{ns}	5,0 ± 0,3 ^{ns}	26,6 ± 2,3 ^{ns}	1,9 ± 0,1 ^{ns}
Вакуум, 15 мин	45,7 ± 3,7 ^{ns}	4,8 ± 0,2 ^{ns}	35,6 ± 2,2 ^{ns}	1,9 ± 0,1 ^{ns}

Примечание. ^{ns} – $p > 0,05$; ^{**} – $p \leq 0,01$; ^{***} – $p \leq 0,001$.

Снижение почти всех морфометрических показателей у саженцев отмечено и после обработки семян ВЧ ЭМП (20 мин). Например, диаметр кроны уменьшился на 61,7 %, годичный прирост – на 58,8 % и длина хвои – на 15 %.

Предпосевная обработка семян плазмой ВЧ (7 мин) отрицательно повлияла на годичный прирост и диаметр кроны.

Наблюдения за саженцами показали, что все они отличались достаточной зимостойкостью и устойчивостью к факторам окружающей среды. Повреждений вредителями и поражений болезнями не выявлено.

Было установлено, что воздействие на семена факторов физической природы ведет к изменению окраски хвои у некоторой части саженцев. Так, если у 67 % саженцев без обработки семян окраска хвои светло-зеленого цвета и у 33 % зелено-мятного, то после обработки семян ВЧ в течение 7 мин 44 % саженцев имели светло-зеленый цвет хвои, что на 23 % меньше по сравнению с растениями без обработки семян. Хвоя у многих растений приобретала мятный цвет, хотя он не являлся основным. У единичных саженцев хвоя была с розовеющими кончиками, а молодые побеги – сизо-зеленого и голубого цвета.

После воздействия на семена ВЧ ЭМП на протяжении 20 мин количество растений со светло-зеленым цветом хвои сократилось на 20,9 %. У 53 % растений в качестве дополнительного признака обладал мятный цвет хвои.

У саженцев лиственницы ширококочешуйчатой после обработки семян ДБР в течение 3 мин окраска хвои варьировала от светло-зеленого и зеленого цвета до серо-мятного и мятно-зелено-голубого. У 40 % растений встречался серый цвет. После воздействия на семена ДБР на протяжении 7 мин доля саженцев со светло-зеленой окраской хвои уменьшилась на 25,4 % по сравнению с контрольным вариантом.

В то же время после нахождения семян в вакуумной среде в течение 15 мин доля растений со светло-зеленой хвоей снизилась на 47,8 %. При этом среди саженцев встречались растения с различным сочетанием в окраске хвои зеленого, белого, серого и голубого цветов.

Заключение. Выявлено, что некоторые факторы физической природы оказывают стимулирующее влияние на прорастание семян лиственницы ширококочешуйчатой, которое зависит от используемого фактора и продолжительности его воздействия.

Воздействие физических факторов на семена сказалось на росте и дальнейшем развитии саженцев. Наибольшее влияние на прирост, диаметр кроны, длину хвои и высоту растений оказала обработка семян плазмой ДБР атмосферного давления в течение 3 мин, которая снизила эти показатели более чем в 4 раза. Такая обработка может использоваться в селекционных целях для получения карликовых растений.

У саженцев также наблюдалось достаточно широкое варьирование окраски хвои, которое особенно проявилось при нахождении семян в вакуумной среде в течение 15 мин. При этом наряду с типичной светло-зеленой хвоей отмечены саженцы с различным сочетанием в окраске хвои зеленого, белого, серого и голубого цветов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Березина, Н. М. Предпосевное облучение семян сельскохозяйственных растений / Н. М. Березина, Д. А. Каушанский. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Атомиздат., 1975. – 264 с.
2. Кораблев, Р. А. Влияние физических факторов на свойства семян и рост сеянцев сосны обыкновенной и березы повислой: дис. канд. ... с.-х. наук: 06.03.01 / Кораблев Руслан Александрович. – Воронеж, 2003. – 204 л.
3. Ксенз, Н. В. Анализ электрических и магнитных воздействий на семена / Н. В. Ксенз, С. В. Качишвили // Механизация и электрификация сельского хозяйства. – 2000. – № 5. – С. 30.
4. Смирнов, А. И., Предпосевная обработка семян сосны обыкновенной и сосны Банкса низкочастотным электромагнитным полем и удобрением «Экстрасол» / А. И. Смирнова, Ф. С. Орлов, С. Б. Васильев // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. – 2015. – Т. 19, № 2. – С. 65–68.
5. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на структуру покровов семян / Ж. Э. Мазец, С. Н. Шиш, А. Г. Шутова [и др.] // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: сб. ст. Междунар. науч. конф., Минск, 18–20 авг. 2014 г. / Центр. ботан. сад НАН Беларуси; отв. ред.: В. Н. Решетников, В. В. Титок. – Мн., 2014. – С. 159–162.

6. Смирнов, А. И. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на прорастание семян и рост сеянцев сосны обыкновенной и ели европейской / А. И. Смирнов, Ф. С. Орлов, И. И. Дроздов // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. – 2015. – № 3. – С. 53–58.

7. Plant Index // Trees and Shrubs Online. – URL: <https://www.treesandshrubsonline.org/articles/arix/larix-x-eurolepis/>. – (date of access: 17.02.2025).

8. Auders, A. G. Encyclopedia of Conifers: in 2 vol. / A. G. Auders, D. P. Spicer. – Woking, United Kingdom: Royal Horticultural Society, 2012. – Vol. 1–2. – 1500 p.

9. Малета, Ю. С. Непараметрические методы статистического анализа в биологии и медицине / Ю. С. Малета, В. В. Тарасов. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 178 с.

10. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика: учеб. пособие / П. Ф. Рокицкий. – Изд. 3-е, испр. – Мн.: Выш. шк., 1973. – 318 с.

References

1. Berezina N. M., Kaushanskii D. A. *Pre-sowing irradiation of seeds of agricultural plants*. 2nd ed. Moscow, Atomizdat Publ., 1975. 264 p. (in Russian).

2. Korablev R. A. *Influence of physical factors on the properties of seeds and growth of seedlings of Scots pine and silver birch*. Ph. D. Thesis. Voronezh, 2003. 204 p. (in Russian).

3. Ksenz N. V., Kacheishvili S. V. Analysis of electrical and magnetic effects on seeds. *Mekhanizatsiya i elektrifikatsiya sel'skogo khozyaistva* [Mechanization and electrification of agriculture], 2008, no. 5, p. 30 (in Russian).

4. Smirnov A. I., Orlov F. S., Vasil'ev S. B. Pre-sowing treatment of Scots pine and Banks pine seeds with a low-frequency electromagnetic field and the fertilizer "Extrasol". *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo universiteta lesa – Lesnoi vestnik* [Bulletin of the Moscow State Forest University – Forest Bulletin], 2015, vol. 19, no. 2, pp. 65–68 (in Russian).

5. Mazets Zh. E., Shish S. N., Shutova A. G., Susha O. A., Elovskaya N. A., Petrov V. N., Kaizinovich K. Ya., Gritskovich E. R., Pushkina N. V. Effect of low-intensity electromagnetic radiation on the structure of seed covers. *Biotehnologicheskie priemy v sokhranении bioraznoobraziya i selektsii rastenii: sbornik statei Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, Minsk, 18–20 avgusta 2014 goda* [Biotechnological methods in biodiversity conservation and plant breeding: collection of articles from the International Scientific Conference, Minsk, August 18–20, 2014]. Minsk, 2014, pp. 159–162 (in Russian).

6. Smirnov A. I., Orlov F. S., Drozdov I. I. Influence of low-frequency electromagnetic field on seed germination and growth of Scots pine and European spruce seedlings. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Lesnoi zhurnal* [News of higher educational institutions. Forestry magazine], 2015, no. 3, pp. 53–58 (in Russian).

7. Plant Index. *Trees and Shrubs Online*. Available at: <https://www.treesandshrubsonline.org/articles/arix/larix-x-eurolepis/> (accessed 17.02.2025).

8. Auders, A. G., Spicer D. P. *Encyclopedia of Conifers*. Vol 1–2. United Kingdom, Royal Horticultural Society, 2012. 1500 p.

9. Maleta Yu. S., Tarasov V. V. *Nonparametric methods of statistical analysis in biology and medicine*. Moscow, Publishing house of Moscow State University, 1982. 178 p. (in Russian).

10. Rokitskii P. F. *Biological statistics*. 3rd ed. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 318 p. (in Russian).

Информация об авторах

Торчик Владимир Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dendro@tut.by

Слесаренко Мария Олеговна – аспирант. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Masha3535@tut.by

Information about the authors

Vladimir I. Torchik – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), 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: dendro@tut.by

Mariya O. Slesarenka – Graduate Student. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Masha3535@tut.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.66:577.113.3:577.15

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-321-330>

Поступила в редакцию 28.05.2025

Received 28.05.2025

Л. Л. Биричевская, А. В. Дайнеко, А. С. Щеколова, А. И. Зинченко

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ОДНОРЕАКТОРНЫЙ ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ 6-ТНО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА

Аннотация. Разработан усовершенствованный биотехнологический способ получения 6-тио-2'-дезоксигуанозина – модифицированного нуклеозида, проявляющего уникально широкий спектр противоопухолевой активности. Препаративный однореакторный способ включает инкубирование при температуре 45 °С 6-тиогуанина и 2'-дезокситимидина в фосфатном буфере в присутствии рекомбинантных тимидинфосфорилазы и пуриннуклеозидфосфорилазы *Escherichia coli* и отличается от известного способа-аналога тем, что 2'-дезокситимидин и 6-тиогуанин вносят в реакционную смесь в количествах, намного превышающих их водорастворимость. Использование предлагаемого способа получения 6-тио-2'-дезоксигуанозина обеспечивает по сравнению с известным способом-прототипом увеличение выхода целевого продукта в расчете на исходный 2'-дезокситимидин с 14,6 до 33,5 % и повышение волюметрического выхода целевого продукта с 4,13 до 75,8 г/л реакционной смеси. Это существенно повышает эффективность использования единицы объема биореактора. Предлагаемый метод высокотехнологичен и может быть успешно применен в условиях производства.

Ключевые слова: 6-тио-2'-дезоксигуанозин, рекомбинантная тимидинфосфорилаза, рекомбинантная пуриннуклеозидфосфорилаза, биокатализ, 6-тиогуанин, 2'-дезокситимидин

Для цитирования: Ферментативный однореакторный препаративный синтез 6-тио-2'-дезоксигуанозина / Л. Л. Биричевская, А. В. Дайнеко, А. С. Щеколова, А. И. Зинченко // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 321–330. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-321-330>

Larysa L. Birycheuskaya, Hanna V. Daineka, Nastassia S. Shchokalava, Anatoli I. Zinchenko

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

ONE-POT ENZYMATIC PREPARATIVE SYNTHESIS OF 6-THIO-2'-DEOXYGUANOSINE

Abstract. An improved biotechnological method for producing 6-thio-2'-deoxyguanosine, a modified nucleoside exhibiting a uniquely broad spectrum of antitumor activity, has been developed. The one-pot preparative method involves incubation of 6-thioguanine and 2'-deoxythymidine at 45 °C in phosphate buffer in the presence of recombinant *Escherichia coli* thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase. This method is distinct from the known analogue method in that 2'-deoxythymidine and 6-thioguanine are added to the reaction mixture in amounts that far exceed their water solubility. Utilizing the disclosed method of producing 6-thio-2'-deoxyguanosine increases yield of the end product based on the starting 2'-deoxythymidine from 14.6 to 33.5 % compared to the known prototype method and raises volumetric yield of the end product from 4.13 to 75.8 g/l of the reaction mixture. This significantly improves the efficiency of using a unit volume of the bioreactor. The proposed technology is high-tech and can be successfully applied under largescale production conditions.

Keywords: 6-thio-2'-deoxyguanosine, recombinant thymidine phosphorylase, recombinant purine nucleoside phosphorylase, biocatalysis, 6-thioguanine, 2'-deoxythymidine

For citation: Birycheuskaya L. L., Daineka H. V., Shchokalava N. S., Zinchenko A. I. One-pot enzymatic preparative synthesis of 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceeding of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 321–330 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-321-330>

Введение. Модифицированные аналоги нуклеозидов представляют собой группу синтетических молекул, которые имитируют природные нуклеозиды и широко используются в качестве противоопухолевых средств и для лечения некоторых вирусных инфекций с конца 1960-х гг. [1–3]. В последнее время эти соединения также привлекают повышенное внимание из-за их потенциального использования для борьбы с устойчивостью бактерий к антибиотикам [4].

В настоящее время биокаталитический синтез модифицированных нуклеозидов приобретает все большую популярность по сравнению с традиционными многостадийными и более экологически вредными химическими методами [5–7].

Синтез, катализируемый ферментами в составе целых клеток или в виде очищенных белков, имеет ряд преимуществ, таких как возможность проведения реакции в одном сосуде, контролируемая стерео-, регио- и энантиоспецифичность, а также мягкие условия реакции. В связи с этим наиболее часто используемым путем синтеза модифицированных нуклеозидов является реакция трансгликозилирования, катализируемая нуклеозидфосфорилазами или 2'-дезоксирибозилтрансферазами [8, 9].

Модифицированный нуклеозид 6-тио-2'-дезоксигуанозин (6ТДГ) обладает уникально широким спектром противоопухолевой активности, и на его основе как субстанции разрабатываются многообещающие таргетные препараты с двойным эффектом, выражающимся, с одной стороны, в избирательном уничтожении раковых клеток, а с другой – в активации хозяйского противоопухолевого иммунитета [10–12].

Химические методы синтеза 6ТДГ не являются экологически чистыми и характеризуются многостадийностью и низкими выходами [13–15].

Следует отметить, что впервые возможность ферментативного синтеза 6ТДГ (из дезоксирибозо-1-фосфата и 6-тиогуанина (6ТГ) с помощью пуриನ್ನуклеозидфосфорилазы (ПНФазы) животного происхождения) была продемонстрирована в 1964 г. [16].

Ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована возможность получения 6ТДГ [17] из 2'-дезокситимидина (dThd) и 6ТГ при последовательном действии двух ферментов – тимидинфосфорилазы (ТФазы) и ПНФазы, изолированных из клеток двух рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* (рис. 1).

На первой стадии процесса ТФаза с участием неорганических фосфат-ионов (P_i) расщепляет dThd на тимин (Thy) и 2-дезоксирибозо-1-фосфат (промежуточный продукт). На второй стадии ПНФаза из 2-дезоксирибозо-1-фосфата и 6ТГ синтезирует 6ТДГ с высвобождением P_i .

Важно отметить, что исходные реагенты (нуклеозид и азотистое основание) в описанном варианте синтеза [17] берутся в низких (соответственно 0,1 и 0,02 моль/л) концентрациях. Процесс ведут при температуре 45 °С в 0,01 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0) в течение 50 мин. Степень молярной конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси близка к количественной (99–100 %). После выделения целевого продукта из реакционной смеси путем упаривания ее до суха и многократной экстракции побочных продуктов реакции этанолом получили 0,43 г 6ТДГ с выходом 73 % на затраченный 6ТГ. При этом так называемый волюметрический выход 6ТДГ (выражается в количестве целевого продукта, получаемого с единицы объема реакционной смеси [18]) составляет всего 4,13 г/л.

Переход биотехнологической научной разработки, выполняемой, как правило, вначале в аналитическом варианте (предполагает использование минимального количества реагентов и катализаторов), на промышленный уровень требует повышенного количества ферментов и соответствующего препаративного оборудования. Проблема доступности ферментов-биокатализаторов

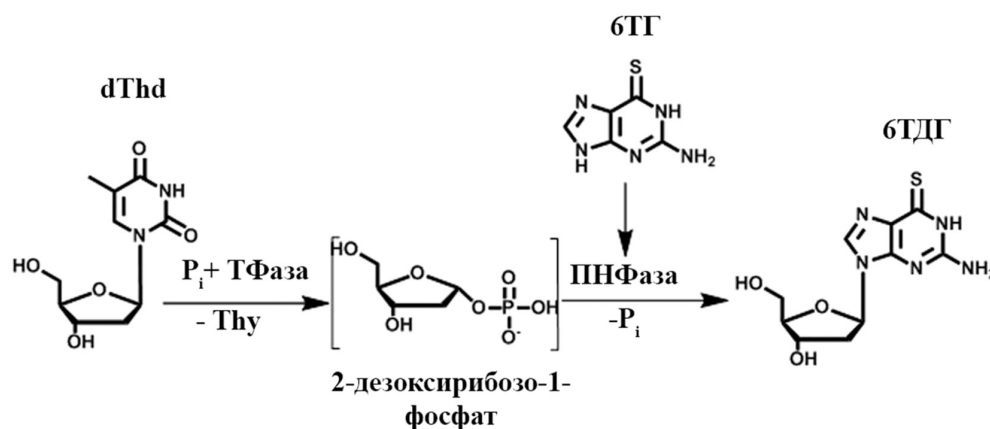


Рис. 1. Схема синтеза 6ТДГ с использованием рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз

Fig. 1. Scheme of 6TDG synthesis using recombinant nucleoside phosphorylases

была решена нами путем создания генно-инженерных штаммов *E. coli* – продуцентов ТФазы и ПНФазы, которые депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами БИМ В-2074 Д и БИМ В-452 Д соответственно.

