



ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

Издается с января 1969 г.
(до 2017 г. – под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»)

Выходит три раза в год

1

2017

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор	СИДОРОВ А. В. – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: sidorov@bsu.by
Заместитель главного редактора	ДЕМИДЧИК В. В. – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Ответственный секретарь	Храмцова Е. А. – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru
Гельтман Д. В.	Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Давыденко О. Г.	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Зинченко А. И.	Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Кильчевский А. В.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А.	Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Медведев С. С.	Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Решетников В. Н.	Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Семак И. В.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Титок М. А.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief	SIDOROV A. V. , doctor of science (biology), docent; professor at the department of human and animal physiology of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: sidorov@bsu.by
Deputy editor-in-chief	DEMIDCHIK V. V. , doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Executive secretary	KHRAMTSOVA E. A. , PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru
Geltman D. V.	V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Davydenko O. G.	Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Zinchenko A. I.	Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kilchevsky A. V.	National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kulchitsky V. A.	Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Medvedev S. S.	Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Reshetnikov V. N.	Central Botanical Garden, Minsk, Belarus.
Semak I. V.	Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Titok M. A.	Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A.	National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.

Физиология и клеточная биология

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

УДК 577.33/.34;577.355;577.3.32/.36

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ХИМИЧЕСКИХ ФИЛЬТРОВ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

А. АЛБУХАЙДАР¹⁾, А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности использования различных растительных полифенольных соединений в качестве химических фильтров ультрафиолетового излучения диапазонов А и В. Для расчета эффективности солнцезащитного действия регистрировали спектры поглощения разбавленных растворов растительных полифенольных соединений и определяли величину оптической плотности в области 290–400 нм. Установлено, что у большинства исследованных соединений эффективность солнцезащитного действия сравнима или даже превышает эффективность солнцезащитного действия стандартного химического фильтра – бензофенона-3, широко используемого в солнцезащитной косметике. Среди исследованных растительных полифенольных соединений выявлены устойчивые к воздействию ультрафиолетового излучения, а также соединения, в частности ресвератрол и халкон, которые разрушаются с образованием цитотоксических

Образец цитирования:

Албухайдар А., Потапович А. И., Костюк В. А. Количественная оценка эффективности природных полифенольных соединений как химических фильтров УФ-излучения // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 3–12.

For citation:

Albuhaydar A., Potapovich A. I., Kostyuk V. A. Quantity estimation of effectiveness of natural polyphenolic compounds as chemical UV-sunscreens. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 3–12 (in Russ.).

Авторы:

Ахмед Албухайдар – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Костюк.

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Ahmed Albuhaydar, postgraduate student at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

Alla Potapovich, PhD (biology); chief researcher at the science laboratory of physiology at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

Vladimir Kostyuk, doctor of science (chemistry); head of the laboratory of physiology at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

kostyuk@bsu.by

продуктов даже при кратковременном воздействии ультрафиолетового излучения. При моделировании повреждающего действия ультрафиолетового излучения на клетки кожи среди устойчивых к нему растительных полифенольных соединений выявлены такие, которые обладают эффективным цитопротекторным действием и представляют интерес как потенциальные компоненты солнцезащитных средств.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение; солнцезащитные средства; химические ультрафиолетовые фильтры; растительные полифенолы, кератиноциты.

QUANTITY ESTIMATION OF EFFECTIVENESS OF NATURAL POLYPHENOLIC COMPOUNDS AS CHEMICAL UV-SUNSCREENS

A. ALBUHAYDAR^a, A. I. POTAPOVICH^a, V. A. KOSTYUK^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: kostyuk@bsu.by

The aim of research was to quantify *in vitro* the effectiveness of plant polyphenols as chemical UV-sunscreens. Sun protection factor (SPF) of plant polyphenols (PPs) was determined on the base of spectrophotometric analysis of dilute solutions. Human keratinocytes (HaCaT) viability and proliferation were estimated using PrestoBlue™ reagent. UV-resistant sunscreens possessed very high SPF were found among PPs studied. These compounds effectively protected keratinocytes against UV-induced injury *in vitro*. We also found that some PPs e. g. resveratrol and chalcone were easily converted by UV-irradiation into extremely cytotoxic intermediates. Our data strongly suggest that PPs may be important component in cosmetic formulations for skin care and sun protection.

Key words: UV-irradiation; photoprotective compounds; chemical UV-sunscreens; plant polyphenols; keratinocytes.

Введение

Солнечный свет представляет собой электромагнитное излучение в широком диапазоне частот – от ультрафиолетового (УФ) до инфракрасного (ИК). Он абсолютно необходим для существования жизни на Земле, тем не менее избыточная солнечная радиация, в первую очередь ее ультрафиолетовый компонент, оказывает вредное воздействие на кожные покровы и организм человека в целом. Всю область УФ-излучения (УФИ) в медико-биологических исследованиях принято делить на три основных диапазона: УФС (длина световой волны 200–280 нм), УФВ (280–320 нм), УФА (320–400 нм) [1]. Практически весь диапазон УФС-излучения и большая часть УФВ-излучения поглощаются озоновым слоем стратосферы. Однако появление в последнее время так называемых озоновых дыр привело к тому, что доля этих наиболее опасных для человека видов излучения в общей солнечной радиации, достигающей поверхности Земли, существенно увеличилась. Воздействию избыточной солнечной радиации на человека способствует и увлечение пляжным отдыхом. Именно с этими причинами связывают резкое увеличение заболеваемости раком кожи, наблюдающееся в последнее время [1–3]. Одним из наиболее эффективных способов профилактики рака кожи является защита открытых участков тела от избыточного солнечного УФИ. С этой целью широко используются минеральные и органические химические вещества, которые подразделяются на физические (светоотражающие) и химические (светопоглощающие) солнцезащитные средства [4]. Физические УФ-протекторы – обычно микрочастицы минеральных веществ, отражающих солнечное излучение, например диоксид титана и оксид цинка, – считаются наиболее безопасными. Они не впитываются, действуют на коже подобно защитному экрану и не вызывают раздражения и аллергических реакций. Но средства, содержащие только минеральные фильтры, неводостойки и в большинстве случаев имеют сравнительно небольшой фактор защиты. Химические УФ-фильтры – это специально синтезированные вещества, которые поглощают ультрафиолетовое излучение, препятствуя проникновению солнечных лучей в кожу. Однако в результате последующих фотохимических реакций с участием органических фильтров могут образовываться канцерогенные и аллергенные интермедиаты [5]. Поэтому в различных научных центрах ведутся работы по поиску новых компонентов для нетоксичных и гипоаллергенных солнцезащитных композиций. В рамках этих исследований большой интерес представляют растительные полифенольные соединения (РПС). Данный интерес в значительной степени обусловлен тем обстоятельством, что физиологической функцией многих РПС как раз и является защита от воздействия УФИ, и эта функция реализуется благодаря тому, что они представляют собой эффективные химические фильтры, избирательно поглощающие вредное

излучение. В отличие от синтетических природные химические фильтры более безопасны, кроме того, они способны ингибировать клеточные и гуморальные реакции, развивающиеся в коже в результате воздействия солнечного УФ [6–8].

Цель настоящей работы – изучение эффективности фотопротекторного действия 16 природных полифенольных соединений в сравнении со стандартным химическим фильтром – бензофеноном-3, широко используемым в солнцезащитной косметике.

Материалы и методика исследований

В работе использовали коммерческие полифенольные соединения: кверцетин, морин, кемпферол, эпикатехин, рутин, силибин, *транс*-феруловую кислоту (*Sigma*, США); таксифолин, халкон, кризин, цианидин хлорид, леонтоподиевую кислоту, акацетин, байкалеин (*Extrasynthese*, Франция), ресвератрол (*Biomol*, США), бензофенон-3 (*Medena*, Швейцария). Вербаскозид, полученный из культивируемых клеток *Syringa vulgaris*, был любезно предоставлен доктором Roberto Dal Toso (*IRB S. r. l.*, *Altavilla Vicentina*, Италия).

Клеточную культуру кератиноцитов человека (линия HaCaT) выращивали в полной среде DMEM (*Sigma-Aldrich*, Германия) с высоким содержанием глюкозы, 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (ЭБС), раствором в концентрации 2 ммоль/л L-глутамин и антибиотиками (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂).

Эксперименты проводили в 96- и 24-луночных планшетах. Для посева в 96-луночные планшеты в лунку вносили 100 мкл клеточной суспензии ($0,5 \cdot 10^4$ клеток на лунку) в полной среде DMEM, в лунку 24-луночных планшетов – 1 мл аналогичной клеточной суспензии ($3 \cdot 10^4$ клеток на лунку). Непосредственно перед УФ-облучением среду в лунках заменяли на изотонический фосфатный буфер (ИФБ) с pH 7,4, содержащий исследуемые РПС, или соответствующий растворитель, используемый для приготовления исходных растворов РПС.

В качестве источника УФ-излучения использовали облучатель ультрафиолетовый ОУФк-05 (Россия), обеспечивающий в эффективном спектральном диапазоне (280–400 нм) интенсивность облучения на расстоянии 0,1 м не менее 25 Вт/м² при соотношении между УФА и УФВ 2 : 1. После облучения ИФБ заменяли на среду DMEM, не содержащую ЭБС, и клетки культивировались в течение 3; 6 или 24 ч при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂). Для регистрации оптических спектров поглощения использовали спектрофотометр Cary 50 Bio (*Varian*, США). Для приготовления исходных растворов (10 ммоль/л) исследуемых соединений, за исключением вербаскозида, леонтоподиевой кислоты и бензофенона, использовали диметилсульфоксид (DMCO), для растворения вербаскозида и леонтоподиевой кислоты применяли деионизированную воду, бензофенон-3 растворяли в изопропиловом спирте. Для регистрации спектров поглощения готовили соответствующие рабочие растворы (50 мкмоль/л) в ИФБ с pH 7,4.

Пролиферативную активность и жизнеспособность клеток определяли в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (*Invitrogen*, США), содержащий нефлуоресцентный компонент голубого цвета резазурин, который модифицируется жизнеспособными клетками в высокофлуоресцентное соединение красного цвета. Реагент PrestoBlue™ разводили в культуральной среде (1 : 9) и добавляли к клеткам в количестве 100 мкл на лунку. На каждом планшете для определения базового уровня флуоресценции оставляли лунки с культуральной средой без клеток. Флуоресценцию измеряли после инкубации в течение 1,5 ч при 37 °C, используя фильтр (Ex 560 ± 25 нм, Em 590 ± 10 нм).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*.

Результаты исследования и их обсуждение

Определение эффективности солнцезащитного действия природных полифенолов

Эффективность солнцезащитных средств оценивается величиной так называемого солнцезащитного фактора (SPF), который определяется путем деления энергии УФ, равной минимальной эритемной дозе (МЭД) для защищенной кожи, на энергию УФ, соответствующую МЭД на незащищенной коже [1]. На основании значений SPF можно определить, во сколько раз увеличивает продолжительность безопасного солнечного воздействия на кожу использование защитных средств. Существует межгосударственный стандарт, регламентирующий способ определения SPF для косметической продукции в соответствии с ISO 24444-2013. Это достаточно затратная, трудоемкая и длительная процедура, связанная с привлечением добровольцев. В связи с этим для предварительной оценки эффективности солнцезащитных средств широко используют методы *in vitro*, основанные на измерении поглощения или пропускания УФ-излучения пленками солнцезащитных продуктов на кварцевых пластинах или

их разбавленными растворами [9–14]. В настоящей работе для оценки солнцезащитных свойств исследованных соединений регистрировали их спектры поглощения и определяли величину оптической плотности в области 290–400 нм с шагом 5 нм. Для спектрофотометрирования использовали растворы с концентрацией РПС 50 мкмоль/л, которые для каждого соединения готовили в трех повторах. Для расчета значений SPF использовали апробированное в ряде работ [9; 13; 14] эмпирическое уравнение

$$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda), \quad (1)$$

где CF – поправочный коэффициент, равный 10; $EE(\lambda)$ – эритемный коэффициент при длине волны λ ; $Abs(\lambda)$ – значения оптической плотности анализируемого раствора при длине волны λ . Значения $EE \cdot I$ являются экспериментальными константами, определенными в [15].

Пример расчета SPF для бензофенона-3 с использованием (1) приведен в табл. 1. При оценке SPF солнцезащитных продуктов *in vitro* учитывали, что для спектрофотометрирования используют 0,02 % растворы, т. е. разводят в 5000 раз [9]. Таким образом, приведенное в табл. 1 значение SPF относится к условному крему с содержанием 250 ммоль/л бензофенона-3.

Таблица 1

Пример расчета значений SPF по результатам регистрации спектров поглощения для условного крема с содержанием 250 ммоль/л бензофенона-3

Table 1

Example of calculation of SPF value of cream with 250 mmol/l benzophenone-3 using data from the absorption spectra

Длина волны, нм	$EE \cdot I$	Abs	$EE \cdot I \cdot Abs$
290	0,015	0,611 5	0,009 2
295	0,081 7	0,589 7	0,048 2
300	0,287 4	0,534 7	0,153 7
305	0,327 8	0,487 1	0,159 7
310	0,186 4	0,455 9	0,085 0
315	0,083 7	0,443 1	0,037 1
320	0,018	0,437 7	0,007 9
$\sum_{290}^{320} EE \cdot I \cdot Abs$	–	–	0,500 7
$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE \cdot I \cdot Abs$	–	–	5,01

Аналогичным образом определяли SPF для всех исследованных соединений. По результатам трех независимых экспериментов находили среднее значение и стандартное отклонение, которые приведены в табл. 2. Обычно содержание действующих компонентов в солнцезащитных средствах приводится в единицах не молярной, а процентной концентрации. Поэтому в табл. 2 приведены также значения SPF для условного крема, содержащего 10 % исследованных соединений.

Определение коэффициента УФА/УФВ у природных полифенолов

Поскольку эритема является результатом воздействия УФВ-излучения, солнцезащитный фактор не может быть использован как индикатор защиты от УФА-излучения. А именно этот вид облучения играет главную роль в процессах фотостарения кожи и, как показывают последние исследования, способен активировать процессы, ведущие к развитию рака кожи [2; 3]. Для оценки фотопротекторного действия потенциальных косметических средств широко используют коэффициент УФА/УФВ, позволяющий судить о том, насколько эффективно исследуемое вещество поглощает УФ-излучение в области А по сравнению с поглощением в области В. Для расчета коэффициента УФА/УФВ в данной работе использовали следующее уравнение:

$$\text{УФА/УФВ} = 0,059 \cdot \sum_{320}^{400} \text{Abs}(\lambda)(\text{шаг } 5 \text{ нм}) / 0,125 \cdot \sum_{290}^{320} \text{Abs}(\lambda)(\text{шаг } 5 \text{ нм}), \quad (2)$$

где Abs(λ) – значения оптической плотности анализируемого раствора при длине волны λ ; 0,059 и 0,125 – коэффициенты, позволяющие учесть различие в количестве суммируемых значений Abs для УФ-диапазонов А и В. Значения, рассчитанные с помощью уравнения (2), приведены в табл. 2.

Определение устойчивости РПС, перспективных в качестве солнцезащитных к действию УФ-излучения

Поглощение ультрафиолетового излучения переводит молекулу химического фильтра в возбужденное состояние. Она может вернуться в основное состояние, при этом избыток энергии, принесенный квантом света, перейдет в тепловую энергию, а может подвергнуться дальнейшим физико-химическим превращениям или вступить в реакцию с другими молекулами, что потенциально опасно для клеток кожи. Поэтому необходимым этапом исследований, направленных на поиск эффективных солнцезащитных средств, является выяснение устойчивости потенциальных химических фильтров к воздействию УФ-излучения.

Таблица 2

Значения SPF и УФА/УФВ исследованных РПС

Table 2

SPF values and ratio of UVA/UVB of some plant polyphenols (PPs)

РПС	Молярная масса, г/моль	SPF при содержании в креме		УФА/УФВ
		250 ммоль/л	10 %	
Бензофенон-3	228	4,99 ± 0,10	8,75 ± 0,12	0,33
Таксифолин	304	6,38 ± 0,12	8,39 ± 0,14	0,46
Морин	302	2,63 ± 0,08	3,48 ± 0,12	1,70
Эпикатехин	290	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,04	0,25
Рутин	610	5,25 ± 0,13	3,44 ± 0,16	1,20
Халкон	208	8,15 ± 0,14	15,67 ± 0,17	0,32
Силибин	482	6,44 ± 0,14	5,34 ± 0,16	0,46
Кризин	254	1,62 ± 0,07	2,55 ± 0,07	0,96
Цианидин хлорид	323	4,93 ± 0,12	6,11 ± 0,15	0,52
Кемпферол	286	4,0 ± 0,15	5,59 ± 0,18	1,11
Ресвератрол	228	11,98 ± 0,11	21,02 ± 0,11	0,25
Вербаскозид	624	8,25 ± 0,09	5,29 ± 0,09	0,59
Леонтоподиевая кислота	697	11,83 ± 0,12	6,79 ± 0,12	0,51
Кверцетин	302	4,31 ± 0,10	5,71 ± 0,12	1,50
Феруловая кислота	194	7,15 ± 0,30	14,74 ± 0,60	0,18
Акацетин	284	4,86 ± 0,22	6,85 ± 0,19	0,77
Байкалеин	270	3,65 ± 0,12	5,41 ± 0,12	1,14

В настоящей работе для оценки фотоустойчивости РПС их разбавленные растворы (50 мкмоль/л) подвергали воздействию УФ-излучения различной продолжительности, используя медицинский ультрафиолетовый облучатель ОУФк-05. Для оценки влияния УФ-излучения на РПС регистрировали спектры поглощения в диапазоне 220–600 нм до облучения и через 1; 3; 20 и 40 мин облучения (дозы облучения – 0,15; 0,45; 3,0 и 6,0 Дж/см² соответственно). На основании полученных спектров вычисляли соответствующие значения SPF, приведенные в табл. 3.

Установлено, что облучение в течение 40 мин не оказывает влияния на спектры поглощения таксифолина, эпикатехина, рутина, силибина, цианидин хлорида, вербаскозида и байкалеина (см. табл. 3, рис. 1, а). Несколько менее устойчивы к воздействию УФ-излучения оказались бензофенон-3, кверцетин, леонтоподиевая кислота, кемпферол и морин. Причем в случае морина и кемпферола спектральные изменения в результате воздействия УФ-излучения затрагивали только область 320–420 нм (см. рис. 1, а, 1) и практически не влияли на величину рассчитанных значений SPF. В то же время кризин, акацетин, феруловая кислота и особенно халкон и ресвератрол претерпевают существенные структурные изменения уже после 1 мин воздействия УФ-излучения (суммарная доза облучения составляет 0,15 Дж/см²), о чем свидетельствуют выраженные спектральные изменения и уменьшение значений SPF (см. табл. 3, рис. 1, б).

Таблица 3

Влияние различных доз УФ-излучения на значения SPF РПС

Table 3

Effect of UV-irradiation on SPF values of PPs

РПС	Интенсивность облучения УФИ, Дж/см ²				
	0	0,15	0,45	3,0	6,0
Бензофенон-3	4,99 ± 0,10	4,38 ± 0,10	4,18 ± 0,10	4,20 ± 0,10	4,19 ± 0,10
Таксифолин	6,38 ± 0,12	Н/о*	Н/о	6,38 ± 0,12	6,39 ± 0,12
Морин	2,63 ± 0,08	Н/о	Н/о	2,62 ± 0,08	2,78 ± 0,08
Эпикатехин	0,10 ± 0,02	Н/о	Н/о	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Рутин	5,25 ± 0,13	Н/о	Н/о	5,25 ± 0,13	5,25 ± 0,13
Халкон	8,15 ± 0,14	3,49 ± 0,20	3,33 ± 0,20	3,09 ± 0,23	2,88 ± 0,24
Силибин	6,44 ± 0,14	6,41 ± 0,14	6,46 ± 0,14	6,45 ± 0,14	6,44 ± 0,14
Кризин	1,62 ± 0,07	1,24 ± 0,20	1,32 ± 0,20	1,17 ± 0,1	1,17 ± 0,1
Цианидин хлорид	4,93 ± 0,12	4,91 ± 0,12	4,91 ± 0,12	4,94 ± 0,12	4,93 ± 0,12
Кемпферол	4,0 ± 0,15	Н/о	3,97 ± 0,15	4,02 ± 0,15	4,1 ± 0,15
Ресвератрол	11,98 ± 0,11	4,81 ± 0,20	4,25 ± 0,20	4,93 ± 0,16	4,63 ± 0,10
Вербаскозид	8,25 ± 0,09	Н/о	Н/о	8,23 ± 0,12	8,26 ± 0,10
Леонтоподиевая кислота	11,83 ± 0,12	11,62 ± 0,22	11,48 ± 0,24	10,64 ± 0,24	10,07 ± 0,12
Кверцетин	4,31 ± 0,10	3,95 ± 0,20	3,79 ± 0,20	3,48 ± 0,20	3,16 ± 0,20
Феруловая кислота	7,34 ± 0,18	5,34 ± 0,09	3,91 ± 0,11	3,61 ± 0,13	3,74 ± 0,17
Акацетин	4,77 ± 0,10	3,61 ± 0,90	2,74 ± 1,00	2,19 ± 0,18	2,22 ± 0,10
Байкалеин	3,68 ± 0,15	3,63 ± 0,12	3,62 ± 0,13	3,69 ± 0,12	3,79 ± 0,12

*Показатель не определялся.

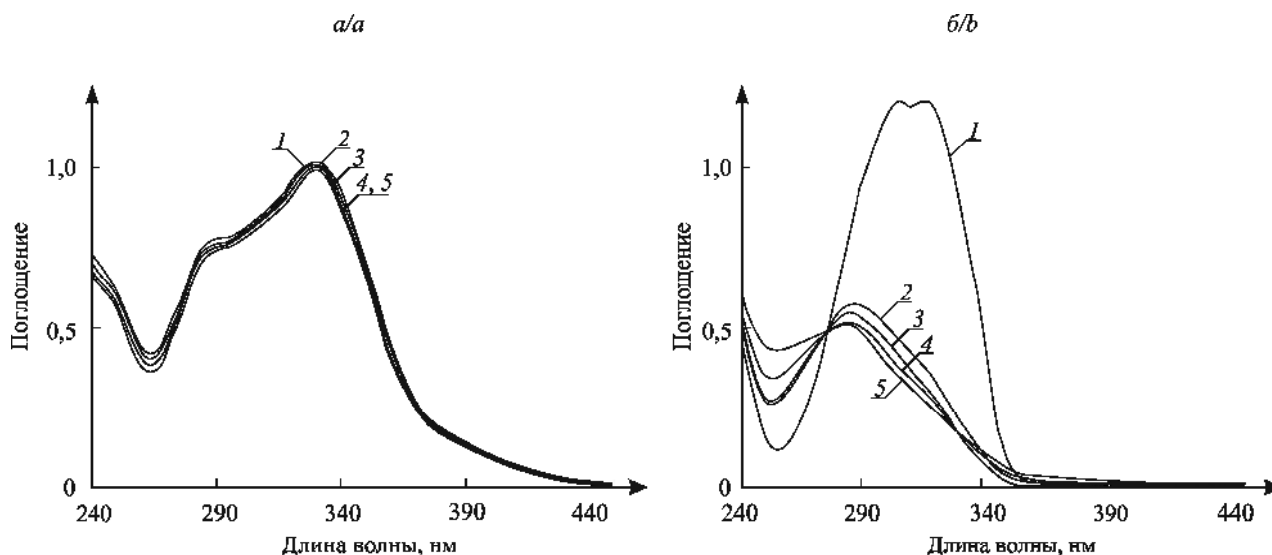


Рис. 1. Спектры поглощения вербаскозида, 50 мкмоль/л (а), и ресвератрола, 50 мкмоль/л (б), в 0,1 ммоль/л ИФБ (рН 7,4) до облучения (1) и через 1; 3; 20 и 40 мин облучения (2–5) (УФА : УФВ = 2 : 1, интенсивность облучения составляет 25 Вт/м²)

Fig. 1. UV-visible absorption spectra of 50 μmol/l verbascoside (a) and resveratrol (b) in 0.1 mmol/l potassium phosphate buffer (pH 7.4) recorded (1) prior to and (2–5) 1; 3; 20 and 40 min after solar-simulated irradiation (UVA : UVB = 2 : 1, irradiance 25 W/m²)

Определение сочетанного действия УФ-излучения и РПС на жизнеспособность клеток кожи линии HaCaT

Поскольку молекулы химического фильтра в возбужденном состоянии и образующиеся при их участии активные интермедиаты могут влиять на структурно-функциональное состояние клеток и ткани, в последующих экспериментах изучали влияние сочетанного воздействия УФ-излучения и РПС на культивируемые клетки кожи линии HaCaT. Установлено (табл. 4), что совместное действие

УФ-излучения (6 Дж/см²) с одним из устойчивых к УФ РПС, а именно таксифолином, рутином, силибином, вербаскозидом или байкалеином, в концентрации 50 мкмоль/л не оказывает влияния на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток, которые определяли, используя реактив PrestoBlue™. В этой группе РПС исключением составлял цианидин хлорид, который при совместном воздействии с УФ через 24 ч снижал количество функционально активных клеток почти в два раза. Влияние УФ на цитотоксичность фотолabileных полифенолов исследовали на примере халкона и ресвератрола. Установлено, что в результате сочетанного действия этих соединений с УФ через 24 ч количество жизнеспособных клеток снижается более чем на 70 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что используемая в этих экспериментах доза УФ, в отсутствие РПС, не оказывала цитотоксического действия на культивируемые клетки.

Таблица 4

**Влияние сочетанного УФ-излучения и РПС (50 мкмоль/л)
на жизнеспособность клеток кожи линии HaCaT через 24 ч после воздействия**

Table 4

**Mutual effect of UV-irradiation PPs (50 μmol/l) on HaCaT cell viability
24 h after administration**

Экспериментальные условия	Количество жизнеспособных клеток, % к контролю (n = 8)
Контроль	100 ± 6
Контроль + УФ, 6 Дж/см ²	97 ± 7
УФ совместно:	
с таксифолином	93 ± 8
рутином	97 ± 7
силибином	95 ± 5
вербаскозидом	94 ± 6
байкалеином	101 ± 5
бензофеноном-3	85 ± 8
феруловой кислотой	84 ± 6*
кверцетином	78 ± 8*
цианидин хлоридом	54 ± 9**
халконом	27 ± 5***
ресвератролом	27 ± 5***

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 vs контроль.

Для того чтобы оценить цитотоксическое действие РПС в отсутствие УФ, к культивируемым клеткам кожи линии HaCaT добавляли исследуемые соединения в ИФБ в концентрации 50 мкмоль/л, предварительно убрав культуральную среду. Через 40 мин ИФБ заменяли на среду без сыворотки и выдерживали клетки 24 ч в стандартных условиях, после чего определяли жизнеспособность и пролиферативную активность, используя реактив PrestoBlue™ (табл. 5).

Таблица 5

**Влияние 50 мкмоль/л РПС на жизнеспособность клеток
кожи линии HaCaT через 24 ч после воздействия**

Table 5

Effect of PPs (50 μmol/l) on HaCaT cell viability 24 h after administration

Экспериментальные условия	Количество жизнеспособных клеток, % к контролю (n = 8)
Контроль	100 ± 6
Контроль совместно:	
с бензофеноном-3	94 ± 8
феруловой кислотой	99 ± 7
кверцетином	98 ± 6
цианидин хлоридом	101 ± 6
ресвератролом	88 ± 9
халконом	75 ± 7*

*p < 0,01 vs контроль.

Из данных табл. 5 следует, что в использованной концентрации только халкон оказывал статистически достоверное влияние на исследуемый параметр, однако цитотоксический эффект был значительно меньше, чем при сочетанном воздействии халкона и УФИ.

Цитотоксическое действие сочетанного применения ресвератрола или халкона с УФИ подтверждено стандартным тестом на живые и мертвые клетки с использованием витальных флуоресцентных красителей – акридина оранжевого (АО) и этидиум бромид (ЭБ) (рис. 2).

Совместное действие РПС и УФИ, как видно на представленных на рис. 2 флуоресцентных микрофотографиях, приводит к повреждению и гибели клеток HaCaT (см. рис. 2, *г* – *и*), тогда как воздействие только УФ-излучения не оказывало существенного влияния на клетки (см. рис. 2, *б* и *в*). При этом тип клеточной гибели в результате воздействия УФИ и халкона преимущественно апоптотический. Уже через 3 ч после воздействия большой процент клеток, окрашенных только АО (живые), имеют на поверхности апоптотические пузырьки (см. рис. 2, *ж*), максимальное количество апоптотических клеток наблюдается через 6 ч после воздействия (см. рис. 2, *з*). В этот период появляются клетки, имеющие интенсивную красную флуоресценцию за счет окрашивания ядер ЭБ. Эти клетки могут быть как первично некротическими, так и находиться на терминальной стадии апоптоза. Наибольшее количество таких клеток наблюдается через 24 ч после воздействия (см. рис. 2, *и*). При совместном воздействии УФИ и ресвератрола (см. рис. 2, *г* – *е*) количество апоптотических клеток существенно меньше, что дает основание говорить о преимущественно некротическом пути клеточной гибели в этом случае.

Таким образом, при совместном воздействии УФИ и фотолабильных полифенолов образуются цитотоксические продукты, которые могут существенно снизить жизнеспособность кератиноцитов кожи.