При создании промышленных технологий получения химических и фармакологических субстанций (в отличие от аналитических способов синтеза) на первый план выступает не только количественное значение конечного выхода целевого продукта, но и экономическая составляющая, во многом зависящая от эффективности использования исходных реагентов и оборудования. В этой связи недостатками описанного нами ранее аналитического способа при его применении для получения десятков и сотен граммов 6ТДГ являются, с одной стороны, невысокий волюметрический выход 6ТДГ, что обуславливает низкую эффективность использования единицы объема биореактора; с другой – невысокий выход 6ТДГ в расчете на затраченный dThd (14,6 %), что приводит к высокому расходу этого нуклеозида, составляющему 5,81 г на получение 1 г целевого продукта.

Указанные недостатки ограничивают возможность применения рассматриваемого способа в условиях промышленного производства. Настоящее исследование посвящено изучению возможности повышения волюметрического выхода реакции синтеза 6ТДГ, что будет способствовать решению проблемы уменьшения объема биореактора, используемого для биокаталитического синтеза этого нуклеозида.

Материалы и методы исследования. В работе использовали рекомбинантную ПНФазу штамма *E. coli* БИМ В-452 Д и рекомбинантную ТФазу штамма *E. coli* БИМ В-2074 Д.

Реакционная смесь объемом 400 мл состояла из следующих компонентов: 0,8 М dThd, 0,4 М 6ТГ, 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0), 180 ед/мл ТФазы и 20 ед/мл ПНФазы. Реакционную смесь инкубировали 6 ч при температуре 45 °С с перемешиванием.

Пробы отбирали каждые 30 мин, прогревали 2 мин при 100 °С, разбавляли в 400 раз дистиллированной водой высокой степени очистки (H_2O_{mq}) и фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм. Накопление продуктов реакции оценивали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Silufol-UV254 (Merk, Германия) в системе растворителей изопропанол–хлороформ–35%-й водный аммиак (10 : 10 : 1; об.), а также с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) на колонке Luna C18(2) размером 4,6 × 150 мм с диаметром частиц сорбента 5 мкм (Phenomenex, США) с использованием хроматографической системы Wooking K2025 (Nanon, КНР). Регистрацию пиков осуществляли при длине волны 260 нм. Площади пиков рассчитывали с использованием программного обеспечения Wookinglab (Nanon).

Для оценки чистоты полученной химической субстанции 6ТДГ взвешивали точную навеску 28,3 мг, разводили в 100 мл H_2O_{mq} с добавлением диметилсульфоксида (Carl Roth, Германия) и анализировали методом ВЭЖХ. Присутствие примесей в образце определяли по наличию дополнительных пиков на хроматограмме, время выхода которых отличается от времени выхода стандартного образца 6ТДГ.

Структуру полученного соединения подтверждали с помощью УФ-, 1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре РВ-2201А (Solar, Республика Беларусь). Спектр ЯМР записывали на спектрометре Avance-500-DRX (Bruker, Германия). Масс-спектрометрический анализ осуществляли на масс-спектрометре Agilent 1200 LC/MC (Agilent Technologies, США).

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой достоверный интервал среднего арифметического для 95%-го уровня вероятности.

Результаты и их обсуждение. Главным недостатком предложенного нами ранее ферментативного способа получения 6ТДГ является его сравнительно невысокий волюметрический выход, составляющий всего 4,13 г/л реакционной смеси. По нашему мнению, указанное обстоятельство обусловлено тем, что процесс ведется в условиях, когда исходные субстраты (dThd и 6ТГ) присутствуют в реакционной смеси только в растворенном состоянии в низкой концентрации.

В данной работе нами был осуществлен подбор оптимального содержания исходных субстратов (6ТГ и dThd) в реакционной смеси и их соотношения, в качестве отправной точки был

взят вариант, описанный в способе-прототипе. При этом в серии экспериментов при одновременном увеличении количества обоих субстратов параллельно изменяли их молярное соотношение от 1 : 5 (вариант прототипа) до 1 : 1.

В результате была определена максимально возможная загрузка реагентов, позволяющая поддерживать консистенцию реакционной смеси в необходимом полужидком состоянии, обеспечивающем техническую возможность проведения требуемого ферментативного процесса. При этом максимально возможное количество вносимого 6ТГ (как гораздо менее растворимого компонента) составило 0,4 моль/л. Результаты этого эксперимента приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Зависимость степени конверсии 6ТГ в 6ТДГ от молярного соотношения исходных субстратов

Table 1. Dependence of the degree of 6TG conversion into 6TDG on the molar ratio of the starting substrates

Молярное соотношение 6ТГ и dThd	Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси, %	Относительная эффективность, %
1 : 1	72 ± 4	73,5
1 : 1,5	87 ± 5	88,8
1 : 2	98 ± 3	100
1 : 3	98 ± 2	100
1 : 4	Технически затруднено	—

Как следует из данных табл. 1, максимальный выход целевого продукта достигается при двукратном молярном избытке dThd по отношению к количеству 6ТГ. Использование трехкратного избытка dThd является нецелесообразным.

Далее была экспериментально подобрана концентрация используемого в реакции калий-фосфатного буфера. Следует отметить, что в данном случае буфер обеспечивает не только поддержание необходимой pH реакционной среды, но и является источником фосфат-ионов, непосредственно участвующих в биохимической реакции. При этом влияние описываемого параметра на эффективность процесса неоднозначно. С одной стороны, повышение концентрации ионов фосфата благоприятствует фосфорилизу dThd, приводящему к образованию промежуточного продукта (дезоксирибозо-1-фосфата), необходимого для синтеза 6ТДГ. С другой стороны, фосфат-ионы могут способствовать фосфоролитическому разложению самого образующегося целевого продукта.

Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ (без выделения целевого продукта) в реакционной смеси, содержащей калий-фосфатный буфер с различной концентрацией, представлена в табл. 2. Из приведенных данных следует, что оптимальная концентрация вносимого в реакционную смесь калий-фосфатного буфера находится в пределах 0,02–0,05 М. Следует отметить, что применение его концентраций, превышающих 0,05 М, – нерационально.

Т а б л и ц а 2. Зависимость степени конверсии 6ТГ в 6ТДГ от концентрации калий-фосфатного буфера в реакционной смеси

Table 2. Dependence of the degree of 6TG conversion in 6TDG on the concentration of potassium phosphate buffer in the reaction mixture

Концентрация калий-фосфатного буфера в реакционной смеси, мМ	Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси, %	Относительная эффективность, %
0,0	0,0	0,0
0,27	72,0	72,1
5,0	96,2	96,3
10,0	97,6	98,6
20,0	99,5	99,6
50,0	99,9	100

Окончание табл. 2

Концентрация калий-фосфатного буфера в реакционной смеси, мМ	Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси, %	Относительная эффективность, %
100,0	98,4	98,5
150,0	97,6	97,7
200,0	96,9	97,0
300,0	95,8	95,9

В подобранных условиях реакции нами был осуществлен катализируемый ферментами ТФазой и ПНФазой однореакторный синтез 6ТДГ в реакционной смеси объемом 400 мл. Динамика накопления целевого продукта реакции представлена на рис. 2.

Следует отметить, что в повторных препаративных синтезах максимальная степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ, достигающая 98–99 мол. %, наблюдалась в интервале 4–6 ч от начала реакции.

Изменение состава компонентов реакционной смеси отслеживали методами ТСХ и ВЭЖХ. ВЭЖХ-хроматограмма, представленная на рис. 3, отражает содержание основных субстратов и продуктов реакции в реакционной смеси в конечной точке (спустя 6 ч инкубирования).

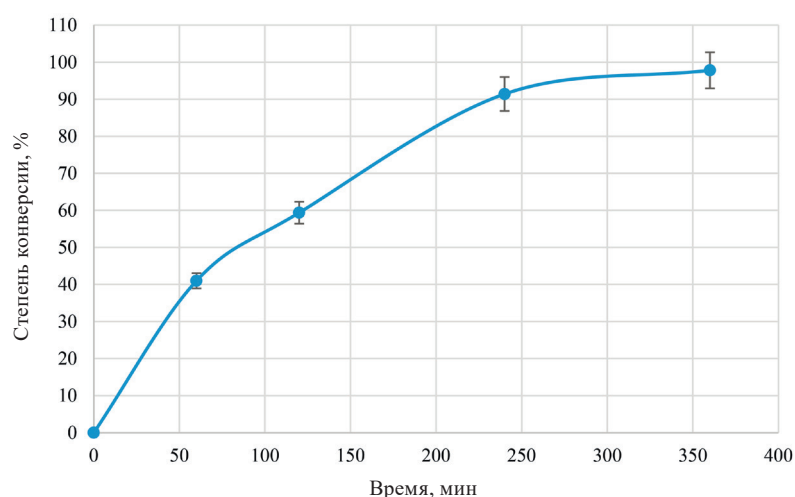


Рис. 2. Динамика накопления 6ТДГ в реакционной смеси

Fig. 2. Dynamics of 6TDG accumulation in the reaction mixture

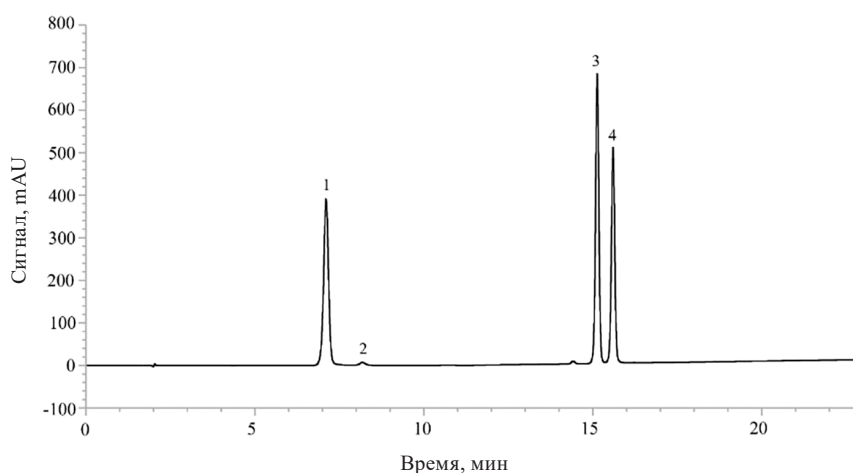


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма состава реакционной смеси спустя 6 ч инкубирования:

1 – Thy; 2 – 6ТГ; 3 – dThd; 4 – 6ТДГ

Fig. 3. HPLC chromatogram of the composition of the reaction mixture after 6 hours of incubation:

1 – Thy; 2 – 6TG; 3 – dThd; 4 – 6TDG

Согласно данным хроматограммы время элюции с колонки основных компонентов реакционной смеси составило: для Thy – 7,108 мин, 6ТГ – 8,185 мин, dThd – 15,130 мин, 6ТДГ – 15,600 мин.

Спустя 6 ч инкубирования конечную реакционную смесь фильтровали на стеклянном фильтре. Для удаления остаточных количеств белков осадок промывали 2 раза водой и отфильтровывали. За 2 цикла отмывки практически удалось избавиться от dThd и Thy. Наиболее трудоемким является удаление 6ТГ из-за его слабой растворимости. В дальнейших отмывках применяли этиловый спирт (98 %), в котором 6ТГ наиболее растворим.

После заключительного этапа отмывки субстанцию 6ТДГ фильтровали и высушивали при комнатной температуре 24 ч в защищенном от света месте. Полученный порошок гомогенизировали.

В результате препаративного ферментативного синтеза в реакционной смеси объемом 400 мл и последующего выделения конечного продукта реакции получено 30,46 г химической субстанции 6ТДГ с чистой 99,6 % согласно ВЭЖХ (рис. 4).

При хроматографировании на тонкослойных пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) подвижность целевого продукта совпадала с R_f контрольного препарата 6ТДГ фирмы MedChemExpress (США).

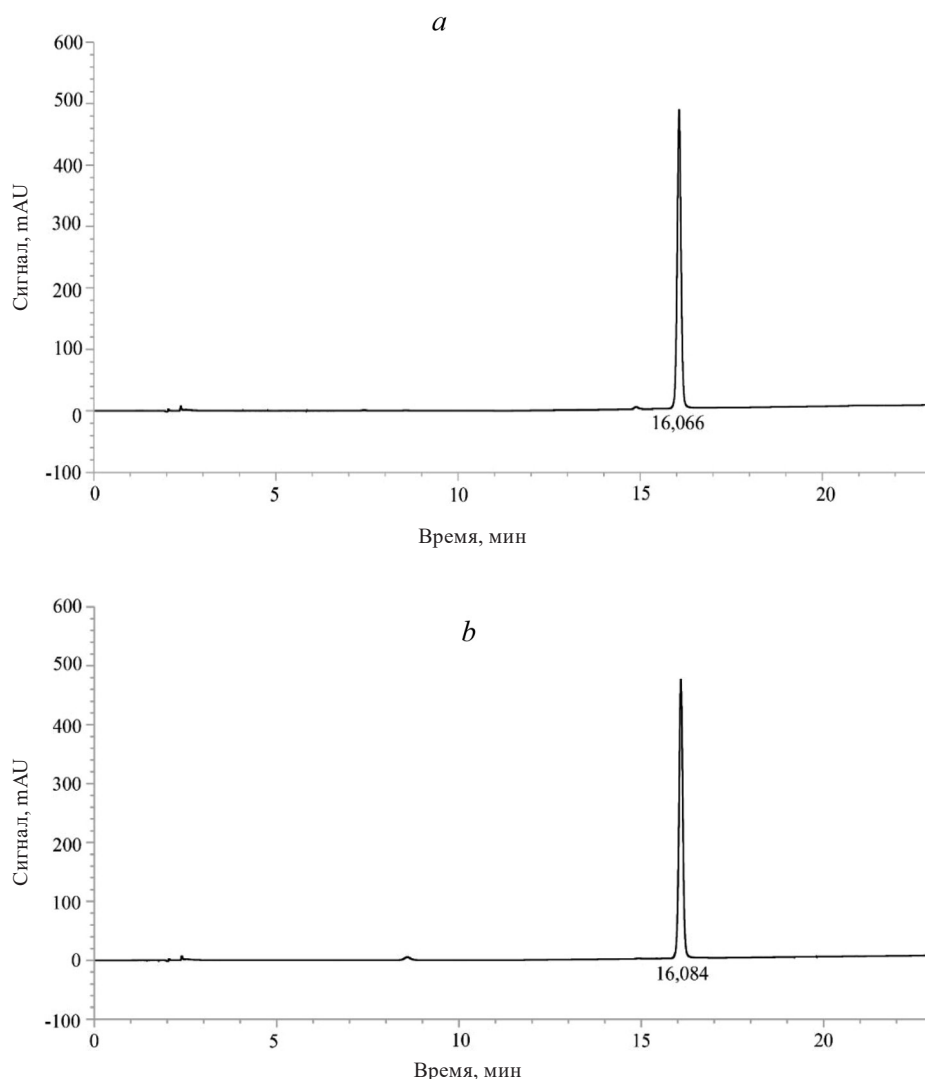


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма очищенной субстанции 6ТДГ (a) и референсного образца 6ТДГ (b)

Fig. 4. HPLC chromatogram of purified 6TDG substance (a) and reference 6TDG sample (b)

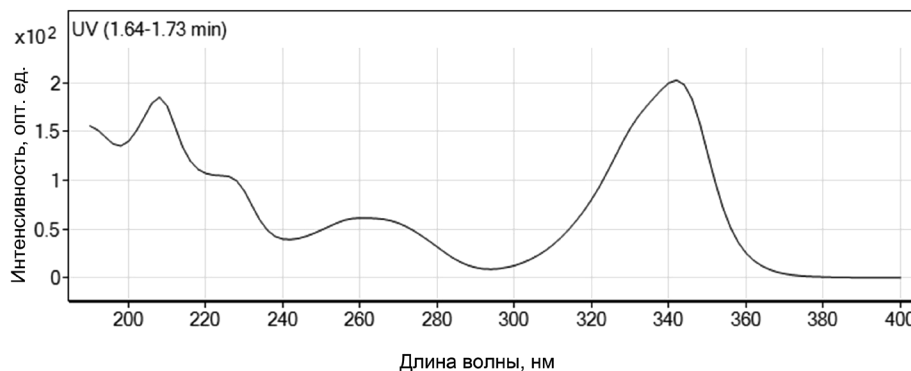


Рис. 5. УФ-спектр полученной субстанции 6ТДГ

Fig. 5. UV spectrum of the obtained 6TDG substance

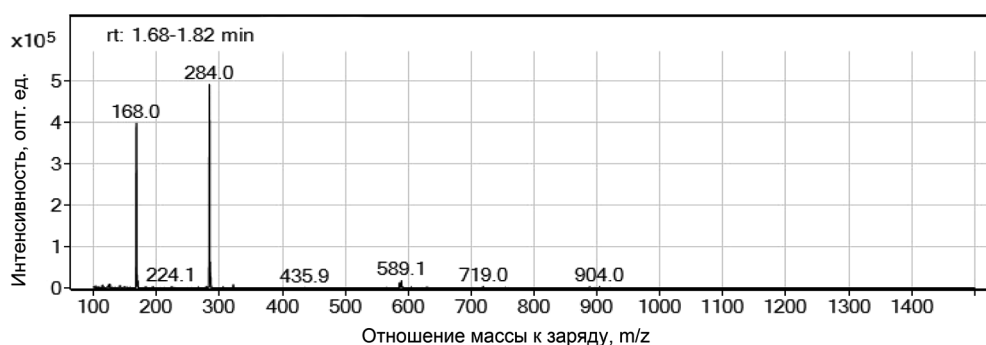


Рис. 6. Масс-спектр полученной субстанции 6ТДГ

Fig. 6. Mass spectrum of the obtained 6TDG substance

Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии полученной субстанции 6ТДГ (раствор в DMSO- d_6 , δ): 8.09 s (1H, H-8); 6.79 bs (NH_2); 6.08 dd (1H, H-1'); 4.31 m (1H, H-3'); 3.78 m (1H, H-4'); 3.50 m (2H, H-2'); 2.53 m (1H, H-5'); 2.12 m (1H, H-5''), а также положения максимумов поглощения в ультрафиолетовом спектре ($\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}, 342 \text{ nm}$) (рис. 5), соответствуют показателям для референсного образца 6ТДГ (MedChemExpress).