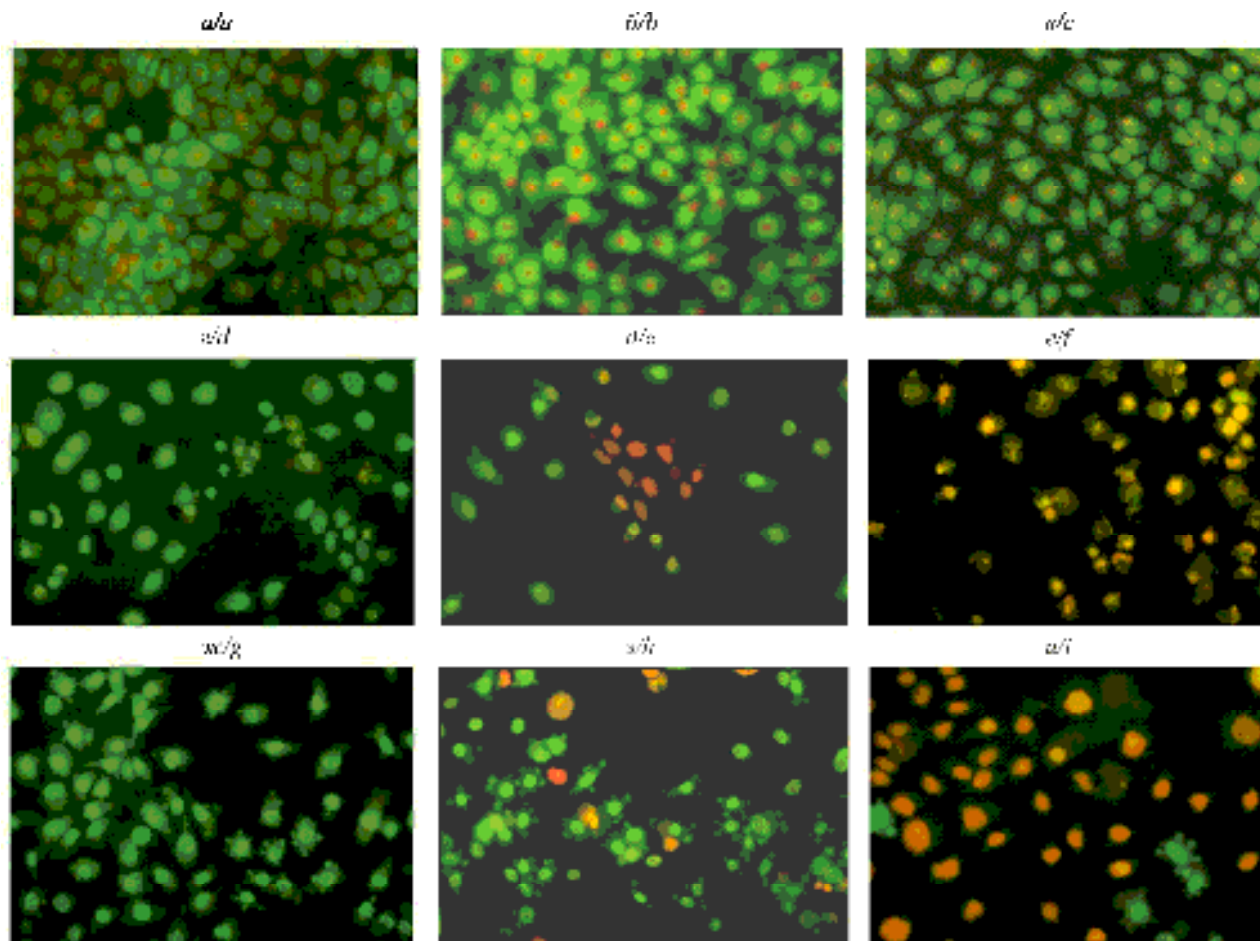


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток HaCaT через различные сроки после воздействия только УФИ в дозе 6 Дж/см² (*б*, *в*), УФИ совместно с ресвератролом (*г* – *е*) и халконом (*ж* – *и*) в концентрации 50 мкмоль/л: *а* – до воздействия; *г*, *ж* – через 3 ч; *б*, *д*, *з* – через 6 ч; *в*, *е*, *и* – через 24 ч после воздействия. Окрашивание АО и ЭБ

Fig. 2. Representative fluorescence micrographs of the HaCaT cells exposed to UVB + UVA (2 + 4 J/cm²) alone (*b*, *c*) or with resveratrol, 50 μ mol/l (*d* – *f*) and chalcone, 50 μ mol/l (*g* – *i*): *a* – before irradiation; *d*, *g* – 3 h; *b*, *e*, *h* – 6 h; *c*, *f*, *i* – 24 h after irradiation. Cells were stained with acridine orange/ethidium bromide

Напротив, соединения, устойчивые к действию УФ, способны возвращаться из возбужденного состояния в основное без нарушения структуры, сохраняя свои фотопротекторные свойства и не влияя на жизнеспособность кератиноцитов при совместном воздействии с УФИ.

Определение *in vitro* эффективности экранирующего действия природных полифенолов, перспективных в качестве солнцезащитных средств

В результате выполнения исследований, данные которых изложены в предыдущих разделах, среди изученных РПС выявлен целый ряд химических УФ-фильтров, способных эффективно поглощать УФ-излучение в диапазонах А и В, сохраняя при этом свои фотопротекторные свойства. Для оценки эффективности их экранирующего действия в условиях *in vitro* использовали модельную систему, включающую культивируемые кератиноциты линии HaCaT. Клетки высевали в 96-луночные планшеты, которые культивировали до достижения 70–80 % конфлюэнта. Для оценки экранирующего действия РПС культуральную среду заменяли на ИФБ с содержанием раствора РПС в концентрации 50 мкмоль/л или без него, после чего планшет с клетками подвергали воздействию УФ-излучения. Чтобы исключить воздействие УФИ на контрольные клетки, соответствующие лунки закрывали фольгой. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду без сыворотки и помещали клетки в стандартные условия. Через 24 ч определяли количество жизнеспособных клеток в контрольных и опытных лунках, используя реактив PrestoBlue™. Результаты определения приведены в табл. 6, из которой следует, что все исследованные соединения в концентрации 50 мкмоль/л увеличивают количество жизнеспособных клеток через 24 ч после воздействия УФИ и по эффективности цитопротекторного действия их можно расположить в следующий ряд: вербаскозид > байкалеин > рутин > силибин > таксифолин > бензофенон-3.

Таблица 6

Влияние УФ-излучения в дозе 9 Дж/см² (УФА 6 Дж/см² + УФВ 3 Дж/см²) на количество жизнеспособных клеток линии HaCaT через 24 ч после воздействия без наличия экранирующего слоя (ЭС) (толщина – 0,4 см), содержащего 50 мкмоль/л РПС, и при его наличии

Table 6

Effect of UV-irradiation in the total dose 9 J/cm² (UVA 6 J/cm² + UVB 3 J/cm²) with or without sunscreen layer (0.4 cm) of PPs (50 μmol/l) on HaCaT cell viability 24 h after administration

Экспериментальные условия	Жизнеспособные клетки, % к контролю (n = 16)	Экранирующий эффект, % ^{a)}
Контроль	100 ± 8	—
Контроль совместно с УФИ, 9 Дж/см ²	56 ± 6 ^{b)}	—
УФИ совместно:		
с бензофеноном-3	65 ± 5 ^{b)}	20 ± 5
силибином	69 ± 5 ^{b)}	30 ± 5
таксифолином	68 ± 6 ^{b)}	27 ± 5
рутином	72 ± 8 ^{b)}	37 ± 6
байкалеином	75 ± 6 ^{r)}	43 ± 5
вербаскозидом	80 ± 7 ^{r)}	56 ± 6

^{a)}Экранирующий эффект (ЭЭф) рассчитывался по формуле

$$\text{ЭЭф, \%} = (\text{пжк РПС} - \text{пжк УФИ}) / (100 - \text{пжк УФИ}) \cdot 100,$$

где пжк УФИ – процент жизнеспособных клеток через 24 ч после воздействия УФИ без экранирующего слоя; пжк РПС – процент жизнеспособных клеток через 24 ч после воздействия УФИ с экранирующим слоем, содержащим РПС; ^{b)}p < 0,01 vs контроль; ^{a)}p < 0,05; ^{r)}p < 0,01 vs УФИ.

В целом эффективность цитопротекторного действия возрастает с увеличением значений SPF, рассчитанных на основании их спектров поглощения (см. табл. 2). Принимая во внимание хорошо установленный факт, что УФА-излучение инициирует процессы апоптоза [16], более высокую, чем можно было ожидать из значений SPF, эффективность цитопротекторного действия у байкалеина и рутина можно объяснить тем, что наряду со способностью поглощать УФВ-излучение эти соединения значительно лучше, чем другие РПС, поглощают УФ-излучение в диапазоне А.

Заключение

Таким образом, в результате данных исследований выявлен ряд эффективных природных УФ-фильтров – силибин, таксифолин, рутин, байкалеин, вербаскозид, способных рассеивать энергию поглощенных

квантов света без инициирования фотохимических и биохимических процессов, ведущих к образованию цитотоксичных интермедиатов. Указанные соединения представляют интерес в качестве потенциальных компонентов солнцезащитных средств.

Библиографические ссылки

1. World Health Organization. Environmental health criteria 160: Ultraviolet radiation WHO, Geneva [Electronic resource]. 1994. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm> (date of access: 15.02.2014).
2. Matsui M. S., DeLeo V. A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer // *Cancer Cells*. 1991. Vol. 3 (1). P. 8–12.
3. Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek M., Brenneisen P., et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging // *Biol. Chem.* 1997. Vol. 378 (11). P. 1247–1257.
4. Wolf R., Wolf D., Morganti P., et al. Sunscreens // *Clin. Dermatol.* 2001. Vol. 19 (4). P. 452–459.
5. Chanchal D., Swarnalata S. Herbal photoprotective formulations and their evaluation // *Open Nat. Prod. J.* 2009. Vol. 2. P. 71–76.
6. F'guyer S., Afaq F., Mukhtar H. Photochemoprotection of skin cancer by botanical agents // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2003. Vol. 19 (2). P. 56–72.
7. Kostyuk V., Potapovich A., Suhan T., et al. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death // *Planta Med.* 2008. Vol. 74 (5). P. 509–514.
8. Potapovich A. I., Kostyuk V. A., Kostyuk T. V., et al. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV // *Inflamm. Res.* 2013. Vol. 62 (8). P. 773–780.
9. Dutra E. A., Oliveira D. A. G. C., Kedor-Hackmann E. R. M., et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry // *Braz. J. Pharm. Sci.* 2004. Vol. 40 (3). P. 381–385.
10. Mansur J. S., Breder M. N. R., Mansur M. C. A., et al. Determinacao do fator de protecao solar por espectrofotometria // *An. Bras. Dermatol.* 1986. Vol. 61. P. 121–124.
11. Pissavini M., Ferrero L., Alard V., et al. Determination of the in vitro SPF // *Cosmet. Toiletries*. 2003. Vol. 118. P. 63–72.
12. Walters C., Keeney A., Wigal C. T., et al. The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens // *J. Chem. Educ.* 1997. Vol. 74 (1). P. 99–102.
13. Oshawott M. S., Saraf S. Photo protective properties of *Boerhaavia diffusa* // *Biosciences. Biotech. Res.* 2006. Vol. 3. P. 257–260.
14. Santos E. P., Freitas Z. M., Souza K. R., et al. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate // *Int. J. Cosmet. Sci.* 1999. Vol. 21 (1). P. 1–5.
15. Sayre R. M., Agin P. P., LeVee G. J., et al. Comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas // *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 29 (3). P. 559–566.
16. Bode A. M., Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as target for cancer prevention // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2005. Vol. 79. P. 237–297.

References

1. World Health Organization. Environmental health criteria 160: Ultraviolet radiation WHO, Geneva [Electronic resource]. 1994. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm> (date of access: 15.02.2014).
2. Matsui M. S., DeLeo V. A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. *Cancer Cells*. 1991. Vol. 3 (1). P. 8–12.
3. Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek M., Brenneisen P., et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* 1997. Vol. 378 (11). P. 1247–1257.
4. Wolf R., Wolf D., Morganti P., et al. Sunscreens. *Clin. Dermatol.* 2001. Vol. 19 (4). P. 452–459.
5. Chanchal D., Swarnalata S. Herbal photoprotective formulations and their evaluation. *Open Nat. Prod. J.* 2009. Vol. 2. P. 71–76.
6. F'guyer S., Afaq F., Mukhtar H. Photochemoprotection of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2003. Vol. 19 (2). P. 56–72.
7. Kostyuk V., Potapovich A., Suhan T., et al. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Med.* 2008. Vol. 74 (5). P. 509–514. DOI: 10.1055/s-2008-1074499.
8. Potapovich A. I., Kostyuk V. A., Kostyuk T. V., et al. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflamm. Res.* 2013. Vol. 62 (8). P. 773–780. DOI: 10.1007/s00011-013-0634-z.
9. Dutra E. A., Oliveira D. A. G. C., Kedor-Hackmann E. R. M., et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2004. Vol. 40 (3). P. 381–385.
10. Mansur J. S., Breder M. N. R., Mansur M. C. A., et al. Determinacao do fator de protecao solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 1986. Vol. 61. P. 121–124.
11. Pissavini M., Ferrero L., Alard V., et al. Determination of the in vitro SPF. *Cosmet. Toiletries*. 2003. Vol. 118. P. 63–72.
12. Walters C., Keeney A., Wigal C. T., et al. The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens. *J. Chem. Educ.* 1997. Vol. 74 (1). P. 99–102.
13. Oshawott M. S., Saraf S. Photo protective properties of *Boerhaavia diffusa*. *Biosciences. Biotech. Res.* 2006. Vol. 3. P. 257–260.
14. Santos E. P., Freitas Z. M., Souza K. R., et al. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1999. Vol. 21 (1). P. 1–5. DOI: 10.1046/j.1467-2494.1999.181658.x.
15. Sayre R. M., Agin P. P., LeVee G. J., et al. Comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas. *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 29 (3). P. 559–566.
16. Bode A. M., Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as target for cancer prevention. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2005. Vol. 79. P. 237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.

Статья поступила в редакцию 19.01.2017.
Received by editorial board 19.01.2017.

УДК 57.017:57.085.23

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ САХАРИДОВ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕТЕРОТРОФНОЙ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ПАЖИТНИКА ГРЕЧЕСКОГО

Д. Ю. ГЛУШАКОВА¹⁾, А. О. ЛОГВИНА¹⁾, В. М. ЮРИН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Представлены результаты изучения влияния типа и концентрации углеводного компонента питательной среды на скорость роста клеток каллусной культуры пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.), их морфологию и уровень накопления сапонинов. Протестированы восемь углеводов в концентрациях 2; 4 и 6 %: моносахариды – глюкоза и галактоза; олигосахариды – сахароза, рафиноза, мальтоза и лактоза; полисахариды – крахмал и инулин. Обнаружена различная реакция каллуса на указанные сахараиды. Характер изменения удельной скорости роста и общего содержания сапонинов в клеточной культуре не зависит от концентрации и типа углевода. Морфология клеток определяется активностью прироста биомассы каллусной ткани. Высокая удельная скорость роста наблюдается при выращивании каллуса в присутствии 6 % глюкозы или 4 % сахарозы. Максимальные значения общего содержания сапонинов обнаружены на среде, дополненной инулином во всех исследуемых концентрациях. Среди протестированных вариантов питательной среды наиболее приемлемой для культивирования каллуса пажитника греческого в целях получения значительных объемов клеточной биомассы с достаточно высоким содержанием сапонинов является среда, включающая 4 % сахарозы.

Ключевые слова: *Trigonella foenum-graecum*; пажитник греческий; каллусная культура; питательная среда; моносахариды; олигосахариды; полисахариды; удельная скорость роста; морфология клеток; общее содержание сапонинов.

Благодарность. Работа выполнена при финансировании Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект № Б13МС-028 от 16.04.2013 г.).

THE REGULARITY OF INFLUENCE OF EXOGENOUS SACCHARIDE ON THE MORPHOPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES OF HETEROTROPHIC CALLUS CULTURE OF FENUGREEK

D. Y. HLUSHAKOVA^a, H. O. LOHVINA^a, V. M. YURIN^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: dasha.glushakova@gmail.com

The article presents results of studying the influence of the type and concentration of the carbohydrate component of the culture medium on the growth rate of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) callus culture, their cell

Образец цитирования:

Глушакова Д. Ю., Логвина А. О., Юрин В. М. Закономерности влияния экзогенных сахаридов на морфологические и биохимические показатели гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 13–24.

For citation:

Hlushakova D. Y., Lohvina H. O., Yurin V. M. The regularity of influence of exogenous saccharide on the morphophysiological and biochemical indices of heterotrophic callus culture of fenugreek. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 13–24 (in Russ.).

Авторы:

Дарья Юрьевна Глушакова – ассистент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Анна Олеговна Логвина – кандидат биологических наук; старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Darya Hlushakova, assistant at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

dasha.glushakova@gmail.com

Hanna Lohvina, PhD (biology); senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

hanna.lohvina@gmail.com

Vladimir Yurin, doctor of science (biology); professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

yurin@bsu.by

morphology and total saponins. Eight carbohydrates have been tested at concentrations of 2; 4 and 6 %: monosaccharides glucose and galactose, oligosaccharides sucrose, raffinose, maltose and lactose, polysaccharides inulin and starch. It was shown different reaction of the callus on the saccharides addition. The nature of changes of specific growth rate and total saponins in fenugreek cell culture did not depend on the concentration and type of carbohydrate. The morphology of cells was determined by the growth activity of the callus tissue. High specific growth rate is observed when growing the callus in the presence of 6 % glucose, or 4 % sucrose. Maximum total saponins was found on the nutrient medium supplemented with inulin in all tested concentrations. Among tested variants, the nutrient medium comprising 4 % of sucrose was the most suitable for culturing of fenugreek callus to produce significant amounts of cell biomass with relatively high content of saponins.

Key words: *Trigonella foenum-graecum*; fenugreek; callus culture; nutrient medium; monosaccharides; oligosaccharides; polysaccharides; specific growth rate; cell morphology; total saponins.

Acknowledgements. This work was funded by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (project No. Б13МС-028 from 16.04.2013).

Введение

Пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) – одно из древнейших растений, используемых человеком в терапевтических и пищевых целях. Пажитник и в настоящее время находит применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства благодаря уникальным ароматическим и лекарственным свойствам [1]. Его надземная масса содержит комплекс разнообразных биологически активных соединений, включающих продукты как первичного, так и вторичного синтеза. Наиболее ценные вторичные метаболиты, производимые данным растением, – сапонины. Высокая рыночная стоимость последних, наряду с ограниченным числом растений, служащих их естественными источниками, объясняет и обуславливает возрастающий интерес к пажитнику греческому [1; 2].

Однако территория естественного произрастания и полевого культивирования пажитника греческого ограничена регионами с теплым климатом, что делает практически невозможным его широко-масштабное использование. Экономически целесообразным альтернативным способом получения фармакологически ценного лекарственного сырья *Trigonella foenum-graecum* является использование культуры его клеток [3].

Перспективность применения данной клеточной технологии определяется рядом преимуществ, среди которых полная независимость культивирования от климатических условий и вредителей, а также возможность контролировать все этапы производства [4; 5]. При этом промышленное применение клеточных культур становится возможным только после детализированной оптимизации условий их выращивания, направленной на получение максимального объема биомассы растительных клеток, характеризующихся высокой продуктивностью в отношении целевых метаболитов. Соответственно, чрезвычайно важный этап исследования клеточных культур *in vitro* – оценка влияния различных факторов (химических и физических) на их морфофизиологические и биохимические показатели [6; 7].

Качественное и количественное варьирование можно осуществлять с любыми компонентами питательных сред, в частности с углеводами. Внесение в состав среды сахаридов является необходимым условием для поддержания роста клеточных культур, а также оказывает выраженное влияние на производство ими биологически активных веществ.

Цель настоящей работы – изучение влияния ряда экзогенных сахаридов на активность ростовых процессов, морфологию клеток и уровень накопления сапонинов гетеротрофной каллусной культурой пажитника греческого.

Материалы и методы исследования

Объектом изучения служила каллусная культура листового происхождения пажитника греческого ярового сорта Ovarі 4. Культивирование каллуса осуществляли на вариантах питательных сред, фитогормональный состав которых был оптимизирован ранее [8]. Минеральная основа питательного раствора соответствовала среде Мурасиге и Скуга (МС) [9]. Среду МС дополняли регуляторами роста – 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой, кинетином, индолил-3-уксусной кислотой в концентрации 2 мг/л. Каллусная культура выращивалась в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 24 °С. Для оценки активности ростовых процессов каллусных культур пажитника греческого определяли удельную скорость роста [10]. Для установления морфологических особенностей клеток проводили окрашивание фрагментов каллусной ткани нейтральным красным с последующим приготовлением временных давленных препаратов, которые изучались под микроскопом. Общее содержание стероидных сапонинов в 30 % водно-спиртовых экстрактах каллусов определяли

с использованием спектрофотометрической методики [11] и выражали в миллиграммах на грамм сухой массы в эквиваленте дигитонина.

Исследование влияния источника углевода на указанные показатели каллуса пажитника греческого включало тестирование сред, дополненных глюкозой, галактозой, сахарозой, мальтозой, лактозой, рафинозой, инулином и крахмалом в концентрациях 2; 4 и 6 %.

Результаты исследований и их обсуждение

Углеводы являются обязательными составляющими питательных сред наряду с фитогормонами и минеральными веществами. Наиболее часто для культивирования клеточных культур применяется сахароза [6, с. 164; 12]. Реже культуры выращивают в присутствии глюкозы, фруктозы, лактозы, мальтозы, галактозы, крахмала и т. д., но эти соединения во многих случаях хуже усваиваются клетками по сравнению с сахарозой, что негативно сказывается на показателях роста клеток [13]. Данному вопросу посвящено много экспериментальных работ и ряд обзоров [14–18].

В связи с отсутствием в литературе сведений о влиянии углеводов на рост и биохимические показатели каллусных культур пажитника греческого нами протестирован широкий спектр сахаридов, которые можно дифференцировать на три группы: моносахариды (глюкоза, галактоза), олигосахариды (дисахариды – сахароза, мальтоза и лактоза, трисахарид рафиноза) и полисахариды (инулин и крахмал).

На первом этапе исследования было установлено влияние сахаридов на рост гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого.

Тестирование моносахаридов показало, что при дополнении питательной среды глюкозой увеличение ее концентрации в среде культивирования с 2 до 6 % сопровождалось небольшой стимуляцией ростовых процессов каллуса (рис. 1, б). Максимальное значение удельной скорости роста зафиксировано в присутствии 6 % глюкозы – $0,146 \pm 0,012$ сут⁻¹. При культивировании каллусной ткани на среде, дополненной 2 и 4 % галактозы, удельная скорость роста различалась незначительно, составляя всего $0,053 \pm 0,006$ и $0,052 \pm 0,009$ сут⁻¹ соответственно. Увеличение концентрации галактозы до 6 % привело к значительному повышению интенсивности прироста биомассы. Удельная скорость роста для данного варианта среды была равна $0,083 \pm 0,005$ сут⁻¹, что тем не менее на 40 % ниже по сравнению со средой, включающей глюкозу в той же концентрации.

Ранее упоминалось, что исследование влияния олигосахаридов включало тестирование сахарозы, рафинозы, лактозы и мальтозы. Из данных, представленных на рис. 1, а, можно сделать вывод о наличии схожих закономерностей изменения ростовых показателей каллуса пажитника греческого на средах, дополненных сахарозой и рафинозой. Так, для обоих углеводов наиболее высокие значения удельной скорости роста каллуса наблюдаются в присутствии их в концентрации 4 %: $0,145 \pm 0,007$ сут⁻¹ – для сахарозы, $0,068 \pm 0,010$ сут⁻¹ – для рафинозы. Уменьшение содержания данных сахаридов в среде до 2 %, как и повышение до 6 %, приводит к существенному снижению скорости роста – в 4–5 раз по сравнению с вариантом среды с 4 % каждого из углеводов. Также общая зависимость, однако противоположного вида, обнаруживается для двух других олигосахаридов – лактозы и мальтозы. Относительно высокая активность ростовых процессов каллуса, в целом сопоставимая со скоростью его роста под влиянием 4 % рафинозы, наблюдается на среде с 2 и 6 % лактозы и 6 % мальтозы. Самые низкие показатели роста фиксируются при их содержании в размере 4 %.

Наряду с исследованием влияния моно- и олигосахаридов на рост каллусной культуры был установлен характер действия полисахаридов крахмала и инулина. Полученные данные представлены на рис. 1, в. Показано, что при внесении в состав среды крахмала в качестве углеводного компонента обнаруживалась концентрационная зависимость, аналогичная для олигосахаридов сахарозы и рафинозы. Так, максимальная удельная скорость роста, равная $0,035 \pm 0,002$ сут⁻¹, была характерна для среды со средней концентрацией крахмала (4 %). Одновременно с этим инулин продемонстрировал концентрационную зависимость, идентичную наблюдаемой в случае галактозы, с максимальным значением удельной скорости в варианте с 6 % содержанием ($0,023 \pm 0,001$ сут⁻¹).

Из литературных данных известно, что после сахарозы – компонента большинства питательных сред [12; 13] – наиболее употребимым источником углерода и энергии для культур *in vitro* является глюкоза. Установлено, что данный углевод можно успешно использовать для выращивания клеточных культур яблони, кокосовой пальмы, апельсина, моркови, кукурузы и др. [15]. Нами также показана перспективность применения глюкозы для поддержания высокой активности прироста биомассы гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого.

Геринг и Рекин (1968) систематизировали большое число исследований по действию галактозы на растительные объекты и показали, что из клеточных культур 28 видов растений лишь три (культуры явора, яблони и апельсина) удовлетворительно усваивают данный моносахарид. Для остальных

протестированных культур *in vitro* галактоза оказалась токсичной. Галактоза в свободном состоянии в растениях практически не встречается. Обнаруживается главным образом в составе полисахаридов клеточных стенок, а также галактолипидах мембран [19]. Поэтому, возможно, ее негативное воздействие на рост большинства клеточных культур объясняется отсутствием или низкой активностью ферментов, ответственных за ее утилизацию, – галактокиназы, галакто-1-фосфатуридилтрансферазы и др. [19].

В нашем случае выраженного токсического эффекта (приводящего к полному подавлению роста клеточной культуры) от введения в среду галактозы не наблюдается. Однако активность роста каллуса пажитника греческого в ее присутствии более чем в два раза ниже по сравнению со средами, дополненными глюкозой.

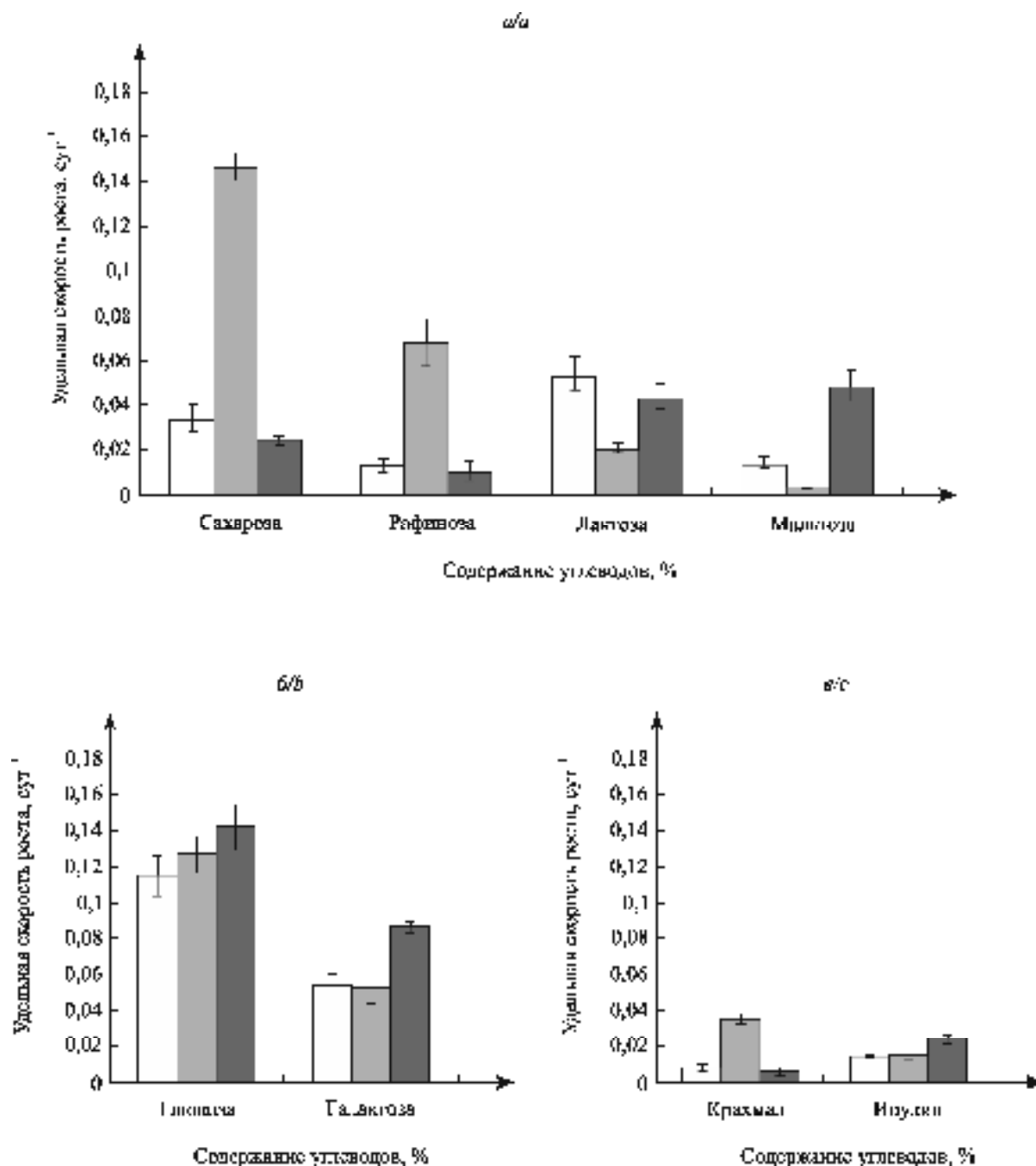


Рис. 1. Влияние олигосахаридов (а), моносахаридов (б) и полисахаридов (в) на удельную скорость роста каллусной культуры пажитника греческого. Содержание углеводов в среде: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

Fig. 1. Effect of oligosaccharides (a), monosaccharides (b) and polysaccharides (c) on specific growth rate of callus culture of fenugreek. Carbohydrate content in the nutrient medium: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

Из олигосахаридов наиболее высокая ростовая активность каллусной ткани пажитника греческого обнаруживается на средах, дополненных сахарозой в концентрациях 4 и 6 %. Ввиду того что сахароза представляет собой первый свободный продукт фотосинтеза и основную транспортную форму сахаров для интактных растений, она, вероятно, является также наиболее подходящим сахаридом для выращивания большинства культур тканей высших растений, что находит отражение в составе используемых питательных сред [4, с. 157; 20].