Значения изотопных пиков масс-спектрометрического анализа 6ТДГ 168,0 и 284,0 m/z соответствуют ионам $[(6\text{ТГ})+\text{H}]^+$ и $[(6\text{ТДГ})+\text{H}]^+$ соответственно (рис. 6).

Сравнение известного аналитического и разработанного препаративного способов получения 6ТДГ представлено в табл. 3. Использование предлагаемого способа получения 6ТДГ обеспечивает по сравнению с известным способом-прототипом увеличение выхода целевого продукта в расчете на исходный нуклеозид (dThd) с 14,6 до 33,5 % и повышение волюметрического выхода целевого продукта с 4,13 до 75,8 г/л реакционной смеси. Расход dThd на получение 1 г целевого продукта снижается с 5,81 до 2,53 г и существенно повышается эффективность использования единицы объема биореактора.

Таблица 3. Сравнение показателей известного и разработанного способов получения 6ТДГ

Table 3. Comparison of parameters of the known and developed methods of 6TDG production

Сравниваемые параметры	Прототип	Предлагаемое техническое решение
Концентрация dThd	100 ммоль/л	800 ммоль/л
Концентрация 6ТГ	20 ммоль/л	400 ммоль/л
Волюметрический выход 6ТДГ	4,13 г/л	75,8 г/л
Выход 6ТДГ на затраченный dThd	14,6 %	33,5 %
Выход на затраченный 6ТГ	73,0 %	67,0 %
Затраты dThd	5,81 г/г целевого продукта	2,53 г/г целевого продукта

Закключение. Таким образом, в отличие от описанного ранее аналитического способа синтеза, в настоящем исследовании в реакционную смесь нами внесены повышенные количества исходных субстратов, в частности, содержание 6ТГ повысили с 0,02 до 0,4 моль/л, а содержание dThd подняли с 0,1 до 0,8 моль/л, при этом снизив его избыток по отношению к 6ТГ с пятикратного до двукратного. Также увеличили (с 0,01 до 0,02 М) экспериментально подобранную концентрацию калий-фосфатного буфера, обеспечивающего необходимое для участия в процессе фосфорилиза dThd количество неорганического фосфата.

Существенно, что в предложенном нами варианте в начале процесса в растворенном состоянии находится только небольшая часть исходных dThd и 6ТГ. Но по мере синтеза 6ТДГ происходит постепенное дорастворение этих субстратов, находящихся в осадке. Следует отметить, что использование исходных нуклеозида и азотистого основания в концентрациях больших, чем в предложенном варианте, нерационально и малоэффективно, так как приводит к значительным техническим трудностям, связанным с перемешиванием реакционной смеси.

Отличительные особенности предложенного нами технического решения являются существенными ввиду того, что только при использовании указанных параметров процесса удастся достичь цели настоящего исследования – многократного повышения волюметрического выхода целевого продукта. Кроме того, при этом повышается более чем в 2 раза выход 6ТДГ в расчете на затраченный dThd. Предлагаемый метод высокотехнологичен и может быть успешно применен в условиях производства.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в расшифровке спектра ЯМР профессору Е. И. Квасюку (МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ), а также С. М. Грязнову за любезно предоставленный для работы реагент 6ТГ.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to Professor E. Kvasyuk (International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University) for assistance in decoding the NMR spectrum, and Dr. S. Gryaznov (MAIA Biotechnology, USA) for the 6TG reagent kindly provided for the work.

Список использованных источников

1. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases / L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2013. – Vol. 12, N 6. – P. 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
2. Biocatalytic synthesis of antiviral nucleosides, cyclic dinucleotides, and oligonucleotide therapies / K. J. D. Van Giesen, M. J. Thompson, Q. Meng, S. L. Lovelock // *JACS Au*. – 2023. – Vol. 3, N 1. – P. 13–24. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00481>
3. De Clercq, E. Selected milestones in antiviral drug development / E. De Clercq // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16, N 2. – Art. 169. <https://doi.org/10.3390/v16020169>
4. Fighting antimicrobial resistance: innovative drugs in antibacterial research / R. D. Süssmuth, M. Kulike-Koczula, P. Gao, S. Kosol // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2025. – Vol. 64, N 10. – Art. e202414325. <https://doi.org/10.1002/anie.202414325>
5. Lewkowicz, E. S. Whole cell biocatalysts for the preparation of nucleosides and their derivatives / E. S. Lewkowicz, A. M. Iribarren // *Current Pharmaceutical Design*. – 2017. – Vol. 23, N 45. – P. 6851–6878. <https://doi.org/10.2174/1381612823666171011101133>
6. Enabling broader adoption of biocatalysis in organic chemistry / E. O. Romero, A. T. Saucedo, J. R. Hernandez-Melyendez [et al.] // *JACS Au*. – 2023. – Vol. 3, N 8. – P. 2073–2085. <https://doi.org/10.1021/jacsau.3c00263>
7. Verma, S. Recent developments and applications of biocatalytic and chemoenzymatic synthesis for the generation of diverse classes of drugs / S. Verma, S. Paliwal // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2024. – Vol. 25, N 4. – P. 448–467. <https://doi.org/10.2174/0113892010238984231019085154>
8. Del Arco, J. Purine and pyrimidine salvage pathway in thermophiles: a valuable source of biocatalysts for the industrial production of nucleic acid derivatives / J. Del Arco, J. Fernandez-Lucas // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 102, N 18. – P. 7805–7820. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9242-8>
9. Microbial biosynthesis of nucleos(t)ide analogs: applications, and engineering optimization / W. Yu, X. Wei, Y. Wu [et al.] // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2024. – Vol. 51, N 5. – P. 879–897. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2024.2435668>
10. Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine / I. Mender, S. Gryaznov, Z. G. Dikmen [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5, N 1. – P. 82–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-14-0609>
11. A Modified Nucleoside 6-Thio-2'-Deoxyguanosine Exhibits Antitumor Activity in Gliomas / Sh. Yu, Sh. Wei, M. Savani [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 27, N 24. – P. 6800–6814. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-21-0374>

12. A telomere-targeting drug depletes cancer initiating cells and promotes anti-tumor immunity in small cell lung cancer / B. Eglenen-Polat, R. R. Kowash, H. C. Huang [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, N 1. – Art. 672. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44861-8>
13. A convenient synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine, *ara*-guanine, *ara*-6-thioguanine and certain related purine nucleosides by the stereospecific sodium salt glycosylation procedure / N. B. Hanna, K. Ramasamy, R. K. Robins, G. R. Revankar // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1988. – Vol. 25, N 6. – P. 1899–1903. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570250653>
14. Xu, Y. Z. Simple synthesis of 4-thiothymidine, 4-thiouridine and 6-thio-2'-deoxyguanosine / Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann // *Tetrahedron Letters*. – 1991. – Vol. 32, N 24. – P. 2817–2820. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)85095-m](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)85095-m)
15. Onizuka, K. A new odorless procedure for the synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine and its incorporation into oligodeoxynucleotides / K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2009. – Vol. 28, N 8. – P. 752–760. <https://doi.org/10.1080/15257770903155576>
16. Bieber, A. L. Enzymatic synthesis and some biochemical effects of 2'-deoxy-6-thioguanosine / A. L. Bieber, A. C. Sartorelli // *Nature*. – 1964. – Vol. 201. – Art. 624. <https://doi.org/10.1038/201624a0>
17. Атака на теломеры, или Подход к терапии рака с помощью 6-тио-2'-дезоксигуанозина / А. Береснев, Е. Квасюк, С. Квач, А. Зинченко // *Наука и инновации*. – 2016. – № 9. – С. 58–61.
18. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions / U. Horn, W. Strittmatter, A. Krebber [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1996. – Vol. 46, N 5–6. – P. 524–532. <https://doi.org/10.1007/s002530050855>

References

1. Jordheim L. P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
2. Van Giesen K. J. D., Thompson M. J., Meng Q., Lovelock S. L. Biocatalytic synthesis of antiviral nucleosides, cyclic dinucleotides, and oligonucleotide therapies. *JACS Au*, 2023, vol. 3, no. 1, pp. 13–24. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00481>
3. De Clercq E. Selected milestones in antiviral drug development. *Viruses*, 2024, vol. 16, no. 2, art. 169. <https://doi.org/10.3390/v16020169>
4. Sussmuth R. D., Kulike-Koczula M., Gao P., Kosol S. Fighting antimicrobial resistance: innovative drugs in antibacterial research. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, vol. 64, no. 10, art. e202414325. <https://doi.org/10.1002/anie.202414325>
5. Lewkowicz E. S., Iribarren A. M. Whole cell biocatalysts for the preparation of nucleosides and their derivatives. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, vol. 23, no. 45, pp. 6851–6878. <https://doi.org/10.2174/138161282366617101101133>
6. Romero E. O., Saucedo A. T., Hernandez-Melendez J. R., Yang D., Chakrabarty S., Narayan A. R. Enabling broader adoption of biocatalysis in organic chemistry. *JACS Au*, 2023, vol. 3, no. 8, pp. 2073–2085. <https://doi.org/10.1021/jacsau.3c00263>
7. Verma S., Paliwal S. Recent developments and applications of biocatalytic and chemoenzymatic synthesis for the generation of diverse classes of drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2024, vol. 25, no. 4, pp. 448–467. <https://doi.org/10.2174/0113892010238984231019085154>
8. Del Arco J., Fernandez-Lucas J. Purine and pyrimidine salvage pathway in thermophiles: a valuable source of biocatalysts for the industrial production of nucleic acid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, vol. 102, no. 18, pp. 7805–7820. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9242-8>
9. Yu W., Wei X., Wu Y., Jiang C., Tu Y., He B. Microbial biosynthesis of nucleos(t)ide analogs: applications, and engineering optimization. *Critical Reviews in Microbiology*, 2024, vol. 51, no. 5, pp. 879–897. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2024.2435668>
10. Mender I., Gryaznov S., Dikmen Z. G., Wright W. E., Shay J. W. Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine. *Cancer Discovery*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 82–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-14-0609>
11. Yu Sh., Wei S., Savani M., Lin X., Du K., Mender I., Siteni S. [et al.]. A Modified Nucleoside 6-Thio-2'-Deoxyguanosine Exhibits Antitumor Activity in Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 2021, vol. 27, no. 24, pp. 6800–6814. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-21-0374>
12. Eglenen-Polat B., Kowash R. R., Huang H. C., Siteni S., Zhu M., Chen K., Bender. M. E. [et al.]. A telomere-targeting drug depletes cancer initiating cells and promotes anti-tumor immunity in small cell lung cancer. *Nature Communications*, 2024, vol. 15, no. 1, art. 672. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44861-8>
13. Hanna N. B., Ramasamy K., Robins R. K., Revankar G. R. A convenient synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine, *ara*-guanine, *ara*-6-thioguanine and certain related purine nucleosides by the stereospecific sodium salt glycosylation procedure. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1988, vol. 25, no. 6, pp. 1899–1903. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570250653>
14. Xu Y. Z., Zheng Q., Swann P. F. Simple synthesis of 4-thiothymidine, 4-thiouridine and 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Tetrahedron Letters*, 1991, vol. 32, no. 24, pp. 2817–2820. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)85095-m](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)85095-m)
15. Onizuka K., Taniguchi Y., Sasaki S. A new odorless procedure for the synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine and its incorporation into oligodeoxynucleotides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2009, vol. 28, no. 8, pp. 752–760. <https://doi.org/10.1080/15257770903155576>
16. Bieber A. L., Sartorelli A. C. Enzymatic synthesis and some biochemical effects of 2'-deoxy-6-thioguanosine. *Nature*, 1964, vol. 201, art. 624. <https://doi.org/10.1038/201624a0>

17. Beresnev A., Kvasyuk E., Kvach S., Zinchenko A. Attack on telomeres, or an Approach to cancer therapy using 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Nauka i innovatsii* [Science and Innovation], 2016, no. 9, pp. 58–61 (in Russian).

18. Horn U., Strittmatter W., Krebber A., Knüpfer U., Kujau M., Wenderoth R., Müller K., Matzku S., Plückthun A., Riesenberger D. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, vol. 46, pp. 524–532. <https://doi.org/10.1007/s002530050855>

Информация об авторах

Биричевская Лариса Леонидовна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: larbir@mail.ru

Дайнеко Анна Васильевна – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: daineko1999@list.ru

Щеколова Анастасия Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastindeathnote@gmail.com

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by. <https://orcid.org/0000-0003-2401-2586>

Information about the authors

Larysa L. Birycheuskaya – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: larbir@mail.ru

Hanna V. Daineka – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: daineko1999@list.ru

Nastassia S. Shchokhalava – 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: nastindeathnote@gmail.com

Anatoli I. Zinchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), 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: zinch@mbio.bas-net.by. <https://orcid.org/0000-0003-2401-2586>

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.344
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-331-340>

Поступила в редакцию 26.12.2024
Received 26.12.2024

Т. В. Самович¹, Е. В. Чепелева², Н. В. Козел^{3, 4}

¹Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

³ООО «Биотехнологический научный центр», индустриальный парк «Великий камень»,
Смолевичский район, Минская область, Республика Беларусь

⁴Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей», Смолевичский район, Минская область,
Республика Беларусь

КАРОТИНОГЕНЕЗ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* ШТАММА IBCE D-1 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕДАХ В УСЛОВИЯХ РАЗНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

Аннотация. Сочетанное действие дефицита биогенных элементов в среде культивирования *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 и света высокой интенсивности более эффективно по сравнению с действием только дефицита биогенов для индукции накопления каротиноидов в клетках водоросли. При этом дефицит азота в среде приводит к большей продукции клетками β-каротина, нежели дефицит калия и фосфора. Установлено преимущественное подавление активности фотосистемы 2 (ФС2) в клетках *D. salina*, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, по сравнению с контролем и вариантом с дефицитом калия и фосфора, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках водоросли β-каротина как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС2.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, дефицит биогенных элементов, свет высокой интенсивности, каротиногенез, β-каротин

Для цитирования: Самович, Т. В. Каротиногенез в клетках *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 при культивировании на модифицированных средах в условиях разной освещенности / Т. В. Самович, Е. В. Чепелева, Н. В. Козел // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 331–340. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-331-340>

Tatsiana V. Samovich¹, Elizaveta V. Chepeleva², Nikolai V. Kozel^{3, 4}

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

²Belarusian State University, Minsk, Belarus

³LLC “Biotechnological scientific center”, Industrial Park “Great Stone”, Smaliavichy District, Minsk Region,
Republic of Belarus

⁴Peasant (farm) economy “Serebryanyj ruchej”, Smaliavichy District, Minsk Region, Republic of Belarus

CAROTENOGENESIS IN *DUNALIELLA SALINA* CELLS IBCE D-1 STRAIN DURING CULTIVATION ON MODIFIED MEDIA UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT ILLUMINATION

Abstract. The combined effect of nutrient deficiency in the cultivation medium of *Dunaliella salina* IBCE D-1 strain and high-intensity light is more effective than the effect of nutrient deficiency alone in inducing the accumulation of carotenoids in algae cells. At the same time, nitrogen deficiency in the nutrient medium leads to greater production of β-carotene by cells than potassium and phosphorus deficiency. A predominant suppression of photosystem 2 (PS2) activity was observed in *D. salina* cells cultured on a nitrogen-deficient medium was established in comparison with the control and variant with potassium and phosphorus deficiency. This may be a key factor in triggering increased synthesis of β-carotene in algae cells, as an antioxidant that prevents excessive accumulation of reactive oxygen species in chloroplasts, in particular, singlet molecular oxygen, the generation of which increases when components are damaged or the functioning of PS2 complexes is disrupted.

Keywords: *Dunaliella salina*, deficiency of nutrients, high light intensity, carotenogenesis, β-carotene

For citation: Samovich T. V., Chepeleva E. V., Kozel N. V. Carotenogenesis in *Dunaliella Salina* cells IBCE D-1 strain during cultivation on modified media under conditions of different illumination. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 331–340 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-331-340>

Введение. За последние три десятилетия биотехнология водорослей достигла больших успехов, и некоторые микроводоросли, такие как *Dunaliella*, *Chlorella*, *Haematococcus* и сине-зеленая микроводоросль (цианобактерия) *Spirulina*, теперь выращиваются для производства белков, витаминов, астаксантина, β -каротина, глицерина, незаменимых ненасыщенных жирных кислот, жидкого топлива, фармацевтических препаратов и других химических веществ [1].