При культивировании каллуса пажитника греческого на среде с 2 % рафинозы наблюдалась средняя активность ростовых процессов. Из литературных данных известно, что рафинозу можно успешно применять для роста культур огурца, яблони, апельсина и др. Данный сахар, содержащий галактозный, фруктозный и глюкозный остатки, является резервным углеводом многих растений, в том числе перечисленных. Вероятно, это также объясняет возможность роста изучаемой нами каллусной культуры на среде, включающей рафинозу.

Применение олигосахаридов лактозы и мальтозы для поддержания роста каллуса пажитника греческого было гораздо менее эффективным по сравнению с сахарозой, однако в целом соизмеримым с действием рафинозы. Непригодность использования лактозы, показанная для многих культур, возможно, определяется наличием в составе ее молекулы (помимо глюкозного) галактозного остатка, освобождаемого в результате расщепления и токсичного для многих растений. Только культура винограда успешно растет на среде с лактозой. Мальтоза, состоящая из двух остатков глюкозы, больше подходит для внесения в питательные среды и применяется в качестве источника углерода для культур явора, моркови, топинамбура [21, с. 22].

Внесение в состав питательных сред полисахаридов крахмала, состоящего из остатков глюкозы, и инулина, образованного фруктозными мономерами, хотя и обеспечивало при определенных концентрациях небольшой прирост биомассы каллуса пажитника греческого, оказалось наиболее неэффективным среди всех протестированных углеводов. Возможность использования крахмала в качестве углеродного питания культур проверялась многими авторами, вероятно, по причине его высокой доступности. Хороший рост показали культуры явора, яблони и тростника [21, с. 31]. Пригодность применения полисахаридов связана главным образом с гидролизом полимерных молекул до мономеров в результате высокотемпературного воздействия в ходе стерилизации питательных сред путем автоклавирования.

Анализ представленных выше данных по влиянию сахаридов на рост гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого позволяет заключить следующее. Как и для большинства клеточных культур, наиболее оптимальными субстратами для поддержания высоких показателей прироста биомассы изучаемого нами каллуса являются моносахарид глюкоза и олигосахарид сахароза в концентрациях 6 и 4 % соответственно. Удельная скорость роста каллуса в присутствии данных углеводов достоверно не различается. Средние показатели роста каллусной ткани пажитника греческого характерны для сред, включающих 4 % рафинозы и 6 % галактозы. Наименее подходящими для выращивания объекта наших исследований являются среды, дополненные олигосахаридами лактозой и мальтозой и особенно полисахаридами – крахмалом и инулином.

Важно отметить, что ни для одного из протестированных углеводов не наблюдается абсолютного ростоингибирующего эффекта в отношении каллуса пажитника греческого, что указывает на более или менее выраженную способность к их усвоению в качестве источников углерода и энергии. Объяснением этому в случае токсичных для большинства клеточных культур галактозы, рафинозы и лактозы, содержащих в своем составе галактозный остаток, видимо, является наличие в клетках каллуса соответствующих ферментов, ответственных за утилизацию галактозы. Способность же каллуса поддерживать рост, хотя и с низкой скоростью, в присутствии полисахаридов обусловлена частичным их гидролизом во время автоклавирования с образованием более простых по структуре сахаридов, доступных для клеток каллуса.

Углеводный состав среды может оказывать выраженное влияние на физиолого-биохимические процессы в культивируемых клетках, приводя к изменению не только активности их роста, но и морфологии, также отражающей состояние культуры *in vitro* под действием изменяющихся условий выращивания (рис. 2).

Проведенные нами исследования позволили установить, что каллусная культура *Trigonella foenum-graecum* на всех вариантах питательных сред состояла только из клеток, относящихся к двум основным морфологическим типам. Первый тип – клетки меристематического типа. Они располагались крупными локальными скоплениями либо состояли из небольшого числа клеток, имели преимущественно небольшие размеры и округлую форму. Второй тип – клетки паренхимного типа, отличающиеся значительной вариабельностью формы и размеров. В присутствии глюкозы во всех концентрациях, сахарозы и рафинозы – 4 %,

галактозы – 6 % каллус имел рыхлую однородную структуру. Равномерно расположенные в толще каллусной ткани меристематические очаги были окружены клетками паренхимного типа, имеющими в большинстве своем округлую или овальную форму, и характеризовались средними и крупными размерами. Важно отметить, что каллус на данных вариантах демонстрировал высокие и средние показатели роста.

Дополнение среды протестированными олигосахаридами в ингибирующих рост концентрациях, крахмалом и инулином во всех вариантах концентраций привело к уплотнению каллусной ткани, уменьшению размеров клеток, упрочнению межклеточных контактов даже в клеточных скоплениях, образованных клетками паренхимного типа, повышению разнообразия их формы – клетки были овальными, червеобразными, вытянутыми или неправильной формы. Причем чем ниже были показатели роста, тем более выраженными были изменения в структуре каллусной ткани.

Таким образом, в соответствии с полученными данными можно заключить, что структура каллуса и морфологические характеристики клеток не зависят от типа экзогенного сахара. Общей для углеводов концентрационной зависимости также не обнаружено. Одновременно с этим прослеживается четкая закономерность изменения структуры ткани и морфологии составляющих ее клеток от интенсивности ростовых процессов каллусной культуры.

Как было отмечено выше, культуры растительных клеток находят применение в качестве источников ценных соединений, имеющих важное значение для пищевой и фармацевтической промышленности. При этом в литературных источниках часто появляются сведения о том, что инициированные культуры демонстрируют более низкое содержание целевого соединения по сравнению с интактными растениями [22]. Хорошо известно, что варьирование состава питательной среды может в значительной степени повысить выход продуктов вторичного метаболизма [23]. В частности, тип источника углерода в среде способен оказывать выраженное влияние на уровень биологически активных веществ в культурах

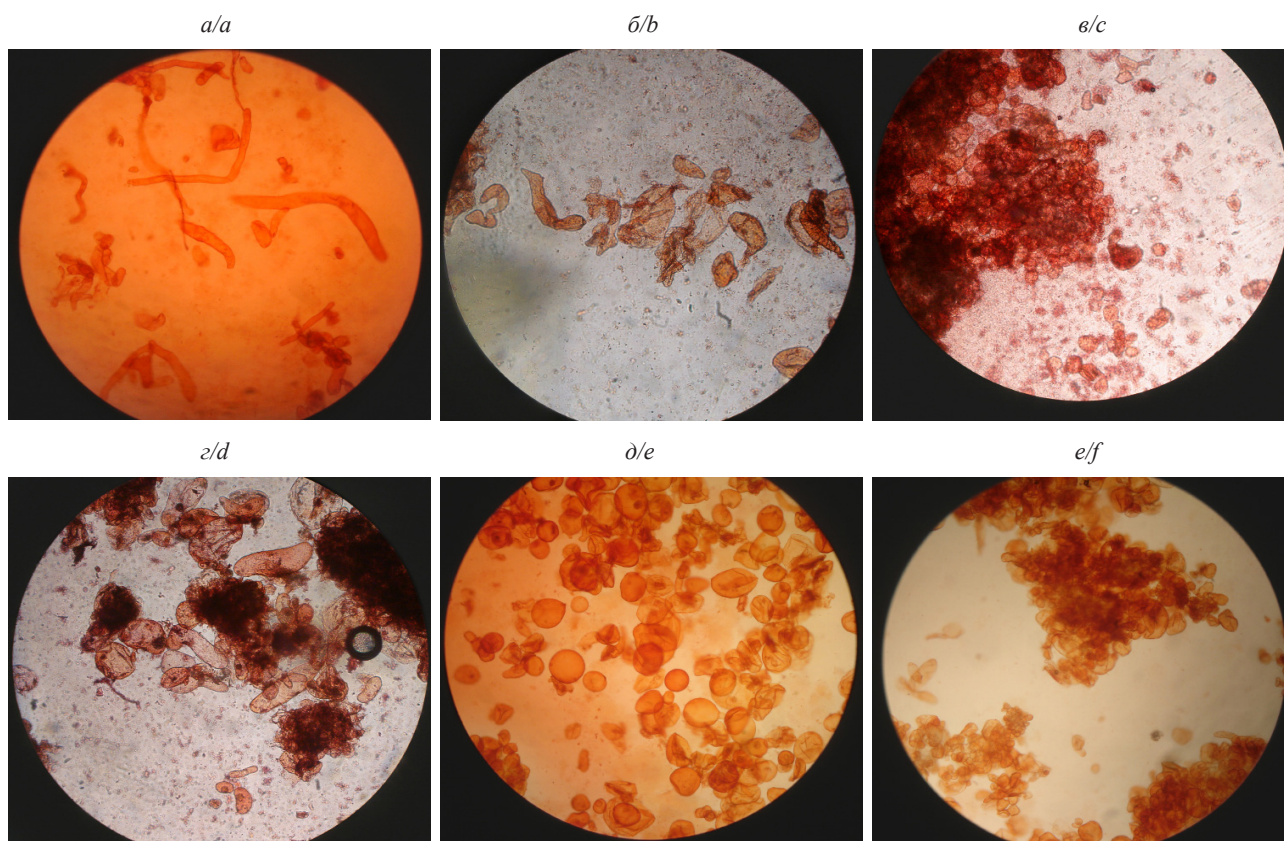


Рис. 2. Морфология клеток каллусной культуры пажитника греческого, культивируемой на питательных средах, содержащих различные сахара:

a – крупные червеобразные клетки в присутствии 6 % крахмала; *b* – червеобразные клетки в присутствии 2 % мальтозы; *в* – скопления клеток меристематического типа в присутствии 6 % галактозы; *г* – большие червеобразные и округлые клетки вокруг скопления клеток меристематического типа в присутствии 6 % глюкозы; *д* – крупные округлые и вытянутые клетки в присутствии 4 % лактозы; *е* – меристематические очаги в присутствии 2 % крахмала

Fig. 2. The morphology of fenugreek callus cells in the presence of various saccharides:

a – large vermiform cells in the presence of 6 % starch; *b* – vermiform cells in the presence of 2 % maltose; *c* – clusters of meristematic cells in the presence of 6 % galactose; *d* – large vermiform and rounded meristematic cells in the presence of 6 % glucose; *e* – large round and elongated cells in the presence of 4 % lactose; *f* – meristematic centers in the presence of 2 % starch

in vitro [13]. Действие сахаров на биосинтез вторичных продуктов может быть результатом поглощения только специфического источника углерода или отражать изменения в метаболизме, вызванные смещением общего баланса углерод/азот в зависимости от типа углеводов [21]. В связи с этим следующим этапом работы стало изучение влияния типа сахара в среде на уровень накопления сапонинов гетеротрофным каллусом пажитника греческого (рис. 3).

Исследование влияния моносахаридов на общее содержание сапонинов в каллусе, результаты которого отражены на рис. 3, б, показало, что при внесении в состав среды глюкозы в концентрации 6 % наблюдалось наиболее высокое значение указанного биохимического показателя – 83 ± 7 мг/г сухой массы. Выращивание каллуса в присутствии 2 и 4 % глюкозы оказалось практически в два раза менее

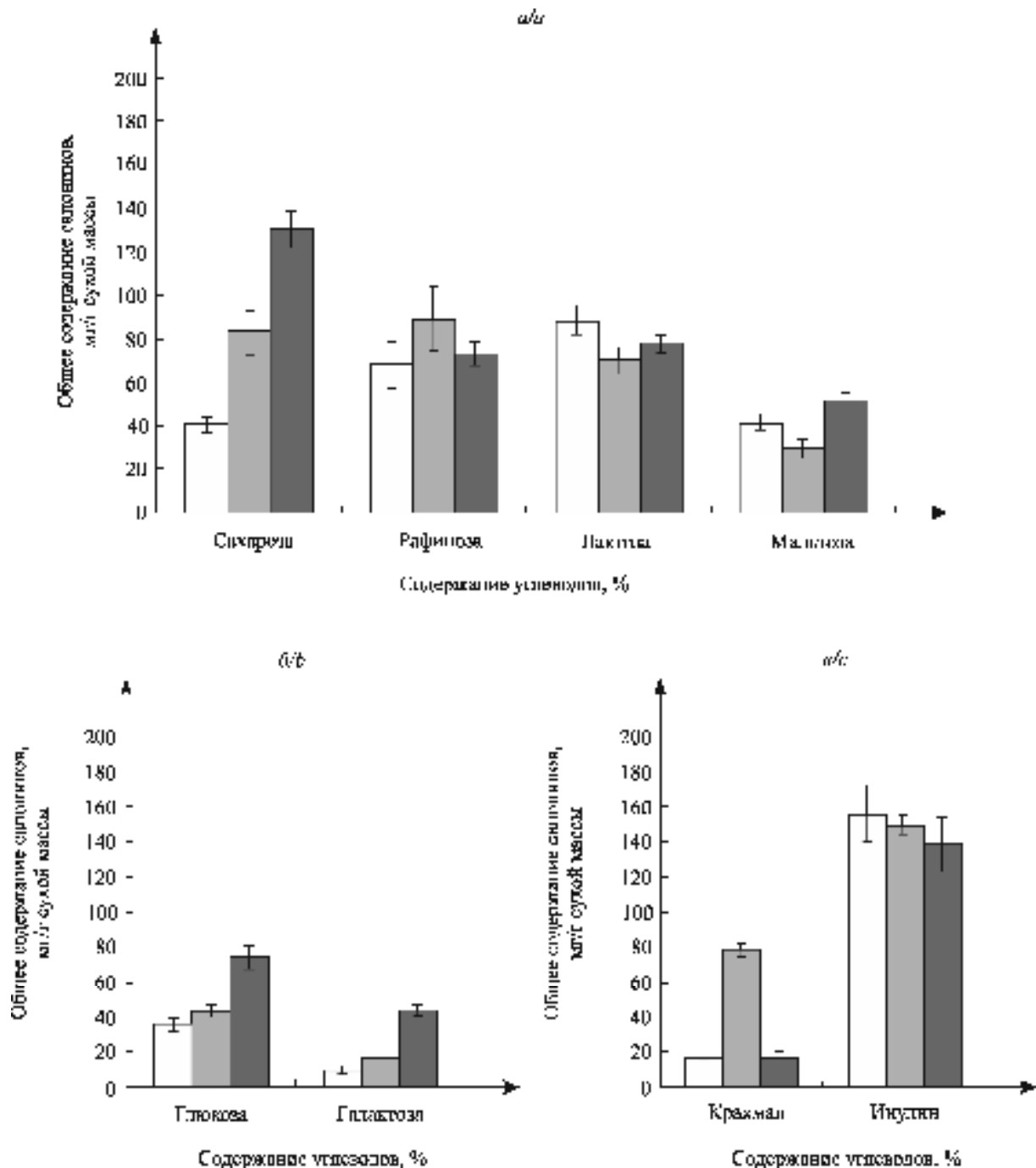


Рис. 3. Влияние олигосахаридов (а), моносахаридов (б) и полисахаридов (в) на общее содержание сапонинов в каллусной культуре пажитника греческого. Содержание углеводов в среде: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

Fig. 3. Effect of oligosaccharides (a), monosaccharides (b) and polysaccharides (c) on total saponins in callus culture of fenugreek. Carbohydrate content in the nutrient medium: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

эффективным. На средах, дополненных галактозой, прослеживалась схожая концентрационная зависимость. Наиболее высокое общее содержание сапонинов также обнаруживалось в присутствии 6 % галактозы, но составляло всего 48 ± 3 мг/г сухой массы.