Dunaliella salina представляет собой галофитную зеленую микроводоросль, которая способна расти и размножаться при уровне солености от 0,5 до 5,0 М NaCl. При благоприятных для роста условиях *D. salina* продуцирует β -каротин (провитамин А) в количествах, равных около 0,3 % сухой массы, аналогично содержанию β -каротина в листьях растений и других водорослях. Однако под действием стрессовых факторов накопление вторичного β -каротина (не связанного с фотосинтетическим аппаратом) может достигать 10 % от сухой массы, что является самым высоким содержанием β -каротина для любой известной водоросли, растения или другого микроорганизма [2].

Способность *D. salina* к накоплению β -каротина широко используется в различных отраслях производства, таких как пищевая (производство кормов и пищевых добавок) и косметическая промышленность (выпуск косметических средств), фармакология (изготовление лекарственных препаратов).

Наличие у β -каротина выраженного антиоксидантного и иммуномодулирующего действия привело к более активным исследованиям по его применению в профилактике онкологии человека [1, 3]. Пигмент используется для лечения различных расстройств, таких как эритропоэтическая протопорфирия, снижает риск возникновения рака молочной железы у женщин и возрастной дегенерации желтого пятна [4].

Когда было обнаружено, что β -каротин *D. salina* более эффективен в фармакологическом плане по сравнению с пигментом, выделенным из других фотосинтезирующих организмов, интерес к нему существенно возрос. В природе, как правило, каротиноиды находятся в *транс*-форме. Однако при их накоплении (каротиногенезе), индуцированном стрессорами разной природы, клетки *D. salina* могут синтезировать *цис*-изомеры, обладающие повышенным фармакологическим эффектом [5].

Исследования дуналиеллы носят как фундаментальный, так и прикладной характер и сосредоточены чаще всего на организации эффективного производства β -каротина. В Республике Беларусь также имеется коллекция водорослей, в которой присутствует дуналиелла (*D. salina* штамм IBCE D-1) [6]. Этот штамм как продуцент β -каротина изучен недостаточно. В работе предполагается исследовать влияние модификации состава питательной среды на продукцию клетками *D. salina* штамма IBCE D-1 β -каротина.

Цель данной работы – изучить особенности изменения пигментного состава, а также фотохимической активности фотосистем в клетках *D. salina* штамма IBCE D-1 при культивировании на средах, дефицитных по биогенным элементам (N, K + P), в условиях разной освещенности.

Объект и методы исследования. В качестве объекта исследования в работе использовали галофитную зеленую микроводоросль *D. salina* штамм IBCE D-1 из альгологической коллекции Республиканского центра альгологии Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [6].

Для опытов микроводоросль *D. salina* выращивали в стеклянных колбах с рабочим объемом 50 мл на стандартной питательной среде Артари (А) (табл. 1) при светодиодном освещении белого дневного света (цветовая температура 4000 К) с интенсивностью 20 мкмоль квантов/(м² · с) (свет низкой интенсивности, low light, LL) и 200 мкмоль квантов/(м² · с) (свет высокой интенсивности, high light, HL) и фотопериодом 14 ч света/10 ч темноты. Эксперимент проводили в строго контролируемых условиях: температура в световом периоде составляла 23 ± 1 °С, относительная влажность воздуха – 50 %.

Для выяснения влияния модификации состава питательной среды, а именно удаления из нее биогенов (N и K + P), использовали среду, дефицитную по азоту (табл. 2), и среду, дефицитную по калию и фосфору (табл. 3). Микроэлементы готовили по Арнону – H₃BO₃ – 2,86 г/л, MnCl₂ · 4H₂O – 1,81 г/л, ZnSO₄ · 7H₂O – 0,222 г/л, MoO₃ – 176,4 мг/10 л, NH₄VO₃ – 229,6 мг/10 л [6].

Т а б л и ц а 1. Состав контрольной среды (А)

T a b l e 1. Composition of control medium (A)

Компоненты	На 1 л	На 250 мл
NaCl	116 г	29 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	50 г	12,5 г
KNO ₃	2,5 г	0,625 г
K ₂ HPO ₄	0,2 г	0,05 г
NaHCO ₃	1 г	0,25 г
Микроэлементы	2 мл	0,5 мл

Т а б л и ц а 2. Состав среды, дефицитной по азоту (А-Н)

T a b l e 2. Composition of nitrogen-deficient medium (A-N)

Компоненты	На 1 л	На 250 мл
NaCl	116 г	29 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	50 г	12,5 г
K ₂ HPO ₄	0,2 г	0,05 г
NaHCO ₃	1 г	0,25 г
Микроэлементы	2 мл	0,5 мл

Т а б л и ц а 3. Состав среды, дефицитной по калию и фосфору (А-КР)

T a b l e 3. Composition of potassium and phosphorus deficient medium (A-KP)

Компоненты	На 1 л	На 250 мл
NaCl	116 г	29 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	50 г	12,5 г
NaNO ₃	2,1 г	0,525 г
NaHCO ₃	1 г	0,25 г
Микроэлементы	2 мл	0,5 мл

Закладку опытов осуществляли следующим образом: суспензию *D. salina* известной оптической плотности центрифугировали 10 мин при 4000 g на центрифуге Sigma 3-18KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия), супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и снова центрифугировали 10 мин при 4000 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 30 мл питательной среды, после чего суспензию помещали в колбы, контролируя в каждой из них оптическую плотность.

Для проведения биохимических анализов отбирали по 12 мл суспензии из каждой колбы, центрифугировали 10 мин при 4000 g, супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и снова центрифугировали 10 мин при 17 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Осадок замораживали и хранили до проведения анализа при –24 °С.

Продуктивность микроводоросли оценивали по количеству клеток в единице объема суспензии. Подсчет осуществляли с помощью камеры Горяева на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (Япония) [7].

Пигментный состав клеток *D. salina* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), модифицированным в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [8] согласно работам [9–11]. Хлорофиллы и каротиноиды регистрировали с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия) и спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu, Япония).

В работе использовали стандарты фотосинтетических пигментов производства Sigma-Aldrich (Германия).

Параметры, характеризующие активность работы ФС2 и ФС1, рассчитывали с применением метода индукции флуоресценции хлорофилла для нативной культуры *D. salina*, адаптированной в течение 15 мин к темноте. Для определения параметров индукции флуоресценции хлорофилла использовали ПАМ-флуориметр DUAL-PAM-100 (Heinz Walz, Германия) с модулем регистрации флуоресценции ФС2 и двухволновым (830/875 нм) модулем регистрации сигнала P700 (реакционного центра ФС1). Данный прибор позволяет возбуждать модулированным светом низкой интенсивности ($0,048 \text{ мкмоль квантов}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, длина волны возбуждающего света – 635 нм) фоновую флуоресценцию хлорофилла F_0 . При включении актиничного света с интенсивностью 150 мкмоль квантов/ $(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ интенсивность флуоресценции достигает максимального уровня F_m , после чего за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути снижается.

Применение вспышки насыщающего света ($10\,000 \text{ мкмоль квантов}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, 635 нм) на фоне действия актиничного увеличивает интенсивность флуоресценции с уровня F до F_m .

По полученным значениям F_0 , F_0' , F_m , F_m' и F рассчитывали величину варьируемой флуоресценции:

$$F_v = F_m - F_0,$$

потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС2:

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m,$$

эффективный квантовый выход фотохимических реакций ФС2:

$$Y(\text{II}) = (F_m - F) / F_m,$$

а также величину фотохимического и нефотохимического тушения:

$$qP = (F_{m'} - F) / (F_{m'} - F_0),$$

$$qN = (F_m - F_{m'}) / (F_m - F_0'),$$

$$\text{NPQ} = F_m / F_{m'} - 1.$$

Эффективность функционирования электротранспортной цепи или скорость транспорта электронов рассчитывали по формуле:

$$\text{ETR} = Y(\text{II}) \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0,5,$$

где PAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации (в нашем случае 150 мкмоль квантов/ $(\text{м}^2 \cdot \text{с})$), c – часть поглощенного света (обычно 0,84, т. е. 84 %), 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на ФС2 [12–14].

Также определяли согласно [12, 13] квантовые выходы регулируемой и нерегулируемой диссипации энергии – $Y(\text{NPQ})$ и $Y(\text{NO})$ соответственно. Параметры P_m , $Y(\text{I})$ и $\text{ETR}(\text{I})$ характеризуют состояние и активность ФС1, аналогичны таковым для ФС2 и определяются согласно [13]. Квантовые выходы фотохимических реакций ФС1, $Y(\text{ND})$ и $Y(\text{NA})$ характеризуют донорные и акцепторные свойства P700 [13].

Эксперименты были проведены в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

В работе приведены средние значения из 3–5 экспериментов и их стандартные отклонения. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2019, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было показано, что дефицит биогенных элементов существенно влияет на пигментный состав клеток *D. salina*, при этом накопление β -каротина

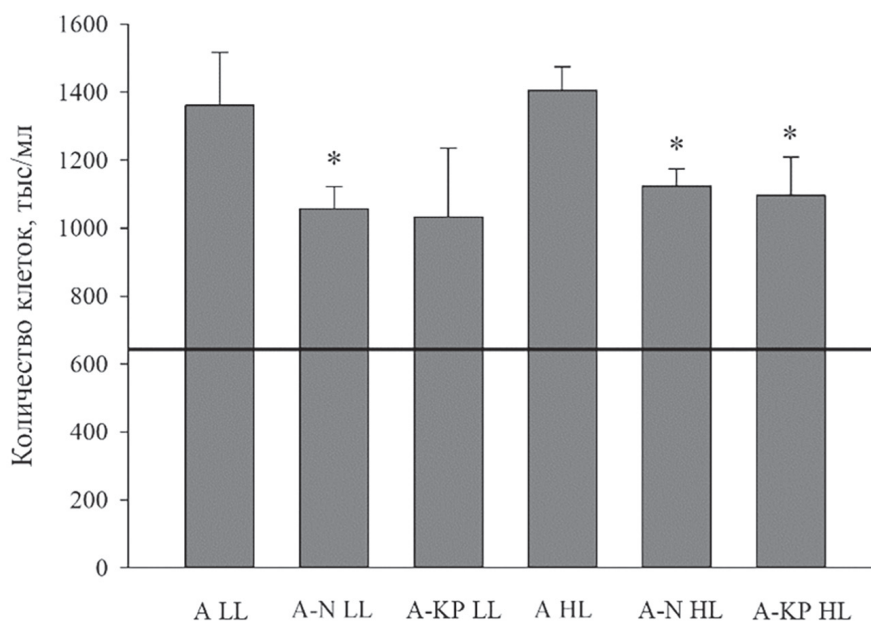


Рис. 1. Количество клеток в суспензии *D. salina* при культивировании на модифицированных средах при разной интенсивности освещения (* – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$, исходное количество клеток представлено базовой линией)

Fig. 1. Number of cells in *D. salina* suspension when cultured on modified media at different light intensities (* – differences compared to the control are significant, $p \leq 0.05$, the initial cell count is represented by the baseline)

в клетках микроводоросли в условиях дефицита азота более эффективно по сравнению с контролем, а также дефицитом калия и фосфора [15]. Однако недостаток питательных веществ при культивировании дуналиеллы является легким стрессом по сравнению с действием света высокой интенсивности. Мы предполагаем, что при сочетании нескольких факторов стресса можно добиться максимального эффекта в накоплении вторичных метаболитов, в частности β -каротина. В связи с этим в данной работе мы проанализировали влияние сочетанного действия дефицита биогенных элементов и света высокой интенсивности на продуктивность и пигментный состав клеток *D. salina*.

Оценка продуктивности *D. salina* осуществлялась по количеству клеток в объеме суспензии после выращивания в течение 3 недель на модифицированных средах при разной интенсивности света. Результаты подсчета клеток представлены на рис. 1.

Из полученных данных видно, что на полной питательной среде количество клеток в среднем увеличилось в 2,1 (A LL) и 2,2 (A HL) раза по сравнению с исходным значением. В среде, дефицитной по азоту, количество клеток увеличилось в 1,7 (A-N LL) и 1,8 (A-N HL) раза, а в среде, дефицитной по калию и фосфору, – в 1,6 (A-KP LL) и 1,7 (A-KP HL) раза по сравнению с контролем при низкой (20 мкмоль квантов/(м² · с), LL) и высокой (200 мкмоль квантов/(м² · с), HL) интенсивности освещения соответственно.

Методом ВЭЖХ был проанализирован качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов клеток *D. salina* при культивировании на модифицированных средах при разной интенсивности освещения. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить в исследуемых вариантах наличие каротиноидов неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина, а также хлорофиллов *a* и *b* [16]. Анализ количественного состава фотосинтетических пигментов показал, что во всех вариантах опыта содержание β -каротина увеличилось относительно контроля, а в наибольшей степени – в опытных пробах *D. salina*, культивируемой на среде без азота в условиях действия света высокой интенсивности, где наблюдалось 5-кратное увеличение продукции клетками *D. salina* β -каротина по сравнению с контролем, выращенным на свету высокой интенсивности (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Содержание фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina* при культивировании на модифицированных средах при разной интенсивности освещенияTable 4. Content of photosynthetic pigments in *D. salina* cells when cultured on modified media at different light intensities

Пигмент	Вариант					
	A LL	A-N LL	A-KP LL	A HL	A-N HL	A-KP HL
Содержание пигментов, пг/кл (в скобках – % к контролю)						
Неоксантин	1,11 ± 0,11	0,67 ± 0,04* (61)	0,71 ± 0,14* (64)	0,62 ± 0,07	н. о.	0,47 ± 0,07* (75)
Виолаксантин	0,49 ± 0,06	0,18 ± 0,01* (38)	0,45 ± 0,09 (93)	0,33 ± 0,04	н. о.	0,20 ± 0,03* (61)
Лютеин	3,06 ± 0,19	2,84 ± 0,09 (93)	2,29 ± 0,44* (75)	2,10 ± 0,24	2,25 ± 0,09 (107)	1,68 ± 0,35* (80)
Хлорофилл <i>b</i>	5,99 ± 0,31	4,00 ± 0,04* (67)	4,22 ± 1,04* (70)	3,50 ± 0,33	2,79 ± 0,06* (80)	2,18 ± 0,49* (62)
Хлорофилл <i>a</i>	14,71 ± 0,95	10,61 ± 0,07* (53)	11,24 ± 2,59* (76)	9,02 ± 0,85	7,22 ± 0,05* (80)	6,00 ± 1,24* (67)
β-каротин	4,37 ± 0,59	9,26 ± 1,45* (212)	6,01 ± 0,85* (138)	4,55 ± 0,36	21,89 ± 0,23* (481)	9,44 ± 0,35* (207)

П р и м е ч а н и е. * – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$; н. о. – не обнаружено.

В абсолютном выражении количество β-каротина составляло в варианте A-N HL 21,89 пг/кл – это наибольшее зафиксированное нами содержание пигмента во всех проведенных экспериментах, оно в 2,3 раза выше значения, полученного для варианта, где отсутствовало дополнительное воздействие светом высокой интенсивности. Также следует отметить, что в образце A-N HL не детектировались неоксантин и виолаксантин, что, видимо, связано с регуляцией биосинтеза каротиноидов в клетках *D. salina* в стрессовых условиях, а также снизилось в 2 раза содержание хлорофиллов, что может быть следствием их фотодеструкции и (или) снижения синтеза.

Для выяснения механизмов, лежащих в основе разного накопления β-каротина в клетках водоросли, с помощью РАМ-флуориметрии исследовали влияние состава питательной среды и интенсивности освещения на функциональную активность фотосинтетического аппарата *D. salina*.

Анализ результатов РАМ-флуориметрии (табл. 5) показал снижение потенциального и эффективного квантовых выходов фотохимии ФС2, а также эффективность переноса электронов в пределах ФС2 (показатели F_v/F_m , $Y(II)$ и $ETR(II)$ соответственно) в вариантах с отсутствием азота по сравнению с контрольными, в то время как дефицит калия и фосфора не приводил к таким нарушениям фотохимической активности ФС2. Более того, в варианте A-KP мы наблюдали увеличение на свету высокой интенсивности константы фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qP на фоне снижения показателей регулируемого нефотохимического тушения ($Y(NPQ)$, NPQ), что указывает на относительно нормальное функционирование ФС2 при дефиците калия и фосфора в отличие от дефицита азота. При этом отметим существенное снижение эффективности переноса электронов в пределах ФС1, а также других параметров эффективности функционирования ФС1 в вариантах с дефицитом калия и фосфора. Достоверного влияния дефицита азота на фотохимическую активность ФС1 не выявлено.