В ходе тестирования влияния олигосахаридов обнаружено, что повышение содержания сахарозы в питательной среде приводило к постепенному росту уровня сапонинов в каллусной ткани, достигшему значения 129 ± 3 мг/г сухой массы в присутствии 6 % углевода. В случае рафинозы не выявлено достоверных различий между содержанием сапонинов на средах с разными ее концентрациями. Однако можно отметить, что значения определяемого биохимического показателя варьировали от 67 ± 10 мг/г сухой массы в присутствии 2 % рафинозы до 88 ± 14 мг/г сухой массы при внесении 4 % данного сахара. При добавлении в среду лактозы наиболее высокий уровень сапонинов характерен для ее содержания в размере 2 %, как и в случае рафинозы, показатель равен 88 ± 6 мг/г сухой массы. Каллусная ткань на среде, дополненной мальтозой, демонстрировала самый низкий уровень исследуемых вторичных метаболитов по сравнению с другими олигосахаридами: максимальное общее содержание сапонинов обнаруживалось в присутствии мальтозы в концентрации 6 %, составляя 50 ± 4 мг/г сухой массы.

Введение в состав среды полисахарида крахмала показало, что наиболее высокое значение суммарного содержания сапонинов наблюдалось в присутствии 4 % указанного углевода – 89 ± 4 мг/г сухой массы, что в четыре раза выше, чем для двух других тестируемых его концентраций. В случае второго применяемого в исследовании полисахарида – инулина – продемонстрировано, что независимо от его содержания в питательной среде уровень накопления сапонинов был одинаково высоким, составляя в среднем 170 ± 11 мг/г сухой массы.

Примечательно, что наиболее высокое содержание интересующих нас вторичных метаболитов было найдено в присутствии сахара, в наибольшей степени проявляющего ростостимулирующее действие среди всех вносимых в среду углеводов – инулина во всех концентрациях и сахарозы в концентрации 6 %, также подавляющей рост в данной концентрации. Такая же закономерность была выявлена при изучении зависимости накопления диосгенина от ростовых показателей культурой *Dioscorea deltoidea* [4, с. 207]. Как было отмечено в [24], накопление вторичных метаболитов зачастую интенсифицируется при существенном замедлении роста клеточных культур. Подобная реакция каллуса пажитника греческого при добавлении в питательную среду 6 % сахарозы, скорее всего, объясняется осмотическим стрессом, испытываемым клетками в результате сильного повышения осмотического потенциала среды в присутствии высоких концентраций углеводов [21].

В случае инулина осмотический стресс может объяснять полученные результаты только для его наиболее высокой концентрации, равной 6 %. Однако с учетом низких показателей роста с очень высоким уровнем сапонинов в присутствии 2 и 4 % данного полисахарида более вероятным объяснением является отсутствие ферментативных систем, обеспечивающих усвояемость инулина в чистом виде, и недостаточное количество более доступных углеводов, появившихся в среде в результате ее высокотемпературной стерилизации. Видимо, угнетение роста обусловлено дефицитом энергетического и углеродсодержащего субстрата.

Для подавляющего большинства вариантов опыта со средними показателями роста обнаруживались и средние по значениям уровня накопления сапонинов. Кроме этого, в ходе тестирования влияния глюкозы, галактозы, рафинозы, лактозы, мальтозы и крахмала показано, что максимальные для каждого отдельного сахара значения скорости роста каллуса и общего содержания сапонинов приходятся на одну и ту же концентрацию. В данных случаях, вероятно, наблюдается баланс между ростовыми процессами и активностью вторичного синтеза.

Заключение

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать следующие выводы. Изменение углеводного состава питательной среды оказывает выраженное влияние на рост, морфологию клеток и содержание сапонинов в гетеротрофной каллусной культуре пажитника греческого. В отношении данных показателей каллусная ткань демонстрирует индивидуальную реакцию на протестированные сахара. Зависимости определяемых параметров от принадлежности углеводов к классам моно-, олиго- или полисахаридов, как и общей концентрационной закономерности, не выявлено. При этом характер изменения морфологии каллусных клеток под воздействием различных углеводов коррелирует с активностью прироста биомассы. Так, на вариантах сред, характеризующихся низкой удельной скоростью роста каллуса, обнаруживаются преимущественно небольшие клетки со значительной вариабельностью формы. Высокие же показатели роста сопровождаются увеличением размеров клеток и повышением их однородности по форме с преобладанием округлых клеток. При дополнении питательного раствора протестированными углеводами – глюкозой, галактозой, сахарозой, рафинозой, мальтозой, лактозой,

крахмалом, инулином – в концентрациях 2; 4 и 6 % одновременной интенсификации роста и накопления сапонинов каллусом не наблюдается ни в одном из опытных вариантов. Тем не менее внесение в состав питательной среды 4 % сахарозы или 6 % глюкозы обеспечивает увеличение объема клеточной биомассы. Наиболее высокий выход сапонинов наблюдается на средах, дополненных инулином в любой из протестированных концентраций, однако чрезвычайно низкий прирост биомассы в этих случаях делает использование данных вариантов среды нецелесообразным. В наибольшей степени продуктивной является среда, содержащая в качестве источника углерода и энергии 4 % сахарозы. На данной питательной среде средние значения содержания сапонинов сочетаются с высокими показателями роста гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого.

Библиографические ссылки

1. Nadkarni A. K. Indian Materia Medica. Bombay, 1982. P. 1240–1243.
2. Rajagopalan M. S. Fenugreek, what this herb can offer? // *Naturally*. 1998. Vol. 1. P. 1–4.
3. Kaviarasan S., Viswanathan P., Anuradha C. V. Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver // *Cell Biol. Toxicol.* 2007. Vol. 23, issue 6. P. 373–383.
4. Брежнева Т. А., Атаманова С. А., Сливкин А. И. и др. Особенности выделения сапонинов из корнеплодов растения *Beta Vulgaris* L. // *Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер.: Химия. Биология. Фармация*. 2004. № 1. С. 152–155.
5. Волова Т. Г. Биотехнология. Новосибирск, 1999.
6. Курсанов А. Л. Транспорт ассимиляторов в растении. М., 1976.
7. Блажевич О. В. Культивирование клеток : курс лекций. Минск, 2005.
8. Lohvina H. O., Makai S., Ditchenko T. I., et al. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties // *Acta Agron. Ovariensis*. 2012. Vol. 54, № 2. P. 29–37.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
10. Калинин Ф. Л., Сариацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.
11. Hiai S., Oura H., Nakajima T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin sulfuric acid // *Planta Med.* 1976. Vol. 29. P. 116–122.
12. Ong S. L., Ling A. P. K., Poosporagi R., et al. Production of flavonoid compounds in cell cultures of *Ficus deltoidea* as influenced by medium composition // *Int. J. Med. Arom. Plants*. 2011. Vol. 1, № 2. P. 62–74.
13. Chawla H. S. Introduction to plant biotechnology. 2nd ed. Enfield, 2002.
14. Холодова В. П. Рост и метаболизм углеводов в культуре тканей растений // *Культура клеток растений*. М., 1981. С. 17–36.
15. Bhojwani S. S., Razdan M. K. Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam, 1996.
16. Chae Hyun Yum, Hyun Ju You, Geun Eog Ji. Cytotoxicity of Dioscin and Biotransformed Fenugreek // *J. Korean Society Appl. Biol. Chem.* 2010. Vol. 53. P. 470–477.
17. Ching-Long Lai, Jui-Sen Yang. Production of crocin by fruit callus culture of gardenia jasminoides ellis // *Food Biotechnol.* 2009. Vol. 13. P. 209–216.
18. Masoumian M., Arbakariya A., Syahida A., et al. Flavonoids production in *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues // *J. Med. Plants*. 2011. Vol. 5 (9). P. 1564–1574.
19. Feingold D. S. Aldo (and keto) hexoses and uronic acids // *Encyclopedia of Plant Physiol. New series*. 1982. Vol. 13. P. 3–77.
20. Schenk R. V., Hildebrandt A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Can. J. Bot.* 1972. Vol. 50. P. 199–204.
21. Урманцева В. В. Особенности углеводного обмена разных штаммов культуры тканей сахарной свеклы. М., 1985. С. 9–45.
22. Васильева И. С., Пасеиниченко В. А. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность // *Успехи биол. химии*. 2000. Т. 40. С. 153–204.
23. Kim S. I., Choi H. K., Kim J. H., et al. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis* // *Microb. Technol.* 2001. Vol. 28. P. 202–209.
24. Логвина А. О., Глушакова Д. Ю., Дитченко Т. И. и др. Динамика накопления фенольных соединений и сапонинов каллусными культурами пажитника греческого в ходе ростового цикла // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География*. 2014. № 1. С. 27–31.

References

1. Nadkarni A. K. Indian Materia Medica. Bombay, 1982. P. 1240–1243.
2. Rajagopalan M. S. Fenugreek, what this herb can offer? *Naturally*. 1998. Vol. 1. P. 1–4.
3. Kaviarasan S., Viswanathan P., Anuradha C. V. Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver. *Cell Biol. Toxicol.* 2007. Vol. 23, issue 6. P. 373–383.
4. Brezhneva T. A., Atamanova S. A., Slivkin A. I., et al. Features of selection of saponins from the plants root crops *Beta Vulgaris* L. *Vestnik Voronezhskii gos. univ. Ser.: Khim. Biol. Farmatsiya*. 2004. No. 1. P. 152–155 (in Russ.).
5. Volova T. G. Biotechnology [Biotechnology]. Novosibirsk, 1999 (in Russ.).
6. Kursanov A. L. Transport assimilatorov v rastenii [Transport assimilators in the plant]. Moscow, 1976 (in Russ.).
7. Blazevic O. V. Kul'tivirovanie kletok [Cultivation of cells]. Minsk, 2005 (in Russ.).
8. Lohvina H. O., Makai S., Ditchenko T. I., et al. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties. *Acta Agron. Ovariensis*. 2012. Vol. 54, No. 2. P. 29–37.

9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
10. Kalinin F. L., Saryatskaya V. V., Polishchuk V. E. Metody kul'tury tkanei v fiziologii i biokhimii rastenii [Tissue culture techniques in plant physiology and biochemistry]. Kiev, 1980 (in Russ.).
11. Hiai S., Oura H., Nakajima T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin sulfuric acid. *Planta Med.* 1976. Vol. 29. P. 116–122. DOI: 10.1055/s-0028-1097639.
12. Ong S. L., Ling A. P. K., Poosporagi R., et al. Production of flavonoid compounds in cell cultures of *Ficus deltoidea* as influenced by medium composition. *Int. J. Med. Arom. Plants.* 2011. Vol. 1, No. 2. P. 62–74.
13. Chawla H. S. Introduction to plant biotechnology. 2nd ed. Enfield, 2002.
14. Kholodova V. P. Rost i metabolism uglevodov v kul'ture tkanei rastenii [The growth and metabolism of carbohydrates in the plant tissue culture]. In: *Culture of plant cells*. Moscow, 1981. P. 17–36 (in Russ.).
15. Bhojwani S. S., Razdan M. K. Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam, 1996.
16. Chae Hyun Yum, Hyun Ju You, Geun Eog Ji. Cytotoxicity of Dioscin and Biotransformed Fenugreek. *J. Korean Society Appl. Biol. Chem.* 2010. Vol. 53. P. 470–477.
17. Ching-Long Lai, Jui-Sen Yang. Production of crocin by fruit callus culture of gardenia jasminoides ellis. *Food Biotechnol.* 2009. Vol. 13. P. 209–216.
18. Masoumian M., Arbakariya A., Syahida A., et al. Flavonoids production in *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues. *J. Med. Plants.* 2011. Vol. 5 (9). P. 1564–1574.
19. Feingold D. S. Aldo (and keto) hexoses and uronic acids. *Encyclopedia Plant Physiol. New series.* 1982. Vol. 13. P. 3–77.
20. Schenk R. V., Hildebrandt A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 1972. Vol. 50. P. 199–204.
21. Urmantseva V. V. Osobennosti uglevodnogo obmena raznykh shtamov kul'tury tkanei sakharnoi svekly [Features of different strains of carbohydrate metabolism of sugar beet tissue culture]. Moscow, 1985. P. 9–45 (in Russ.).
22. Vasilyeva I. S., Paseshnichenko V. A. Steroidal glycosides of plant and cell culture of *Dioscorea*, their metabolism and biological activity. *Uspekhi biol. khim.* 2000. Vol. 40. P. 153–204 (in Russ.).
23. Kim S. I., Choi H. K., Kim J. H., et al. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Microb. Technol.* 2001. Vol. 28. P. 202–209.
24. Logvina A. O., Glushakova D. Y., Ditchenko T. I., et al. Dynamics of accumulation of phenolics and saponins in the growth cycle of fenugreek calli. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2014. No. 1. P. 27–31 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 20.12.2016.
Received by editorial board 20.12.2016.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ НА РОСТ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Ю. В. КИРИСЮК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК²⁾

¹⁾Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина,
бул. Космонавтов, 21, 224016, г. Брест, Республика Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Отмечено, что выброс металлсодержащих наночастиц в окружающую среду неуклонно растет, что связано с прогрессирующим их использованием в составе новых материалов и продуктов. По некоторым оценкам, в развитых странах мира концентрация отдельных металлсодержащих наночастиц может достигать 8–10 мг/л на 1 кг сырой почвы, а это обуславливает необходимость оценки их влияния на живые системы и в первую очередь на растения как доминирующую форму жизни на планете и важнейший восполняемый природный ресурс. Проанализировано влияние наночастиц меди, введенных в среду выращивания, на процессы каллусогенеза в незрелых зародышах *Triticum aestivum* L. Данная экспериментальная система позволяет протестировать воздействие наночастиц на рост регенеративных и защитных тканей растения. Определено, что введение в среду медных наночастиц в концентрации свыше 100 мг/л ингибирует формирование первичного каллуса и подавляет прорастание незрелых зародышей пшеницы. Наночастицы меди значительно снижали удельную скорость роста и время удвоения биомассы каллусной культуры, данный эффект имел дозозависимый характер, усиливаясь при больших концентрациях их в среде. Макрочастицы меди вызывали меньшие по силе воздействия эффекты, чем наночастицы. Установлено, что наночастицы меди обладают высокой токсичностью и могут негативно влиять на развитие регенеративных и защитных тканей растения.