Т а б л и ц а 5. Параметры функционирования фотосинтетического аппарата клеток *D. salina* при культивировании на модифицированных средахTable 5. Parameters of functioning of photosynthetic apparatus of *D. salina* cells during cultivation on modified media

Параметр	Вариант					
	A LL	A-N LL	A-KP LL	A HL	A-N HL	A-KP HL
F_o	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,01*	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01*
F_m	0,51 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,37 ± 0,05*	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,02*
F_v/F_m	0,59 ± 0,01	0,52 ± 0,01*	0,54 ± 0,04	0,46 ± 0,01	0,38 ± 0,02*	0,38 ± 0,02*
$Y(II)$	0,32 ± 0,04	0,26 ± 0,01*	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,01*	0,28 ± 0,01
$ETR(II)$	22,01 ± 2,91	14,50 ± 0,67*	17,63 ± 1,64	14,85 ± 1,50	13,05 ± 0,46*	15,53 ± 0,59

Окончание табл. 5

Параметр	Вариант					
	A LL	A-N LL	A-KP LL	A HL	A-N HL	A-KP HL
Y(NO)	0,61 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,61 ± 0,04	0,66 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,70 ± 0,01
Y(NPQ)	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,01*
NPQ	0,12 ± 0,04	0,23 ± 0,05*	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,08	0,09 ± 0,05	0,03 ± 0,01*
qN	0,14 ± 0,04	0,25 ± 0,05*	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,08	0,11 ± 0,05	0,04 ± 0,01*
qP	0,56 ± 0,07	0,56 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,04	0,68 ± 0,02	0,76 ± 0,03*
1-qP	0,44 ± 0,05	0,44 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,03*
P_m	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,02*	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01*
$P_{m'}$	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01*	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01*
Y(I)	0,52 ± 0,08	0,50 ± 0,07	0,33 ± 0,08*	0,53 ± 0,13	0,37 ± 0,12	0,38 ± 0,05*
ETR(I)	36,30 ± 4,08	27,50 ± 3,87	18,23 ± 4,27*	31,45 ± 5,59	26,63 ± 6,41	21,08 ± 2,74*
Y(ND)	0,25 ± 0,07	0,18 ± 0,07	0,41 ± 0,13*	0,30 ± 0,07	0,25 ± 0,08	0,27 ± 0,08
Y(NA)	0,28 ± 0,11	0,32 ± 0,09	0,30 ± 0,12	0,22 ± 0,06	0,38 ± 0,10	0,35 ± 0,10

Примечание. Представлены результаты трех независимых опытов; * – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$.

Более выражено снижение фотохимической активности ФС2 при дефиците азота видно на световых кривых, представленных на рис. 2, которые демонстрируют изменение эффективности работы электронтранспортной цепи в зависимости от интенсивности актиничного света. Параметр ETR(II) существенно снижался для клеток *D. salina*, выращенных на азотдефицитной среде как при низкой, так и при высокой освещенности. Подавление фотохимической активности ФС2 в условиях недостатка азота может быть следствием нарушения биосинтеза основных структурных белков фотосинтетического аппарата, в частности белков реакционного центра ФС2 [17].

Достоверных различий между контрольными и опытными вариантами для показателя ETR(I) ФС1 зафиксировано не было (рис. 3).

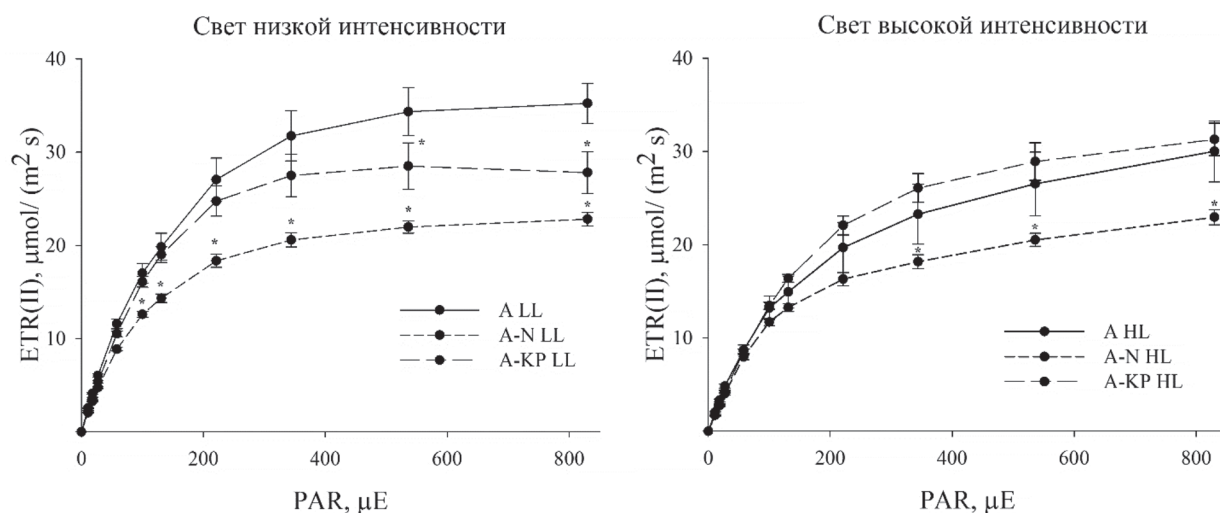


Рис. 2. Световые кривые, демонстрирующие изменение эффективности работы электронтранспортной цепи ФС2 *D. salina* в зависимости от интенсивности актиничного света при модификации питательных сред (* – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$)

Fig. 2. Light curves showing changes in the efficiency of the electron transport chain of *D. salina* PS2 as a function of actinic light intensity during modification of nutrient media (* – differences compared to the control are significant, $p \leq 0.05$)

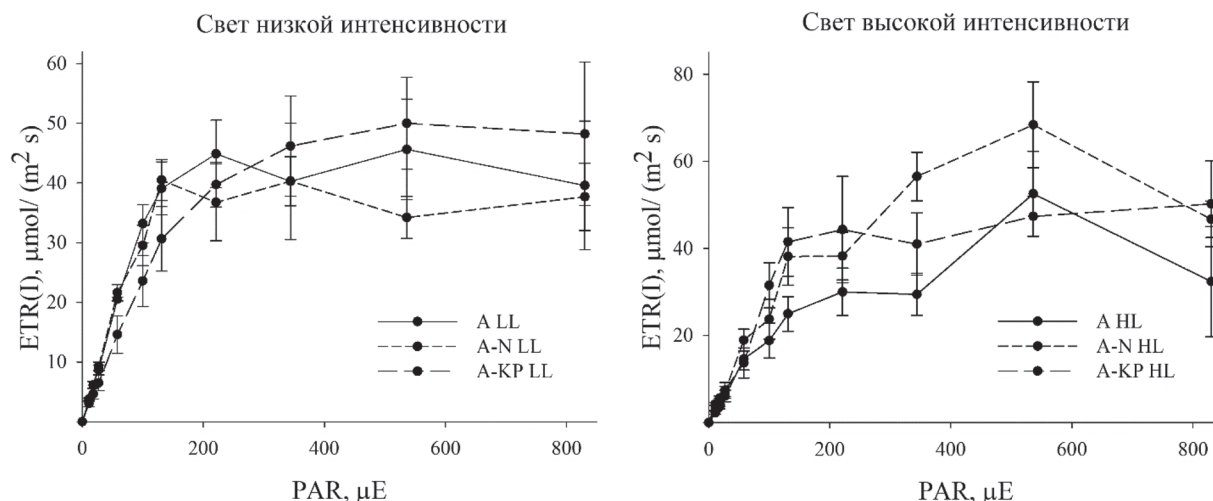


Рис. 3. Световые кривые, демонстрирующие изменение эффективности работы электронтранспортной цепи ФС1 *D. salina* в зависимости от интенсивности актиничного света при модификации питательных сред

Fig. 3. Light curves showing the change in the efficiency of the electron transport chain of *D. salina* PS1 as a function of actinic light intensity during the modification of nutrient media

Закключение. Таким образом, показано, что сочетанное действие дефицита биогенных элементов в среде культивирования *D. salina* и света высокой интенсивности более эффективно по сравнению с действием только дефицита биогенов для индукции накопления каротиноидов в клетках водоросли. При этом дефицит азота в среде приводит к большей продукции клетками β-каротина, нежели дефицит калия и фосфора.

Выявлено преимущественное подавление активности ФС2 в клетках *D. salina*, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках водоросли β-каротина как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС2. Полученный результат не только раскрывает механизм увеличения синтеза β-каротина в клетках *D. salina*, но и показывает перспективность использования дефицитных по азоту сред при культивировании водоросли с целью получения β-каротина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Raja, R. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production / R. Raja, S. Hemaiswarya, R. Rengasamy // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 74, N 3. – P. 517–523. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0777-8>
2. Индукция вторичного каротиногенеза у новых галофильных микроводорослей из рода *Dunaliella* (Chlorophyceae) / А. Е. Соловченко, Е. А. Селиванова, К. А. Чеканов [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 11. – С. 1724–1730.
3. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Н. В. Терентьева // Морський екологічний журнал. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 5–23.
4. Al-Muhteseb, S. I. Producing Natural Mixed Carotenoids from *Dunaliella salina* / S. I. Al-Muhteseb, S. Emeish // Journal of Natural Sciences Research. – 2015. – Vol. 5, N 10. – P. 53–59.
5. Shariati, M. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella* / M. Shariati, M. Reza Hadi // Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications, Isfahan, 1 August 2011 / University of Isfahan; ed.: A. Carpi [et al.]. – Isfahan, 2011. – P. 483–506. <https://doi.org/10.5772/19046>
6. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников, Е. Е. Мананкина, Е. А. Будакова, Н. В. Шалыго. – Мн.: Беларус. навука, 2011. – 101 с.
7. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л. А. Сиренко, А. И. Сакевич, Л. Ф. Осипов [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1975. – 248 с.
8. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. / K. Azarin, A. Usatov, M. Makarenko [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2020. – Vol. 103, N 4–5. – P. 373–389. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00997-x>
9. Forni, E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas / E. Forni, M. Ghezzi, A. Polesello // Chromatography. – 1988. – Vol. 26, N 1. – P. 120–124. <https://doi.org/10.1007/bf02268135>

10. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies / S. M. Milenković, J. B. Zvezdanović, T. D. Anđelković, D. Z. Marković // *Advanced technologies*. – 2012. – Vol. 1, N 1. – P. 16–24.
11. Rodriguez-Amaya, D. B. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis* / D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. – Washington: International Food Policy Research Institute, 2004. – 63 p.
12. Корнеев, Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции / Д. Ю. Корнеев. – Киев: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
13. Dual-PAM-100 Measuring system for simultaneous assessment of p700 and chlorophyll fluorescence / Heinz Walz GmbH. – Germany, 2009. – URL: http://www.walz.com/downloads/manuals/dual-pam-100/Dual-PAM_1e.pdf (date of access: 11.04.2020).
14. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky chlorophyll *a* fluorescence / Govindjee // *Australian Journal of Plant Physiology*. – 1995. – Vol. 22, N 2. – P. 131–160. <https://doi.org/10.1071/pp9950131>
15. Чепелева, Е. В. Пигментный состав *Dunaliella salina* при культивировании на модифицированных средах / Е. В. Чепелева, Т. В. Самович, Н. В. Козел // Биологически-активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию Ин-та биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, 5–6 окт. 2021 г., г. Гродно, Республика Беларусь / Ин-т биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. – Гродно, 2021. – С. 569–573.
16. Каляга, Т. Г. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар / Т. Г. Каляга, Н. В. Козел // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2020. – № 3. – С. 46–53.
17. Transcription strategies related to photosynthesis and nitrogen metabolism of wheat in response to nitrogen deficiency / X. Liu, Ch. Yin, L. Xiang [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2020. – Vol. 20. – Art. 448. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02662-3>

References

1. Raja R., Hemaiswarya S., Rengasamy R. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 74, no. 3, pp. 517–523. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0777-8>
2. Solovchenko A. E., Selivanova E. A., Chekanov K. A., Sidorov R. A., Nemtseva N. V., Lobakova E. S. Induction of secondary carotenogenesis in new halophile microalgae from the genus *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no. 11, pp. 1508–1513 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0006297915110139>
3. Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N., Terent'eva N. V. Unicellular algae as a renewable resource. *Mors'kii ekologichnii zhurnal* [Marine ecological journal], 2008, vol. 7, no. 2, pp. 5–23 (in Russian).
4. Al-Muhteseb S. I., Emeish S. Producing Natural Mixed Carotenoids from *Dunaliella salina*. *Journal of Natural Sciences Research*, 2015, vol. 5, no. 10, pp. 53–59.
5. Shariati M., Reza Hadi M. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*, Isfahan, 1, August 2011. Isfahan, 2011, pp. 483–506. <https://doi.org/10.5772/19046>
6. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Catalogue of the genetic fund of economically useful algae species*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
7. Sirenko L. A., Sakevich A. I., Osipov L. F., Lukina L. F., Kuz'menko M. I., Kozitskaya V. N., Velichko I. M., Myslovich V. O., Gavrilenko M. Ya., Arendarchuk V. V., Kirpenko Yu. A. *Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1975. 248 p. (in Russian).
8. Azarin K., Usatov A., Makarenko M., Kozel N., Kovalevich A., Dremuk I., Yemelyanova A., Logacheva M., Fedorenko A., Averina N. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology*, 2020, vol. 103, no. 4–5, pp. 373–389. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00997-x>
9. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*, 1988, vol. 26, no. 1, pp. 120–124. <https://doi.org/10.1007/bf02268135>
10. Milenković S. M., Zvezdanović J. B., Anđelković T. D., Marković D. Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 16–24.
11. Rodriguez-Amaya D. B., Kimura M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. Washington, International Food Policy Research Institute, 2004. 63 p.
12. Korneev D. Yu. *Information capabilities of the fluorescence induction method*. Kiev, Al'terpres Publ., 2002, 188 p. (in Russian).
13. Dual-PAM-100 Measuring system for simultaneous assessment of p700 and chlorophyll fluorescence. Heinz Walz GmbH. Germany, 2009. Available at: http://www.walz.com/downloads/manuals/dual-pam-100/Dual-PAM_1e.pdf (accessed 11.04.2020).
14. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1995, vol. 22, no. 2, pp. 131–160. <https://doi.org/10.1071/pp9950131>
15. Чепелева Е. В., Самович Т. В., Козел Н. В. The pigment composition of *Dunaliella salina* during cultivation on modified media. *Biologicheski-aktivnye veshchestva prirodnogo proiskhozhdeniya v regulatsii protsessov zhiznedejatel'nosti: sbornik statei Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 50-letiyu Instituta biokhimii biologicheskii aktivnykh soedinenii Natsional'noi akademii nauk Belarusi (5–6 oktyabrya 2021 goda, g. Grodno, Respublika Bela-*

rus') [Biologically active substances of natural origin in the regulation of life processes: collection of articles from the International scientific and practical conference dedicated to the 50th anniversary of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (October 5–6, 2021, Grodno, Republic of Belarus)]. Grodno, 2021. pp. 569–573 (in Russian).

16. Kalyaga T. G., Kozel N. V. Influence of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. [Journal of the Belarusian State University. Biology], 2020, no. 3, pp. 46–53 (in Russian).

17. Liu X., Yin Ch., Xiang L., Jiang W., Xu Sh., Mao Z. Transcription strategies related to photosynthesis and nitrogen metabolism of wheat in response to nitrogen deficiency. *BMC Plant Biology*, 2020, vol. 20, art. 448. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02662-3>

Информация об авторах

Самович Татьяна Викторовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: samovich77@gmail.com

Чепелева Елизавета Владимировна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: liza.lizaveta1979@gmail.com

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. ООО «Биотехнологический научный центр», промышленный парк «Великий камень» (пр-т Пекинский, 18, 222210, Смолевичский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). Гл. технолог. КФХ «Серебряный ручей» (222202, д. Сосновая, Озерицко-Слободской с/с, Смолевичский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Information about the authors

Tatsiana V. Samovich – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: samovich77@gmail.com

Elizaveta V. Chepeleva – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: liza.lizaveta1979@gmail.com

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Research. LLC “Biotechnological scientific center”, Industrial Park “Great Stone” (18, Pekinskii Ave., 222210, Smaliavichy District, Minsk Region, Republic of Belarus). Chief technologist. Peasant (farm) economy “Serebryanyj ruchey” (Sasnovaja Village, 222202, Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 613.2.038:616.441-008.63:796.012.6:616-092.9

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-341-352>

Поступила в редакцию 24.03.2025

Received 24.03.2025

Т. А. Митюкова, А. А. Басалай, Т. Е. Кузнецова, О. Е. Полулях, Н. С. Костюченко

*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск,
Республика Беларусь*

ПОДХОДЫ К КОРРЕКЦИИ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА У САМОК КРЫС С ВИСЦЕРАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

Аннотация. Как свидетельствуют данные литературы и наши предыдущие исследования, ожирение может вызывать дисфункцию щитовидной железы (ЩЖ) у самок крыс.

Цель работы – изучение морфо-функционального состояния ЩЖ при диет-индуцированном висцеральном ожирении и вариантах его немедикаментозной коррекции у самок крыс линии Wistar.

Крысы получали стандартную (СтД) либо высококалорийную диету (ВКД), вызывающую висцеральное ожирение. Коррекцию ожирения проводили путем перехода от ВКД на СтД и (или) с подключением бега на тредмиле. Эксперимент включал 6 групп животных: 1) «СтД» – 16 недель; 2) «ВКД» – 16 недель; 3) «ВКД/СтД» – 8/8 недель; 4) «СтД + бег» – 16/8 недель; 5) «ВКД + бег» – 16/8 недель; 6) «ВКД/СтД + бег» – 8/8 недель.

В сыворотке крови самок крыс группы «ВКД» было зарегистрировано нарастание уровня тироксина (Т4). При этом снижалась активность тиреопероксидазы (ТПО) и содержание малонового диальдегида (МДА) в ткани ЩЖ, а также отмечались морфологические признаки гипопункции ЩЖ. Наиболее полное восстановление активности ТПО и морфо-функциональных характеристик ткани ЩЖ наблюдалось при переходе от ВКД к СтД. Умеренные физические нагрузки на фоне ВКД положительно воздействовали на некоторые морфометрические характеристики ЩЖ, но не восстанавливали значения ТПО и МДА. При сочетанной коррекции ожирения («ВКД/СтД + бег») наблюдалось частичное восстановление гистоструктуры органа с нормализацией активности ТПО, но не МДА.