Ключевые слова: наночастицы меди; пшеница; незрелые зародыши; каллус.

Благодарность. Работа проводилась в рамках проектов «Установление роли запрограммированной клеточной гибели в ответной реакции корня пшеницы на воздействие наночастиц меди» (2016–2018), № ГР 20163145 (научный руководитель – Ю. В. Кирисюк), и «Установление сигнальной роли экзогенного аскорбата в клетках корня высших растений» (2015–2017), № ГР 20151026 (научный руководитель – В. В. Демидчик), Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований. Работа также финансировалась Министерством образования Республики Беларусь и государственной программой научных исследований «Конвергенция-2020» в рамках подпрограммы «Объединение» (2016) по заданию «Разработка “зеленых” технологий синтеза наночастиц серебра на основе растительных экстрактов и тестирование их биоцидной активности» (научный руководитель – В. В. Демидчик).

Образец цитирования:

Кирисюк Ю. В., Демидчик В. В. Влияние наночастиц меди на рост каллусной культуры, полученной из незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 23–30.

For citation:

Kirysiuk Y. V., Demidchik V. V. Effect of copper nanoparticles on growth of calluses culture from immature embryos of *Triticum aestivum* L. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 23–30 (in Russ.).

Авторы:

Юлия Викторовна Кирисюк – преподаватель кафедры зоологии и генетики биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Yuliya Kirysiuk, lecturer at the department of zoology and genetics, faculty of biology.

kirysiukyuliya@gmail.com

Vadzim Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

EFFECT OF COPPER NANOPARTICLES ON GROWTH OF CALLUSES CULTURE FROM IMMATURE EMBRYOS OF *TRITICUM AESTIVUM* L.

Y. V. KIRYSIUK^a, V. V. DEMIDCHIK^b

^aBrest State University named after A. S. Pushkin, boulevard Cosmonauts, 21, 224016, Brest, Republic of Belarus

^bBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: dzemidchik@bsu.by

Soil levels of metal-containing nanoparticles progressively increase. This is caused by development of nanotechnology and constantly increasing use of nanoparticles in new materials and products. Based on some estimates, the level of some metal-containing nanoparticles can reach 8–10 mg/l per kg of fresh soil in the USA and some other countries. Thus, it is important to evaluate the impact of metal-containing nanoparticles on plants, which are dominating group of organisms on our planet. Moreover the analysis of influence of metal-containing nanoparticles on growth rate and productivity of plants has a practical importance for agriculturists and ecologists. In this study, we tested the effect of copper nanoparticles added to growing medium on callus induction from immature embryos of *Triticum aestivum* L. This experimental system allows evaluating the nature of nanoparticle-induced changes in plant regenerative and protective tissues. We have found that copper nanoparticles at concentrations above 100 mg/l inhibited formation of primary calluses and germination of immature wheat embryos. In the presence of copper nanoparticles (100 mg/l), callus growth rate and the doubling time of callus biomass decreased twice. Copper bulk particles, which were used in control tests, induced less pronounced inhibition of callus growth. Obtained data demonstrated that copper nanoparticles are toxic for higher plants affecting development of regenerative and protective tissues.

Key words: copper nanoparticles; wheat; immature embryos; callus.

Acknowledgements. This study was carried out as a part of projects «Determination of the role of programmed cell death in wheat root response to copper nanoparticles» (2016–2018), state registration number 20163145 (supervisor – Y. V. Kirisiuk), and «Establishing signalling role of exogenous ascorbate in plant root cells» (2015–2017), state registration number 20151026 (supervisor – V. V. Demidchik), funded by Belarusian republican foundation for fundamental research. It was also supported by Belarusian ministry of education and State research program scheme «Conversion» (section «Connection»), grant title «Creation of green technologies for silver nanoparticle synthesis based on plant extracts and testing their biocide activity» (supervisor – V. V. Demidchik).

Введение

Неорганические наноматериалы находят все более широкое применение во многих отраслях промышленности, сельского хозяйства и медицины [1; 2]. Применительно к биологическим системам они используются в биоцидных целях – для обеззараживания среды, медицинского и биотехнологического оборудования, удобрений, тканей и пластиков, материалов пищевой упаковки, добавок к кормам и др. Одними из наиболее часто используемых в промышленности являются медные наночастицы [3], доля которых в общем производстве наночастиц и продуктов с их использованием постоянно увеличивается. Медные наночастицы обладают мощнейшей биоцидной активностью и считаются высокоперспективными для практического использования в области разработки антигрибковых и антибактериальных препаратов. Однако широкое применение медных наночастиц в промышленности должно сопровождаться исследованиями их токсического воздействия и адекватной оценкой соответствующей токсикологической опасности для всех групп организмов.

Токсичность наночастиц связывают с малыми размерами (1–100 нм), благодаря которым они обладают исключительно высокими каталитическими характеристиками, адгезивными свойствами, а также легче проникают в клетку, чем макрочастицы (балк) [4; 5]. Накопление наночастиц в клетках и тканях растений и животных приводит к передаче их по пищевой цепи в организм человека [6]. На примере медных наночастиц установлено, что физиологическая токсичность для животных и растений возрастает с уменьшением размеров наночастицы, увеличением времени экспозиции и концентрации в среде [7]. В настоящее время существуют экспериментальные доказательства повреждающего влияния наночастиц меди на стабильность ДНК и фотосинтетический аппарат у сельскохозяйственных растений [8]. Однако воздействие данных экотоксикантов на многие важнейшие физиологические процессы, такие как формирование регенеративных и защитных тканей, все еще остается неизученным.

Основную роль в обеспечении населения Земли продовольствием и первичной биомассой играет культивирование злаков, среди которых в Европе важнейшим является пшеница. В Беларуси пшеница также занимает лидирующую роль в сельскохозяйственном производстве. Оценки, проведенные в США, показывают, что нанозагрязнение почв негативно сказывается на культивировании пшеницы [9–11]. Несмотря на то что медь – это ключевой микроэлемент для пшеницы и других злаков, в высоких дозах

она представляет собой опасный токсикант, вызывающий окислительный стресс и повреждения мембран [12]. Таким образом, представляется актуальным протестировать воздействие наночастиц меди на растения пшеницы белорусской селекции.

Другой аспект, связанный с исследованием воздействия наночастиц металлов на злаковые культуры, — это научно обоснованная оценка эффективности применения наночастиц микроудобрений. В последние годы в Беларуси были разработаны так называемые наночастицы, которые позиционируются как высокоэффективные средства увеличения урожая. Поскольку в мире подобных разработок пока не проводится, встает вопрос глубокого и стандартизированного анализа эффективности наночастиц на всех уровнях организации растений. Принципиально важно, чтобы дозы внесения таких удобрений разрабатывались с учетом токсико-физиологических тестов на растительном материале. Пшеница классически считается растением, высоко отзывчивым к меди [13; 14]. В связи с этим оценка потенциальных рисков токсического влияния наночастиц меди имеет большое значение. Необходимо проведение для меди сравнительного анализа токсичности наночастиц и балла.

Модельной системой регенерации поврежденных тканей является каллус, полученный из меристематических тканей. При выделении его из зародышей он также отражает регенерационный потенциал эмбрионов. В связи с этим в настоящей работе были исследованы эффекты воздействия наночастиц меди и медного балла как потенциальных модификаторов физиологических процессов в растении на формирование каллусной ткани и показатели роста культуры зародышей пшеницы.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были растения яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Дарья. Для получения каллусной ткани использовали метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы [15], которые обладают высокой отзывчивостью к условиям культивирования *in vitro*. Согласно литературным данным морфогенный потенциал каллуса на основе незрелых зародышей пшеницы зависит от стадии развития зародыша: он максимален на 15–16-е сутки после опыления [16; 17].

Для получения каллусов колоса растений, выращенных в полевых условиях, срезались на 15–16-е сутки после опыления и помещались в условия пониженной температуры (+2 °C) на 24 ч. Стерилизация зерновок пшеницы проводилась при помощи 30 % гипохлорита натрия (7 мин) с последующим трехкратным отмывом в стерильной дистиллированной воде. Незрелые зародыши вырезались скальпелем из зерновки и помещались на агаризованную стерильную 100 % среду Мурашиге и Скута (МС) с витаминами [18], содержащую также 0,6 % микробиологического агара, 3 % сахарозы, 150 мг/л L-глутамин и 2 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты), pH составлял 5,6–5,8. Экспланты культивировались в термостате при постоянной температуре 26 °C в течение 30 сут.

В экспериментах использовались сертифицированные наночастицы меди диаметром 38 ± 4 нм (MTI Corporation, США) и медный балл с диаметром частиц около 70 мкм (Sigma, США). Суспензии наночастиц и балла готовились при помощи ультразвукового диспергирования с применением соникатора Digital Ultrasonic Cleaner JeKen PS-08 A (40 кГц) (Китай) в течение 15 мин. В вариантах опыта концентрация наночастиц меди и балла в питательной среде была следующей: 1; 5; 20; 100; 500 мг/л. Для Cu^{2+} диапазон исследуемых концентраций составил 0,1–1000,0 мкмоль/л.

Частота индукции каллусообразования определялась как соотношение количества эксплантов, продуцирующих каллус, с общим количеством высаженных эксплантов. Для изучения динамики прироста биомассы определялся индекс (I) роста каллусов пшеницы. Данный показатель рассчитывался по формуле

$$I = (m_{\max} - m_0) / m_0,$$

где m_0 — исходная масса каллуса, г; $m_{\max}$ — масса каллуса непосредственно перед его пассированием, г [19]. Каллусная ткань взвешивалась на 10, 20, 30-е сутки.

Удельная скорость роста рассчитывалась по формуле

$$V = (m_t - m_0) / \Delta t \cdot m_0,$$

где m_0 — начальная масса каллуса, г; m_t — масса каллуса в конце цикла выращивания, г; t — продолжительность культивирования, сут.

Время удвоения биомассы рассчитывалось по формуле

$$\mu = \ln 2 / V,$$

где V — удельная скорость роста.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы MS Excel 2007 (Microsoft, США). Достоверность определена с помощью t -критерия Стьюдента. Данные

представлены в виде $X \pm S_x$, где X – среднее арифметическое значение показателя; S_x – ошибка среднего арифметического [20].

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе тестирования наночастиц меди изучалось их влияние на индукцию каллусогенеза (таблица). При культивировании незрелых зародышей пшеницы на 10-е сутки формирование каллусов происходило как в контрольных условиях, так и во всех вариантах обработки – медными наночастицами, балком и ионами меди (см. таблицу). Более активный, чем в контроле, рост каллусов был отмечен на питательных средах, в которые вводились медные наночастицы или балк в концентрациях 1; 5 и 20 мг/л, а также Cu^{2+} в концентрации менее 10 мкмоль/л. Этот эффект интересен с точки зрения минерального питания растений и оценки целесообразности внесения медных удобрений в наноформе. Частота каллусообразования была минимальной при обработке 1 ммоль/л Cu^{2+} ($5 \pm 5\%$), в то время как даже очень высокие уровни медных наночастиц и балка не вызывали полного подавления этого процесса ($75,0 \pm 8,7$ и $35,0 \pm 10,4\%$ соответственно).

Влияние состава питательной среды на формирование каллусной культуры *Triticum aestivum* L.

The effect of medium composition on formation of *Triticum aestivum* L. callus culture

Состав среды	Количество незрелых зародышей, шт.	Количество полученных каллусов, шт.	Частота каллусообразования, % ($X \pm S_x$)	Частота прорастания незрелых зародышей, % ($X \pm S_x$)
Контрольные условия: среда МС, 0,6 % агар, 3 % сахара, 150 мг/л L-глутамин*	113	113	100	$39,8 \pm 4,6$
Медные наночастицы, мг/л:				
1	60	60	100	$18,3 \pm 4,4^{**}$
5	60	60	100	$41,7 \pm 1,7$
20	116	116	100	$20,0 \pm 4,5^{**}$
100	61	60	$98,3 \pm 1,7$	$5,0 \pm 2,9^{**}$
500	60	45	$75,0 \pm 8,7$	0
Медный балк, мг/л:				
1	61	61	100	$29,6 \pm 3,2$
5	60	60	100	$38,3 \pm 4,4$
20	60	60	100	$33,3 \pm 1,7$
100	59	59	$98,3 \pm 1,7$	$16,9 \pm 1,6^{**}$
500	60	60	$35,0 \pm 10,4$	0
Cu^{2+} , мкмоль/л:				
0,1	60	60	100	$40,0 \pm 2,89$
1,0	60	60	100	$36,7 \pm 8,82$
10,0	40	40	100	$32,5 \pm 2,5$
100,0	61	61	100	$27,9 \pm 4,34$
1000,0	50	3	5 ± 5	0

*Среда, использованная в контрольных опытах, – базовая для тестов с наночастицами, балком и ионами меди; **достоверно при $p \leq 0,05$.

*This medium that was used as basic medium in control and nanoparticle, bulk and copper ion tests; **significant at $p \leq 0.05$.

Таким образом, каллусообразование слабо подвергалось негативному воздействию наночастиц меди. В то же время вероятность прорастания незрелых зародышей была многократно ниже при обработке медными наночастицами по сравнению с частицами балка (см. таблицу). В проведенных опытах установлено, что 500 мг/л медных наночастиц (рис. 1) или балка, так же как и 1 ммоль/л Cu^{2+} , полностью подавляли прорастание незрелых зародышей.