Таким образом, диет-индуцированное висцеральное ожирение сопровождается повышением уровня тироксина в крови, однако при этом развиваются морфологические и биохимические признаки снижения функциональной активности в ткани ЩЖ. Успешная коррекция висцерального ожирения с восстановлением структуры и функции ЩЖ достигается при переходе от ВКД на СтД.

Ключевые слова: ожирение, щитовидная железа, немедикаментозная коррекция ожирения, бег на тредмиле

Для цитирования: Подходы к коррекции тиреоидного статуса у самок крыс с висцеральным ожирением / Т. А. Митюкова, А. А. Басалай, Т. Е. Кузнецова [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 341–352. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-341-352>

**Tatyana A. Mityukova, Anastasia A. Basalai, Tatyana E. Kuznetsova, Olga Y. Poluliakh,
Mikita S. Kastsyuchenka**

*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus*

APPROACHES TO CORRECT THYROID STATUS IN FEMALE RATS WITH VISCERAL OBESITY

Abstract. Obesity can lead to thyroid dysfunction in male rats, as shown in our primary studies. The aim of this work was to study the morpho-functional state of the thyroid gland in diet-induced visceral obesity and variants of its non-drug correction in female Wistar rats.

The experiments involved six groups of animals. Rats were fed either a standard diet (StD) or a high-calorie diet (HCD), which induced visceral obesity. Obesity was corrected by switching from HCD to StD and/or by treadmill running. The following animal groups were utilized in the study: 1) “StD” – 16 weeks; 2) “HCD” – 16 weeks; 3) “HCD/StD” – 8/8 weeks; 4) “StD + running” – 16/8 weeks; 5) “HCD + running” – 16/8 weeks; 6) “HCD/StD + running” – 8/8 weeks.

An increase in thyroxine (T4) levels was observed in the blood serum of female rats in the HCD group. At the same time, thyroperoxidase (TPO) activity and malonic dialdehyde (MDA) content in thyroid tissue decreased, and morphological signs of thyroid hypofunction were observed. The most complete recovery of TPO activity and morpho-functional characteristics of thyroid tissue was observed during the transition from HCD to StD. Moderate physical activity against the background of HCD had a positive effect on some morphometric characteristics of the thyroid, but did not restore the values of TPO and MDA. With combined correction of obesity (HCD/StD + running), a partial restoration of the organ histostucture with normalisation of TPO activity, but not MDA, was observed.

Thus, diet-induced visceral obesity is accompanied by an increase in blood thyroxine levels, yet morphological and biochemical signs of decreased functional activity of the thyroid gland tissue develop. A successful correction of visceral obesity, accompanied by the restoration of thyroid structure and function, can be achieved by transitioning from HCD to StD.

Keywords: obesity, thyroid, non-medication correction of obesity, treadmill running

For citation: Mityukova T. A., Basalai A. A., Kuznetsova T. E., Poluliakh O. Y., Kastsyuchenka M. S. Approaches to correct thyroid status in female rats with visceral obesity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalyagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 341–352 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-341-352>

Введение. Взаимосвязь между ожирением и тиреоидным статусом носит сложный характер, поскольку развитие ожирения является результатом дисбаланса между потреблением и расходом энергии. Гормоны щитовидной железы (ЩЖ) влияют на расход энергии, регулируя клеточное дыхание и термогенез, а также определяя скорость метаболизма в состоянии покоя. Субклинический гипотиреоз может вызывать изменения основного обмена с последующим увеличением массы тела вплоть до ожирения [1]. При субклиническом гипотиреозе, как правило, регистрируются нарушения липидного обмена [2]. В свою очередь, ожирение также может влиять на функцию ЩЖ через несколько механизмов, таких как липотоксичность, адипокины и воспалительные цитокины [3]. Как при ожирении, так и при субклиническом гипотиреозе отмечаются несколько повышенные значения тиреотропного гормона (ТТГ) и сниженные показатели свободных фракций тиреоидных гормонов – свободного тироксина (св. Т4) и свободного трийодтиронина (св. Т3) [1–3]. Общеизвестно, что при ожирении умеренные физические нагрузки обладают видимым положительным эффектом, особенно если они сочетаются с диетотерапией. Однако вопрос о влиянии тех или иных физических нагрузок на функциональное состояние ЩЖ до сих пор является дискуссионным, хотя и представляет большой интерес.

Результаты тренировочного процесса у спортсменов показывают, что упражнения, выполняемые на анаэробном пороге (70 % от максимальной частоты сердечных сокращений), вызывают повышение значений всех гормонов тиреоидного статуса (ТТГ, общие и свободные фракции Т4 и Т3). Показатели Т4, св. Т4 и ТТГ продолжают расти даже при 90%-й максимальной частоте сердечных сокращений, но значения Т3 и св. Т3 начинают снижаться [4]. Однако в настоящее время существует дефицит сведений, оценивающих связь между уровнем физической активности и функцией ЩЖ в общей популяции, либо эту связь не удается выявить [5]. Изучение тиреоидного статуса у пациентов, получающих медикаментозное лечение в связи с гипотиреозом, показало благоприятный результат при умеренных физических нагрузках. Было установлено значимое снижение уровня ТТГ до уровня нормы у лиц из группы физкультуры по сравнению с лицами, не занимающимися физическими упражнениями. Также было обнаружено, что концентрации сывороточных Т3 и Т4 значительно повышались и достигали нормы в группе, где пациенты регулярно занимались физическими упражнениями. Авторы отметили, что у участников этой группы уменьшилась средняя масса тела [6]. Эти данные свидетельствуют о благоприятных эффектах умеренной физической нагрузки на функциональное состояние ЩЖ и метаболические процессы в организме у пациентов, получающих лечение в связи с гипотиреозом. Оценка влияния аэробных тренировок на гормоны ЩЖ и качество жизни у женщин с ожирением в постменопаузе показала, что 8-недельные регулярные упражнения вызывают значительное повышение уровней Т4, Т3 и тиреолиберина, а также некоторых показателей качества жизни [7]. Данные Национального обследования здоровья и питания США (NHANES) продемонстрировали долгосрочное благоприятное влияние ежедневной физической активности как на системную метаболическую активность (ЩЖ), так и на конкретные физиологические задачи, включая иммунный статус [8]. Эти результаты позволяют рекомендовать ежедневную физическую активность для широких масс населения в рамках здорового образа жизни [8]. Однако по итогам других исследований, включающих метаанализ 6 электронных баз данных, не выявлено существенного влияния физических упражнений на функцию ЩЖ у лиц с гипотиреозом [9]. Тем не менее, общепризнанно, что использование упражнений для коррекции ожирения имеет преимущества, выходящие за рамки снижения жировой массы. Во многих случаях фитнес связан с благоприятными результатами, такими как снижение метаболических и других заболеваний, что особенно

важно для женщин репродуктивного возраста [10]. Результаты, полученные в популяционных, когортных и клинических исследованиях, не дают оснований для однозначного заключения о влиянии регулярной физической активности на функциональную активность ЩЖ. Имеющиеся сведения нуждаются в экспериментальной верификации, которая позволит рассмотреть механизмы функциональных сдвигов, протекающих в ЩЖ на фоне висцерального ожирения и при физических нагрузках.

Для проведения экспериментальных исследований использовали модель висцерального ожирения у крыс, вызванного высококалорийной диетой, которая включала избыточное количество животных жиров и легкоусвояемых углеводов. Ранее в средствах массовой информации активно рекламировалась фруктоза как природный компонент ягод и фруктов, не приносящий вреда здоровью. Фруктоза не вызывает резкого повышения сахара в крови и не стимулирует выработку инсулина, что нарушает ее усвоение и увеличивает риск развития жирового гепатоза [11]. В настоящее время исследователи часто используют экспериментальную модель метаболического синдрома, основанную на потреблении повышенного количества жиров и фруктозы [12, 13], что определило выбор диеты.

Цель работы – изучение морфо-функционального состояния ЩЖ при диет-индуцированном висцеральном ожирении и вариантах его немедикаментозной коррекции у самок крыс линии Wistar.

Материалы и методы исследования. Опыты проводились на половозрелых самках крыс линии Wistar ($n = 84$). Животные были введены в эксперимент в возрасте 2 месяцев с массой тела 180–200 г. На I этапе эксперимента крысы были случайным образом разделены на 2 основные группы: одни содержались на стандартной диете вивария («СтД» – контроль, $n = 28$), другие получали высококалорийную диету («ВКД», $n = 56$) в течение 8 недель. На II этапе эксперимента животные были дополнительно разделены на подгруппы с подключением физических нагрузок и переходом от ВКД на СтД в течение следующих 8 недель. Контрольная группа была разделена на 2 подгруппы: «СтД» (контроль, $n = 14$) и «СтД + бег» ($n = 14$). Группа «ВКД» была разделена на 4 подгруппы: «ВКД» ($n = 14$); «ВКД + бег» ($n = 14$); «ВКД/СтД» ($n = 14$); «ВКД/СтД + бег» ($n = 14$).

Животные находились в режиме 12/12-часового цикла день/ночь при температуре 22 ± 2 °C и влажности воздуха 60–65 %. Все манипуляции были согласованы с комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 02.02.2022) и соответствовали положениям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных целях (ETS N 123).

СтД соответствовала действующему ГОСТ 34566-219 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия». Норма для крысы – 55,0 г/181 ккал в день. Состав: сырой протеин (не менее 20,53 %), сырой жир (не более 4,05 %), сырая клетчатка (не более 4,49 %), витамины и микроэлементы в соответствии с нормативами ГОСТа. ВКД включала свиное сало, которое в соответствии с ГОСТом имеет калорийность 812 кКал/100 г продукта. Состав свиного сала: жиры – 88,69 г, белки – 2,92 г, углеводы – 0,00 г, вода – 7,69 г, минеральные вещества – 0,70 г на 100 г продукта.

В качестве ВКД использовался рацион, описанный в обзорной статье [14]. Диета включала дополнительное введение жиров животного происхождения (свиное сало) к СтД из расчета 45 % от суточной калорийности корма (81 ккал) и замещение воды на 10%-й раствор фруктозы в свободном доступе (*ad libitum*) [14]. Корм, входящий в состав ВКД, обеспечивал в среднем 262 ккал в день на крысу. Потребление раствора фруктозы рассчитывали на группу крыс, причем объем выпитого раствора колебался от 40 до 50 мл на крысу, что составляло в среднем от 16 до 20 ккал в день на крысу дополнительно к сухому корму. Потребление сухого корма оценивали ежедневно: в группе СтД корм поедался на 100 %, а в группе ВКД – на 80–90 % (210–236 ккал на крысу). Таким образом, калорийность ВКД составляла около 226–256 ккал в день на крысу.

Умеренные физические нагрузки осуществлялись в виде бега на тредмиле 5 дней в неделю в течение 20 мин со скоростью 15 м/мин в утреннее время (09:00–12:00) натошак [15]. Общая продолжительность тренировок составляла 8 недель. Массу тела крыс еженедельно измеряли на весах Saturn (Китай).

Выведение самок крыс из эксперимента проводили в утреннее время в фазе диэструса путем декапитации с предварительным введением тиопентала натрия. Фазу эстрального цикла определяли по типу клеток, содержащихся в вагинальном мазке крысы [16]. Проводили забор крови и тканей, взвешивание висцеральной жировой ткани (ВЖТ) на лабораторных весах Scout Pro (Китай). Массовый коэффициент (МК) ВЖТ рассчитывали по формуле:

$$\text{МК} = (\text{масса органа/масса тела}) \times 100 \, \%.$$

Содержание Т4 и Т3 в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов «ХЕМА» (Россия). Биохимические показатели в сыворотке крови и гомогенатах ЩЖ (разведение 1 : 80 в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4) определяли на биохимическом автоматическом анализаторе BS-200 (Mindray, Китай) с использованием коммерческих наборов «Диасенс» (Республика Беларусь). В гомогенатах ЩЖ определяли малоновый диальдегид (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрическим методом [17]. Активность тиреопероксидазы (ТПО) оценивали по реакции окисления йодида в присутствии перекиси водорода [18] на спектрофлуориметре SOLAR CM2203 (Республика Беларусь).

При некропии у животных извлекали ЩЖ для морфологического исследования. Фрагменты ее ткани подвергали быстрой заморозке в криостате HM 525 (Microm, Германия). Криостатные срезы толщиной 7 мкм для обзорной характеристики структуры окрашивали гематоксилин-эозином. Исследование микропрепаратов, морфометрию и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа Альтами LUM-1 (Альтами, Россия), оснащенного цифровой фотокамерой 1300D EOS Body (Canon, Япония).

Морфометрия оцифрованных изображений осуществлялась с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США) при помощи инструментов пункта меню Analyze. В фолликулах ЩЖ, подсчитанных в десяти полях зрения при увеличении $\times 400$ после калибровки, проводили измерение площади фолликулов в мкм^2 , внутреннего диаметра фолликулов и высоты фолликулярного эпителия – в мкм. Калибровка фотографий среза в мкм проводилась через встроенную функцию Set Scale. В подменю Set Measurements выставлялись флажки напротив пунктов списка выбора (Area), что позволяло получать данные о площадях фолликулов. Линейные размеры определяли при помощи инструмента Straight с верхней панели инструментов, площади изучаемых объектов – при помощи инструмента Freehand selection. Средний внутренний диаметр фолликулов определяли путем деления пополам суммы наибольшего и наименьшего диаметров. Для установления средней высоты железистого эпителия измеряли высоту клеток выстилки каждого измеренного фолликула. Индекс накопления коллоида (ИНК) вычисляли как отношение внутреннего диаметра фолликула к удвоенной высоте фолликулярного эпителия.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Учитывая характер распределения значений по *W*-критерию Шапиро – Уилка, применяли параметрические либо непараметрические методы статистики. Результаты выражали в виде средней величины и средней стандартной ошибки ($M \pm SEM$) либо в виде медианы и процентилей ($Me (25; 75)$) соответственно. Статистическую значимость межгрупповых отличий оценивали с помощью дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post-hoc* анализом по *F*-критерию Фишера, если распределение значений носило нормальный характер, либо по *H*-критерию Краскела – Уоллиса с последующими апостериорными сравнениями при ненормальном распределении. Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе эксперимента наблюдалась возрастная динамика нарастания массы тела у самок крыс всех групп, при этом на завершающей стадии исследования статистически значимые отличия по массе тела у животных различных групп отсутствовали.

Масса ВЖТ у животных в группах «СтД» и «СтД + бег» составила 7,57 (5,82; 10,00) и 7,62 (4,36; 9,17) г, а в группах «ВКД» и «ВКД + бег» – 19,30 (9,38; 23,47) и 19,80 (13,49; 23,64) г, что свидетельствует о ее достоверном нарастании в 2,5 и 2,6 раза соответственно по сравнению с группами сбалансированного питания. МК ВЖТ также был существенно повышен в группах

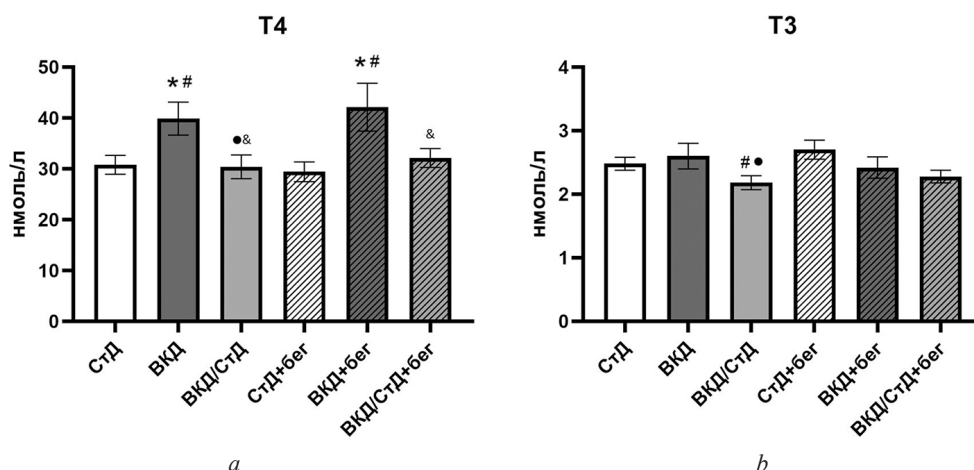


Рис. 1. Концентрация тиреоидных гормонов в сыворотке крови экспериментальных животных: *a* – тироксина (T4); *b* – трийодтиронина (T3). Значимость отличий ($p < 0,05$) от групп «СтД» (*), «ВКД» (•), «СтД + бег» (#), «ВКД + бег» (&)

Fig. 1. Concentration of thyroid hormones in the blood serum of experimental animals: *a* – thyroxine (T4); *b* – triiodothyronine (T3). Significance of differences ($p < 0,05$) in the groups “StD” (*), “HCD” (•), “StD + running” (#), “HCD + running” (&)

«ВКД» и «ВКД + бег» в 2,3 и 2,6 раза по сравнению с контролем. Развитие висцерального диет-индуцированного ожирения у самок крыс констатировали при нарастании массы ВЖТ более чем в 2 раза по сравнению с контролем. У животных из групп коррекции ожирения «ВКД/СтД» и «ВКД/СтД + бег» вышеуказанные масс-метрические показатели были равнозначны контрольным значениям.

У самок крыс из групп «ВКД» и «ВКД + бег» обнаружено статистически значимое повышение уровня T4 в сыворотке крови (на 29,5 и 36,9 % соответственно) по отношению к животным из группы «СтД» (рис. 1, *a*). У крыс из групп с коррекцией диеты «ВКД/СтД» и «ВКД/СтД + бег» содержание T4 в сыворотке крови достоверно снижалось по сравнению с крысами, получавшими ВКД, и находилось в пределах контрольных значений. Концентрация T3 в сыворотке крови была статистически значимо снижена только в группе «ВКД/СтД» (на 16,2 %) по сравнению с «ВКД» (рис. 1, *b*). Ранее нами было показано, что при 16-недельной ВКД у крыс нарастает концентрация ТТГ и T4 в сыворотке крови, а также повышается активность 5'-дейодиназы 1 типа (DI-1) в печени [19]. Как известно, DI-1 катализирует реакцию отщепления йода от прогормона T4 и превращение его в активный гормон T3 [20]. Совокупность этих данных (повышение уровня ТТГ и T4 в крови, а также активности DI-1 в печени) при висцеральном ожирении у крыс демонстрирует адаптивные сдвиги тиреоидного статуса, направленные на активацию метаболизма в условиях 16-недельного избыточного питания. Известно, что фолликулы ЩЖ хранят в себе большие запасы тиреоидных гормонов, которые могут поступать в кровь под влиянием ТТГ [21].

Как показано на рис. 2, *a*, активность ТПО в ткани ЩЖ у самок крыс при висцеральном диет-индуцированном ожирении снижалась по сравнению с контролем на 26,5 % в группе «ВКД» и на 18,7 % – в группе «ВКД + бег». На фоне сниженной активности ТПО зарегистрировано уменьшение содержания МДА в ткани ЩЖ в группах «ВКД» (на 36,0 %) и «ВКД + бег» (на 40,0 %) по отношению к контролю (рис. 2, *b*). Снижение содержания МДА в ткани ЩЖ у крыс с висцеральным ожирением может косвенно свидетельствовать о подавлении продукции H_2O_2 на апикальной мембране тироцитов. Следует учитывать, что активность ТПО напрямую зависит от концентрации H_2O_2 в среде, так как фермент приобретает активную форму только в окисленном состоянии [22].

При переходе с 8-недельной ВКД на стандартное питание («ВКД/СтД») значения активности ТПО и содержания МДА в ткани ЩЖ возвращались к норме. При комплексной коррекции

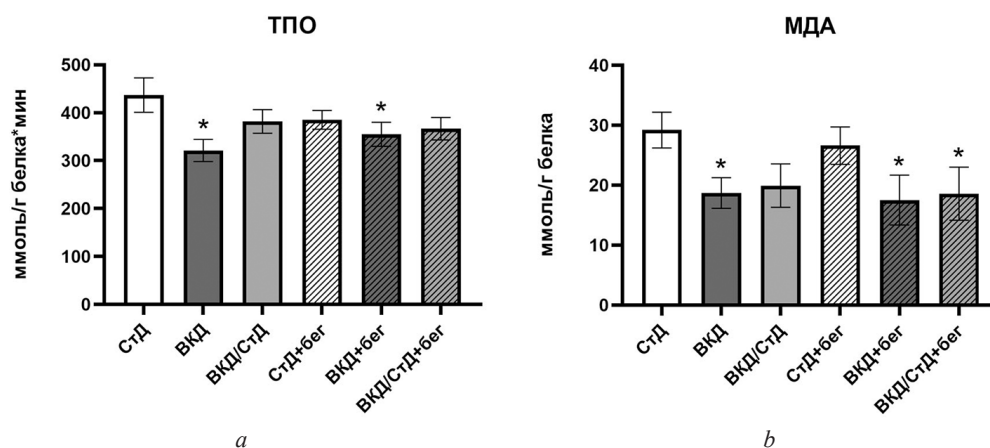


Рис. 2. Биохимические показатели ткани ЩЖ экспериментальных животных: *a* – активность ТПО; *b* – содержание МДА. Значимость отличий ($p < 0,05$) от групп «СтД» (*)

Fig. 2. Biochemical indices of thyroid tissue of experimental animals: *a* – TPO activity; *b* – MDA content. Significance of differences ($p < 0.05$) from the “StD” groups (*)

ожирения («ВКД/СтД + бег») активность ТПО приходила в норму, хотя при этом сохранялся несколько сниженный уровень МДА (рис. 2).

По результатам биохимического анализа в гомогенатах ткани ЩЖ у крыс группы «ВКД + бег» было зарегистрировано статистически значимое увеличение концентрации триглицеридов, в 2,8 раза превосходящее таковое в группе «СтД + бег» (рис. 3, *a*). Существует мнение, что снижение активности ТПО в ткани ЩЖ может быть связано с липотоксичностью [23], что согласуется и с нашими данными по нарастанию уровня ТГ в ткани ЩЖ при висцеральном ожирении. В ткани ЩЖ у крыс группы «СтД+ бег» отмечено снижение уровня общего холестерина на 15,9 % по отношению к контролю (рис. 3, *b*). В целом следует отметить, что у крыс группы «СтД + бег» были зарегистрированы наиболее низкие уровни триглицеридов и общего холестерина в ткани ЩЖ, которые статистически значимо отличались от групп «ВКД + бег» и «СтД» соответственно.

При содержании самок крыс на стандартном рационе питания гистологическая картина ЩЖ соответствовала физиологической норме (рис. 4, *a*). Выявлено хорошо развитое фолликулярное строение. Фолликулы преимущественно округлой формы, выстланы однослойным кубическим эпителием. На периферии железы фолликулы имели более крупные размеры, чем в центральной

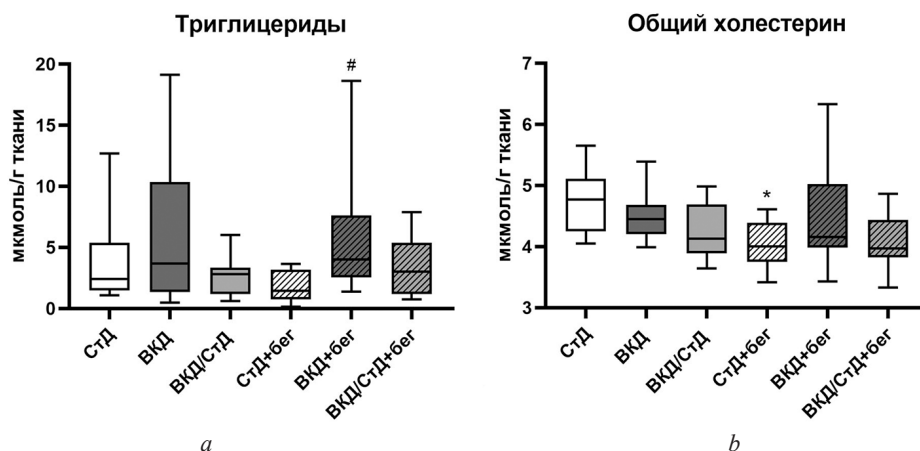


Рис. 3. Биохимические показатели ткани ЩЖ экспериментальных животных: *a* – концентрация триглицеридов; *b* – содержание общего холестерина. Значимость отличий ($p < 0,05$) от групп «СтД» (*), «СтД + бег» (#)

Fig. 3. Biochemical indices of thyroid tissue of experimental animals: *a* – concentration of triglycerides; *b* – content of total cholesterol. Significance of differences ($p < 0.05$) from groups “StD” (*), “StD + running” (#)

части. В полости фолликула содержался коллоид. Между фолликулами наблюдались интерфолликулярные островки.

У самок крыс после 16-недельного содержания на ВКД сохранилось дольчатое строение органа. Выявлено существенное увеличение размеров фолликулов с накоплением в них коллоида и уплощением тироцитов (рис. 4, *b*). Также наблюдалась умеренная диффузная воспалительная инфильтрация. В соединительно-тканых перегородках и вблизи сосудов обнаруживались крупные липидные включения. По данным морфометрического исследования выявлено статистически значимое увеличение площади фолликулов на 73,3 %, их внутреннего диаметра – на 36,6 % и индекса накопления коллоида (ИНК) – в 1,9 раза по отношению к контролю. Высота фолликулярного эпителия была снижена на 24,0 % (таблица). Описанные гистологические и морфометрические изменения характерны для гипофункции органа, что согласуется со снижением активности ТПО при ВКД у крыс (рис. 2, *a*).

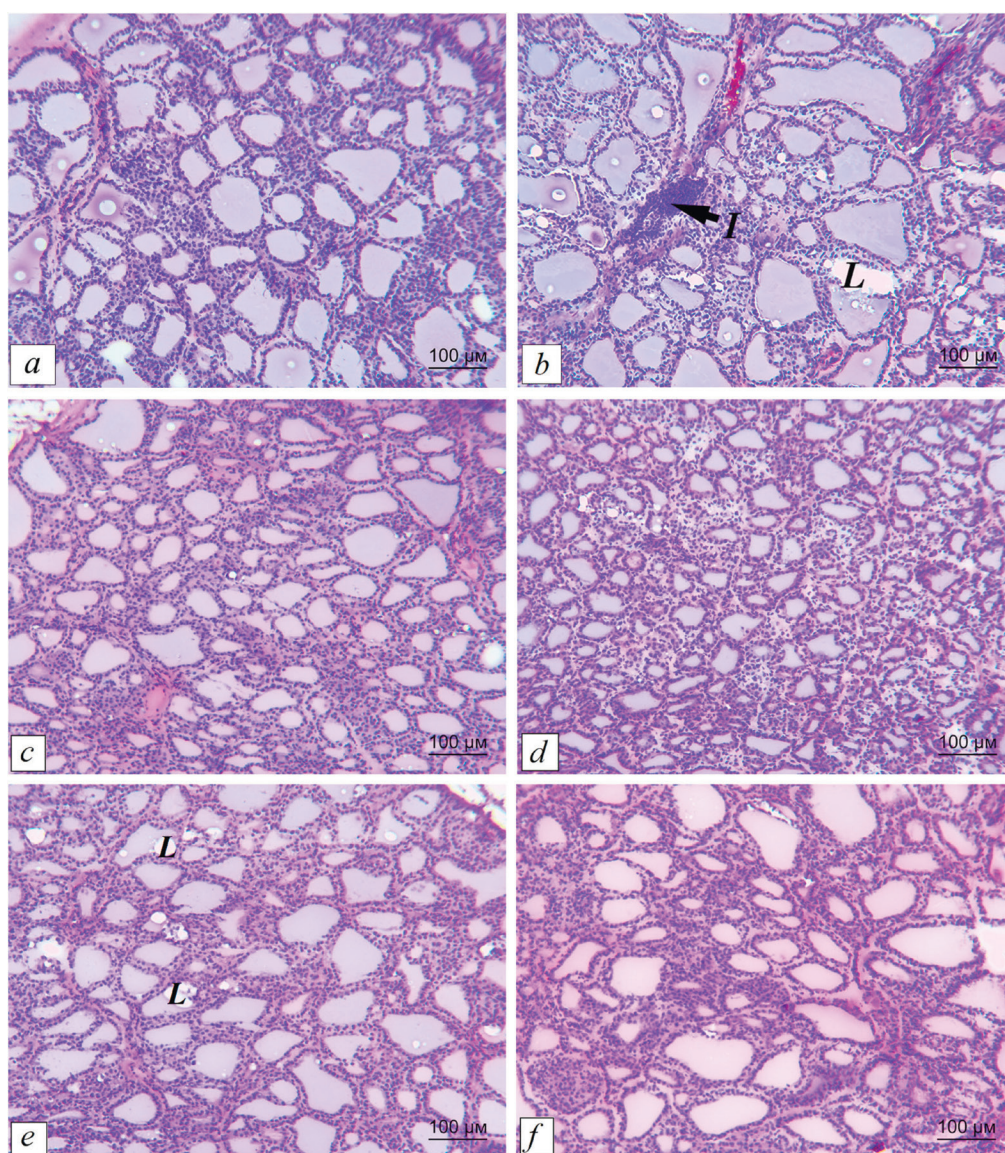


Рис. 4. Гистоструктура ЩЖ самок крыс: *a* – «СтД»; *b* – «ВКД»; *c* – «ВКД/СтД»; *d* – «СтД + бег»; *e* – «ВКД + бег»; *f* – «ВКД/СтД + бег». *I* – очаговая воспалительная инфильтрация; *L* – липидные включения. Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение – $\times 100$

Fig. 4. Histostructure of the thyroid gland of female rats: *a* – “StD”; *b* – “HCD”; *c* – “HCD/StD”; *d* – “StD + running”; *e* – “HCD + running”; *f* – “HCD/StD + running”. *I* – focal inflammatory infiltration; *L* – lipid inclusions. Staining: hematoxylin-eosin. Magnification – $\times 100$

После перехода с 8-недельной ВКД на стандартный рацион вивария («ВКД/СтД») отмечалось значительное восстановление гистоархитектоники ЩЖ (рис. 4, *c*). Выявлено хорошо выраженное фолликулярное строение. Фолликулы центральной части имели небольшие размеры, по периферии располагались более крупные фолликулы, выстланные кубическим эпителием. Коллоид в ряде случаев имел неоднородную консистенцию. Также наблюдалась слабо выраженная диффузная лимфоцитарная инфильтрация. Площадь фолликулов, их диаметр, высота тироцитов и ИНК не отличались от показателей самок крыс в группе контроля (СтД) (таблица). Нормализация морфометрических показателей ЩЖ соответствовала восстановлению исходной активности ТПО и оптимального уровня МДА (рис. 2).

У крыс, находившихся на стандартном рационе питания и бегавших на тредмиле в течение 8 недель («СтД + бег»), общая архитектура органа не была нарушена (рис. 4, *d*). Наблюдалось хорошо развитое фолликулярное строение с четкими тонкими соединительнотканными перегородками. При этом фолликулы мелкого размера были выстланы однослойным кубическим, иногда уплощенным, эпителием. Полости фолликулов заполнены коллоидом. Между фолликулами располагались интерфолликулярные островки. Выявлено статистически значимое уменьшение площади фолликулов на 28,7 % и высоты фолликулярного эпителия на 29,4 %, ИНК увеличен в 1,4 раза по отношению к контролю (таблица). Уменьшение размеров фолликулов может указывать на повышение функциональной активности ЩЖ и усиление пролиферативных процессов под влиянием умеренной физической нагрузки.

Морфометрические показатели ткани ЩЖ экспериментальных животных

Morphometric indices of thyroid tissue of the experimental animals

Группа	Показатель			
	Площадь фолликулов, мкм ²	Внутренний диаметр фолликулов, мкм	Высота фолликулярного эпителия, мкм	ИНК
без физических нагрузок				
«СтД»	2513,43 (1737,55; 3932,96)	39,84 (32,62; 51,49)	6,63 (6,15; 7,18)	2,95 (2,54; 3,83)
«ВКД»	4355,28 (2677,50; 6265,74)*#	54,41 (41,15; 74,41)*#	5,04 (4,65; 5,53)*	5,58 (4,27; 7,25)*#
«ВКД/СтД»	2541,66 (1924,64; 3703,44)*#	40,16 (35,46; 52,25)*	6,32 (5,72; 7,09)*#&	3,30 (2,77; 4,01)*#&
с физическими нагрузками				
«СтД + бег»	1791,28 (1316,78; 3051,53)*	39,67 (29,37; 50,55)	4,68 (4,12; 5,35)*	4,18 (3,24; 5,64)*
«ВКД + бег»	2525,41 (1585,86; 3810,48)*#	43,38 (31,94; 56,38)*	5,27 (3,79; 6,86)*#	4,35 (2,54; 6,45)*•
«ВКД/СтД + бег»	2694,90 (1849,83; 4145,36)*#	47,35 (36,76; 60,59)*#	6,55 (6,25; 7,08)*#&	3,55 (2,88; 4,68)*•

П р и м е ч а н и е. Данные представлены в виде Ме (25; 75). Значимость отличий ($p < 0,05$) от групп «СтД» (*), «ВКД» (•), «СтД + бег» (#), «ВКД + бег» (&).

У самок крыс группы «ВКД + бег» наблюдалось хорошо развитое фолликулярное строение органа, четко определялись тонкие соединительнотканые перегородки (рис. 4, *e*). Фолликулы были выстланы однослойным кубическим эпителием, высота которого была достоверно меньше контрольных значений на 20,5 %. В соединительно-тканых перегородках и вблизи сосудов обнаруживались крупные липидные включения. ИНК был увеличен в 1,4 раза по отношению к контролю. Площадь и внутренний диаметр фолликулов были статистически значимо снижены по сравнению с группой «ВКД» и соответствовали значениям контрольной группы животных

(таблица). Полученные данные указывают на частичное восстановление морфологической структуры ЩЖ по сравнению с крысами группы «ВКД», но при этом активность ТПО остается сниженной и не отличается от группы «ВКД» (рис. 2, *a*).

У крыс, перешедших после ВКД на стандартный рацион питания и бегавших на тредмиле в течение 8 недель («ВКД/СтД + бег»), наблюдалось существенное восстановление гистоструктуры органа (рис. 4, *f*). Фолликулы центральной части имели небольшие размеры, по периферии расположены более крупные фолликулы, имеющие округлую или угловатую форму. Фолликулы были выстланы однослойным кубическим эпителием. По данным морфометрии выявлено статистически значимое увеличение внутреннего диаметра фолликулов на 18,9 % и ИНК – на 20,3 % по сравнению с группой «СтД», но площадь фолликулов и высота тиреоидного эпителия не отличались от контроля (таблица). Восстановление гистоструктуры органа сопровождалось полной нормализацией активности ТПО, но не МДА (рис. 2, *a*).

В целом можно заключить, что сдвиги морфо-функциональных показателей ЩЖ, обусловленные ВКД, поддаются коррекции при переходе от ВКД к СтД. Подключение физических нагрузок, даже без изменения диеты, способствует нормализации морфометрических показателей – площади и внутреннего диаметра фолликулов. Следует отметить, что влияние ВКД и немедикаментозных вариантов коррекции ожирения на морфофункциональное состояние ЩЖ у самок крыс было сопоставимо с таковым у самцов [24].

Оценивая полученные результаты, следует обратить внимание на двоякие эффекты висцерального ожирения в отношении состояния тиреоидного статуса. С одной стороны, наблюдается адаптивный ответ, который осуществляется через воздействие лептина на гипоталамические центры и обеспечивает повышение синтеза тиротропин-релизинг гормона (ТРГ) и, соответственно, выброс ТТГ и Т4 в кровь [25]. Это является физиологической адаптацией к увеличению энергетических ресурсов, поступающих в организм. Такая адаптивная реакция тиреоидного статуса может осуществляться длительное время благодаря большим запасам Т4 и Т3, которые содержатся в коллоиде фолликулов ЩЖ [26]. Однако, как демонстрируют данные морфологических исследований, в структуре ЩЖ при висцеральном ожирении появляются признаки нарастающей гипофункции. Это подтверждается и биохимическими исследованиями, которые регистрируют снижение активности ТПО – ключевого фермента синтеза тиреоидных гормонов. Полученные данные указывают на то, что в перспективе, при истощении запасов Т4 и Т3 в фолликулах ЩЖ и снижении скорости синтеза тиреоидных гормонов (за счет ТПО), будет нарастать дефицит этих гормонов как в ЩЖ, так и в кровяном русле. Таким образом, при длительном избыточном питании и ожирении у крыс будут развиваться все классические признаки гипотиреоза (снижение уровня тиреоидных гормонов и повышение содержания ТТГ в крови). На начальных этапах развития ожирения тенденция к гипотиреозу компенсируется большими запасами тиреоидных гормонов в фолликулах ЩЖ [26].

Полученные результаты демонстрируют, что умеренные физические нагрузки в сочетании с нормализацией диеты способствуют восстановлению нарушенного при ВКД функционального состояния ЩЖ как по морфологическим, так и по биохимическим показателям у самок крыс линии Wistar.

Заключение. Проведенные исследования демонстрируют, что диет-индуцированное висцеральное ожирение у самок крыс вызывает повышение уровня тироксина в крови, однако при этом регистрируются морфологические признаки гипофункции органа, а также снижение активности ТПО и уровня МДА в ткани ЩЖ. Умеренные физические нагрузки на фоне ВКД положительно воздействуют на некоторые морфометрические характеристики ЩЖ, но не нормализуют сниженную активность ТПО. Сочетанная коррекция («ВКД/СтД + бег») диет-индуцированного висцерального ожирения у самок крыс приводит к восстановлению основных морфометрических и биохимических показателей, однако возврат к норме всех изучаемых параметров достигается только при переходе на стандартную диету.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Biondi, B. Subclinical Hypothyroidism in Patients with Obesity and Metabolic Syndrome: A Narrative Review / B. Biondi // *Nutrients*. – 2023. – Vol. 16, N 1. – Art. 87. – P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu16010087>
2. Нарушения липидного обмена при субклиническом гипотиреозе / Ю. П. Сыч, В. В. Фадеев, Г. А. Мельниченко [и др.] // *Проблемы Эндокринологии*. – 2004. – Т. 50, № 3. – С. 48–52. <https://doi.org/10.14341/probl11429>
3. Walczak, K. Obesity and Thyroid Axis / K. Walczak, L. Sieminska // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – Vol. 18, N 18. – Art. 9434. – P. 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189434>
4. Exercise intensity and its effects on thyroid hormones / F. Ciloglu, I. Peker, A. Pehlivan [et al.] // *Neuroendocrinology Letters*. – 2005. – Vol. 26, N 6. – P. 830–834.
5. Thyroid Function and Physical Activity: A Population-Based Cohort Study / O. H. Roa Dueñas, C. Koolhaas, T. Voortman [et al.] // *Thyroid*. – 2021. – Vol. 31, N 6. – P. 870–875. <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0517>
6. The effect of regular physical exercise on the thyroid function of treated hypothyroid patients: An interventional study at a tertiary care center in Bastar region of India / A. Bansal, A. Kaushik, C. M. Singh [et al.] // *Archives of Medicine and Health Sciences*. – 2015. – Vol. 3, N 2. – P. 244–246. <https://doi.org/10.4103/2321-4848.171913>
7. Effect of Aerobic Exercise on Thyroid Hormones and Quality of Life in Obese Postmenopausal Women / M. Fathi, M. Mosaferi Ziaaldini, S. Khairabadi, K. Hejazi // *Medical Laboratory Journal*. – 2018. – Vol. 12, N 6. – P. 5–11. <https://doi.org/10.29252/mlj.12.6.5>
8. Klasson, C. L. Daily physical activity is negatively associated with thyroid hormone levels, inflammation, and immune system markers among men and women in the NHANES dataset / C. L. Klasson, S. Sathir, H. Pontzer // *PLoS One*. – 2022. – Vol. 17, N 7. – Art. e0270221. – P. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270221>
9. Effect of physical exercise in people with hypothyroidism: systematic review and meta-analysis / I. Duñabeitia, D. González-Devesa, S. Varela-Martínez [et al.] // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 2023. – Vol. 83, N 8. – P. 523–532. <https://doi.org/10.1080/00365513.2023.2286651>
10. Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system / H. Patel, H. Alkhawam, R. Madanich [et al.] // *World Journal of Cardiology*. – 2017. – Vol. 9, N 2. – P. 134–138. <https://doi.org/10.4330/wjc.v9.i2.134>
11. Шептулина, А. Ф. Фруктоза и ее влияние на обмен веществ и риск развития неалкогольной жировой болезни печени / А. Ф. Шептулина, Ю. А. Голубева, О. М. Драпкина // *Доказательная гастроэнтерология*. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 85–92. <https://doi.org/10.17116/dokgastro20231201185>
12. Оценка показателей углеводного и липидного обмена у крыс в зависимости от вида высококалорийного питания / О. Г. Гилева, Е. Г. Бутолин, М. В. Терещенко, В. Г. Иванов // *Ожирение и метаболизм*. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 47–52. <https://doi.org/10.14341/omet12712>
13. Особенности моделирования жирового гепатоза у крыс разного возраста на основе высококалорийного рациона / Р. В. Янко, Е. Г. Чака, А. С. Зинченко [и др.] // *Ожирение и метаболизм*. – 2021. – Т. 18, № 4. – С. 387–397. <https://doi.org/10.14341/omet12789>
14. Experimental models of metabolic syndrome in rats / S. Gancheva, M. Zhelyazkova-Savova, B. Galunska, T. Chervenkov // *Scripta Scientifica Medica*. – 2015. – Vol. 47, N 2. – P. 14–21. <http://dx.doi.org/10.14748/ssm.v47i2.1145>
15. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats / R. Wang, H. Tian, D. Guo [et al.] // *Journal of Sport and Health Science*. – 2020. – Vol. 9, N 3. – P. 211–227. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.09.008>
16. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test / F. K. Marcondes, K. J. Miguel, L. L. Melo, R. C. Spadari-Bratfisch // *Physiology & Behavior*. – 2001. – Vol. 74, N 4–5. – P. 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00593-5)
17. Стальная, И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии* / М. И. Турков, Г. И. Климова, Г. А. Давыдова [и др.]; под ред. акад. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
18. Митюкова, Т. А. Определение активности тиреопероксидазы в ткани щитовидной железы (экспериментальное исследование) / Т. А. Митюкова, Е. Н. Чудиловская, А. С. Мигалевич // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 285–293. <https://doi.org/10.34883/PL.2020.9.3.009>
19. Митюкова, Т. А. Активность 5'-дейодиназы йодотиронина I типа в печени у крыс, получающих высококалорийную диету (экспериментальное исследование) / Т. А. Митюкова, Е. Н. Чудиловская, А. А. Басалай // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 60–68. <https://doi.org/10.34883/PL.2022.11.1.016>
20. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences / B. Gereben, A. Zeöld, M. Dentice [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65, N 4. – P. 570–590. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7396-0>
21. Chawla, S. The Anatomy and Physiology of Laboratory Rat / S. Chawla, S. Jena // *Essentials of Laboratory Animal Science: Principles and Practices*. – 2021. – P. 187–209. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0987-9_9
22. Carvalho, D. P. Thyroid hormone biosynthesis and release / D. P. Carvalho, C. Dupuy // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2017. – Vol. 458. – P. 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.038>
23. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats / S.-S. Shao, Y.-F. Zhao, Y.-F. Song, C. Xu [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2014. – Vol. 35, N 11. – P. 1411–1420. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.82>

24. Морфологические и функциональные характеристики щитовидной железы при диет-индуцированном ожирении и его коррекции у крыс самцов Вистар / Т. А. Митюкова, Т. Е. Кузнецова, А. А. Басалай [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67, № 4. – С. 47–55. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.47-55>
25. Kwon, O. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons / O. Kwon, K. W. Kim, M.-S. Kim // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2016. – Vol. 73, N 7. – P. 1457–1477. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2133-1>
26. Shahid, M. A. Physiology, Thyroid Hormone / M. A. Shahid, M. A. Ashraf, S. Sharma. – Treasure Island (FL): StatPearls Publ. [Internet], 2025. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/> (date of access: 10.08.2025).

References

1. Biondi B. Subclinical Hypothyroidism in Patients with Obesity and Metabolic Syndrome: A Narrative Review. *Nutrients*, 2023, vol. 16, no. 1, art. 87, pp. 1–13. <https://doi.org/10.3390/nul16010087>
2. Sych Yu. P., Fadeev V. V., Mel'nichenko G. A., Syrkin A. L., Roitman A. P. Disorders of lipid metabolism in subclinical hypothyroidism. *Problemy Endokrinologii* [Problems of Endocrinology], 2004, vol. 50, no. 3, pp. 48–52 (in Russian). <https://doi.org/10.14341/probl11429>
3. Walczak K., Sieminska L. Obesity and Thyroid Axis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, vol. 18, no. 18, art. 9434, pp. 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189434>
4. Ciloglu F., Peker I., Pehlivan A., Karacabey K., Ilhan N., Saygin O., Ozmerdivenli R. Exercise intensity and its effects on thyroid hormones. *Neuroendocrinology Letters*, 2005, vol. 26, no. 6, pp. 830–834.
5. Roa Dueñas O. H., Koolhaas C., Voortman T., Franco O. H., Ikram M. A., Peeters R. P., Chaker L. Thyroid Function and Physical Activity: A Population-Based Cohort Study. *Thyroid*, 2021, vol. 31, no. 6, pp. 870–875. <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0517>
6. Bansal A., Kaushik A., Singh C. M., Sharma V., Singh H. The effect of regular physical exercise on the thyroid function of treated hypothyroid patients: An interventional study at a tertiary care center in Bastar region of India. *Archives of Medicine and Health Sciences*, 2015, vol. 3, no. 2, pp. 244–246. <https://doi.org/10.4103/2321-4848.171913>
7. Fathi M., Mosafari Ziaaldini M., Khairabadi S., Hejazi K. Effect of Aerobic Exercise on Thyroid Hormones and Quality of Life in Obese Postmenopausal Women. *Medical Laboratory Journal*, 2018, vol. 12, no. 6, pp. 5–11. <https://doi.org/10.29252/mlj.12.6.5>
8. Klasson C. L., Sathir S., Pontzer H. Daily physical activity is negatively associated with thyroid hormone levels, inflammation, and immune system markers among men and women in the NHANES dataset. *PLoS One*, 2022, vol. 17, no. 7, art. e0270221, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270221>
9. Duñabeitia I., González-Devesa D., Varela-Martínez S., Diz-Gómez J. C., Ayán-Pérez C. Effect of physical exercise in people with hypothyroidism: systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2023, vol. 83, no. 8, pp. 523–532. <https://doi.org/10.1080/00365513.2023.2286651>
10. Patel H., Alkhwam H., Madanieh R., Shah N., Kosmas C. E., Vittorio T. J. Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. *World Journal of Cardiology*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 134–138. <https://doi.org/10.4330/wjc.v9.i2.134>
11. Sheptulina A. F., Golubeva Yu. A., Drapkina O. M. Fructose consumption as a risk factor for metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Dokazatel'naya gastroenterologiya* [Russian Journal of evidence-based Gastroenterology], 2023, vol. 12, no. 1, pp. 85–92 (in Russian). <https://doi.org/10.17116/dokgastro20231201185>
12. Gileva O. G., Butolin E. G., Tereshchenko M. V., Ivanov V. G. Evaluation of indicators of carbohydrate and lipid metabolism in rats depending on the type of high-calorie diet. *Ozhirenie i metabolizm* [Obesity and metabolism], 2022, vol. 19, no. 1, pp. 47–52 (in Russian). <https://doi.org/10.14341/omet12712>
13. Yanko R. V., Chaka E. G., Zinchenko A. S., Safonov S. L., Levashov M. I. Features of modeling fatty liver disease in rats of different ages based on a high-calorie diet. *Ozhirenie i metabolizm* [Obesity and metabolism], 2021, vol. 18, no. 4, pp. 387–397 (in Russian). <https://doi.org/10.14341/omet12789>
14. Gancheva S., Zhelyazkova-Savova M., Galunska B., Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Scientifica Medica*, 2015, vol. 47, no. 2, pp. 14–21. <http://dx.doi.org/10.14748/ssm.v47i2.1145>
15. Wang R., Tian H., Guo D., Tian Q., Yao T., Kong X. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *Journal of Sport and Health Science*, 2020, vol. 9, no. 3, pp. 211–227. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.09.008>
16. Marcondes F. K., Miguel K. J., Melo L. L., Spadari-Bratfisch R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, 2001, vol. 74, no. 4–5, pp. 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00593-5)
17. Stal'naya I. D., Garishvili T. G. Method for the determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. *Sovremennye metody v biokhimi* [Modern methods in biochemistry], Moscow, 1977, pp. 66–68 (in Russian).
18. Mityukova T. A., Chudilovskaya E. N., Migalevich A. S. Determination of Thyroid Peroxidase Activity in the Thyroid Tissue of Rats (Experimental Study). *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa* [Laboratory diagnostics. Eastern Europe], 2020, vol. 9, no. 3, pp. 285–293 (in Russian). <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.3.009>
19. Mityukova T. A., Chudilovskaya E. N., Basalai A. A. Activity of Type I Iodothyronine 5'-Deiodinase in the Liver in Rats Receiving a High-Calorie Diet (Experimental Study). *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa* [Laboratory diagnostics. Eastern Europe], 2022, vol. 11, no. 1, pp. 60–68 (in Russian). <https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.1.016>
20. Gereben B., Zeöld A., Dentice M., Salvatore D., Bianco A. C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, vol. 65, no. 4, pp. 570–590. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7396-0>

21. Chawla S., Jena S. The Anatomy and Physiology of Laboratory Rat. *Essentials of Laboratory Animal Science: Principles and Practices*, 2021, pp. 187–209. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0987-9_9
22. Carvalho D. P., Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, vol. 458, pp. 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.038>
23. Shao S.-S., Zhao Y.-F., Song Y.-F., Xu C., Yang J.-M., Xuan S.-M., Yan H. L., Yu C.-X., Zhao M., Xu J., Zhao J.-J. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, vol. 35, no. 11, pp. 1411–1420. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.82>
24. Mityukova T. A., Kuznetsova T. E., Basalai A. A., Chudilovskaya E. N., Polulyakh O. E., Shcherbakov Ya. V., Khru-staleva T. A. Morphological and functional characteristics of the thyroid gland in diet-induced obesity and its correction in male Wistar rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* [Pathological Physiology and Experimental Therapy], 2023, vol. 67, no. 4, pp. 47–55 (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.04.47-55>
25. Kwon O., Kim K. W., Kim M.-S. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, vol. 73, no. 7, pp. 1457–1477. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2133-1>
26. Shahid M. A., Ashraf M. A., Sharma S. *Physiology, Thyroid Hormone*. Treasure Island (FL), StatPearls Publ. [Internet], 2025. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/> (accessed 10.08.2025).

Информация об авторах

Митюкова Татьяна Алексеевна – канд. биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mityukovat@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0009-7503-6634>

Басалай Анастасия Александровна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1878-9623>

Кузнецова Татьяна Евгеньевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tania_k@mail.ru. <https://orcid.org/0009-0002-5348-9949>

Полулях Ольга Евгеньевна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oilipol@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0004-9884-2122>

Костюченко Никита Сергеевич – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nkostuchenko888@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0000-9121-6680>

Information about the authors

Tatyana A. Mityukova – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Chief Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mityukovat@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0009-7503-6634>

Anastasia A. Basalai – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1878-9623>

Tatyana E. Kuznetsova – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tania_k@mail.ru. <https://orcid.org/0009-0002-5348-9949>

Olga Y. Poluliakh – Senior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oilipol@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0004-9884-2122>

Mikita S. Kastsichenka – Junior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nkostuchenko888@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0000-9121-6680>