Следующим этапом тестирования медных частиц было изучение их воздействия на рост каллусной ткани пшеницы (рис. 2). Наиболее высокие показатели индекса роста, удельной скорости роста и наименьшее время удвоения биомассы были характерны для каллусов, культивируемых на питательных

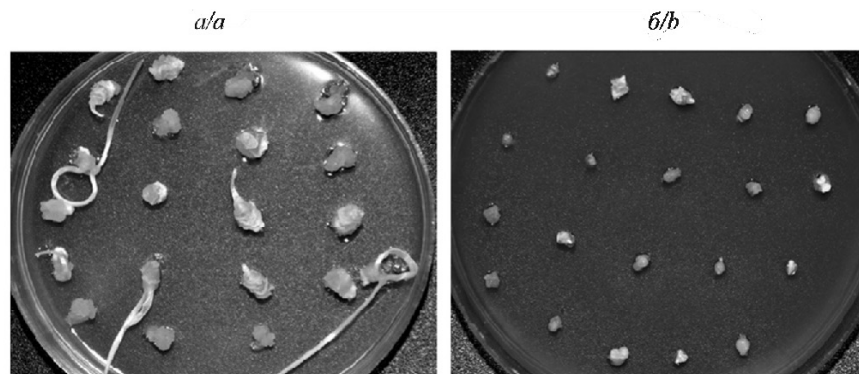


Рис. 1. Незрелые зародыши пшеницы при культивировании в течение 10 сут на различных средах: а – среда МС (контроль); б – среда МС с добавлением 500 мг/л наночастиц меди. Диаметр чашки – 90 мм

Fig. 1. Immature wheat embryos after cultivation during 10 days on different media: а – MS (control); б – MS, 500 mg/l Cu nanoparticles. The diameter of Petri dish – 90 mm

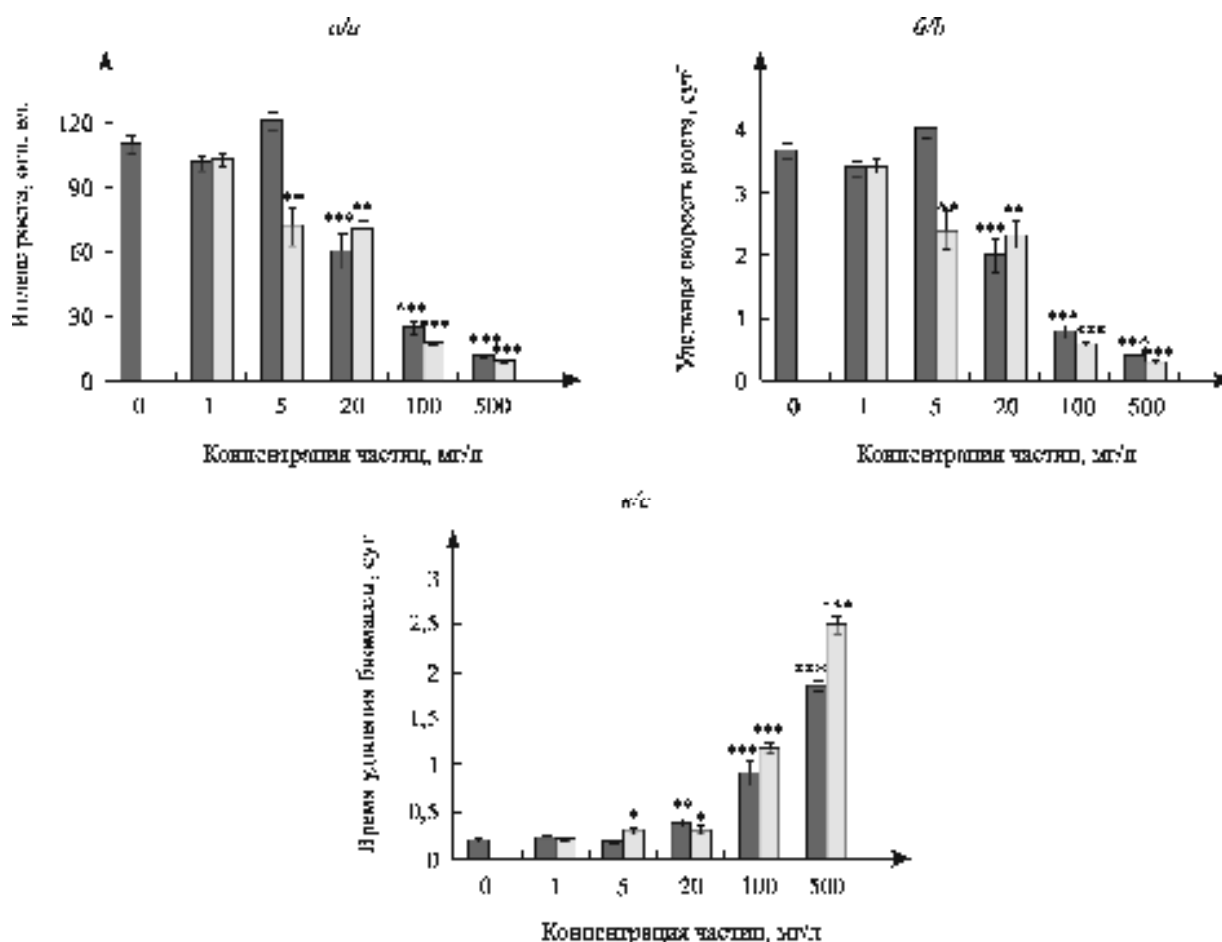


Рис. 2. Зависимость показателей роста каллусной культуры *Triticum aestivum* L. от концентрации медных частиц в питательной среде: а – индекса роста; б – удельной скорости роста; в – времени удвоения биомассы.

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. □ – наночастицы; ■ – балк

Fig. 2. Growth parameters of *Triticum aestivum* L. callus culture measured at different concentrations of Cu nanoparticles and bulk: а – index of the growth; б – specific growth rate; в – time of doubling biomass.

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. □ – nanoparticles; ■ – bulk

средах, дополненных наночастицами меди в концентрации 5 мг/л. Полученные значения существенно отличались от данных, зарегистрированных для медного балка, что указывает на специфический характер влияния наночастиц. Сильное ингибирование удельной скорости роста и других ростовых показателей наблюдалось при высоких уровнях наночастиц в среде (свыше 100 мг/л). В этом случае относительно контрольных значений ростовые процессы замедлялись на 85–95 %.

Определение времени удвоения биомассы каллусной культуры *Triticum aestivum* L. на средах с различным содержанием медных наночастиц почти во всех вариантах опыта показало достоверные различия между средними значениями данного показателя. Необходимо отметить, что время удвоения биомассы каллуса коррелирует с содержанием медных частиц в питательной среде. Так, наименьшее время требуется для удвоения биомассы каллусов, выращенных на среде с добавлением медных наночастиц и балка в концентрации 1 мг/л, что составляет 0,21 и 0,2 сут соответственно. Наибольшее время необходимо для удвоения биомассы каллусов, культивируемых на среде, дополненной высокими концентрациями медных наночастиц. При добавлении в питательную среду 500 мг/л наночастиц данный показатель превышает контрольные значения почти в 10 раз.

При введении в среду культивирования ионов меди в различных концентрациях наблюдалась тенденция уменьшения исследуемых параметров при увеличении содержания меди в среде (рис. 3). Близкие к контрольным (0) значения зарегистрированы при добавлении в среду 0,1 и 1,0 мкмоль/л Cu^{2+} . Достоверное уменьшение средних показателей индекса роста (см. рис. 3, а) и удельной скорости роста (см. рис. 3, б) наблюдалось при культивировании каллусной культуры на среде, содержащей 10,0; 100,0 и 1000,0 мкмоль/л ионов меди. Рост каллусной культуры замедлялся при введении в среду 1000,0 мкмоль/л Cu^{2+} , при этом время удвоения биомассы (см. рис. 3, в) увеличилось в 16,5 раза по сравнению с контролем.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых также было продемонстрировано сильное ингибирующее действие наночастиц меди на скорость набора биомассы растения *Cucurbita pepo* [21]. Следует отметить, что хорошо изучено воздействие на растения некоторых

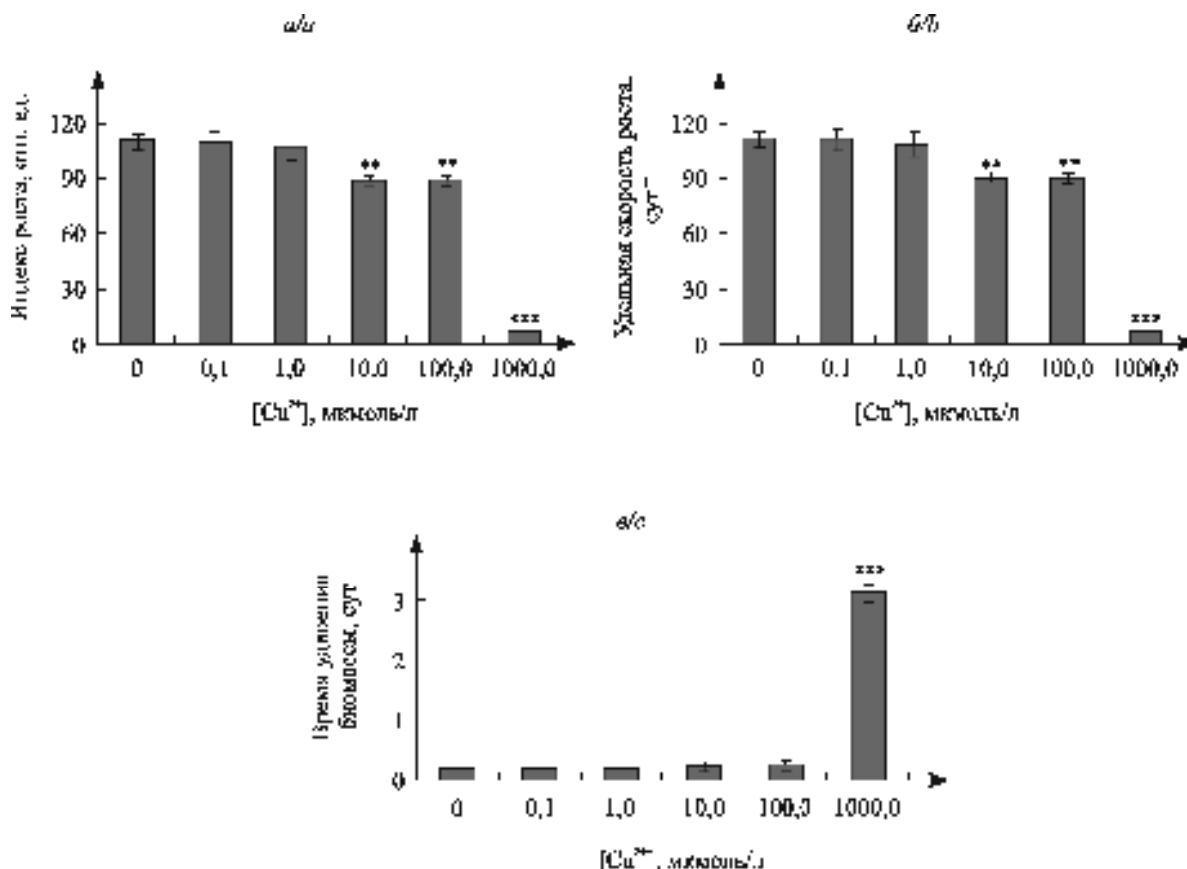


Рис. 3. Изменение роста каллусной культуры *Triticum aestivum* L. при введении в среду выращивания Cu^{2+} в различных концентрациях:

а – индекса роста; б – удельной скорости роста; в – времени удвоения биомассы. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

Fig. 3. Growth parameters of *Triticum aestivum* L. callus culture measured at different concentrations of Cu^{2+} in medium: а – index of the growth; б – specific growth rate; в – time of doubling biomass. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

других наноматериалов, таких как нанокристаллы и углеродные нанотрубки, которые демонстрируют выраженное токсическое влияние на клетки каллусных и суспензионных культур *Medicago sativa* и *Arabidopsis thaliana* [22; 23]. Концентрационный диапазон токсического воздействия медных наночастиц был значительно ниже, чем для изученного ранее негативного влияния серебряных наночастиц на растения арабидопсиса [24]. Токсическое влияние медных наночастиц на растения потенциально может быть связано как с постепенной утечкой металла в ионной форме – Cu^{2+} , так и с воздействием металлической наноформы, способной к ранее неизвестным реакциям, таким как активация механочувствительных ионных каналов, катализирующих чрезмерную загрузку в клетки корня ионов кальция, или подавление фотосинтетических реакций в результате снижения эффективности усвоения квантов света фотосистемой II [24]. Введение 1 ммоль/л Cu^{2+} вызывало воздействие, близкое по силе к наночастицам меди (см. таблицу, рис. 1 и 2), что указывает на специфичность влияния именно металлической наноформы, так как утечка Cu^{2+} даже при концентрации наночастиц 1 г/л не превышает 0,001 % их массы за 1 ч при интенсивном перемешивании суспензии [3; 5]. Балк тоже действовал довольно сильно, однако частицы, использованные в работе, также имели небольшие размеры. Близкое по силе воздействие нано- и макрочастиц показывает, что его эффекты могут быть обусловлены контактом металлической формы меди и балка, а не ионами меди.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлен характер влияния наночастиц меди в составе питательной среды на индукцию каллусогенеза и ростовые показатели каллусной культуры пшеницы. Выявлена разнонаправленная реакция каллусов на действие наночастиц меди и медного балка. На среде культивирования, дополненной низкими концентрациями медных наночастиц, наблюдалось незначительное (статистически недостоверное – от 1 до 2 %) увеличение скорости роста и набора биомассы, в то время как высокие уровни наночастиц многократно снижали скорость роста и другие ростовые показатели. Примечательно, что эффекты наночастиц были сопоставимы с действием Cu^{2+} в концентрации 1 ммоль/л, а стимуляция роста ионами меди в низких концентрациях была выше, чем наночастицами. Интересен также факт, что в случае токсического эффекта низкие уровни Cu^{2+} действовали слабее, нежели наночастицы. Это указывает на особый, базирующийся на наносвойствах механизм токсического действия наночастиц меди на ткани пшеницы в условиях *in vitro*.

Библиографические ссылки

1. Lee W. M., An Y. J., Yoon H., et al. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water insoluble nanoparticles // Environ. Toxicol. Chem. 2008. Vol. 27, № 9. P. 1915–1921.
2. Mura S., Seddaiu G., Bacchini F., et al. Advances of nanotechnology in agro-environmental studies // IJA. 2013.
3. Anjum N. A., Adam V., Kizek R., et al. Nanoscale copper in the soil-plant system – toxicity and underlying potential mechanisms // Environ. Res. 2015. Vol. 138. P. 306–325.
4. Remedios C., Rosario F., Bastos V. Environmental nanoparticles interactions with plants: morphological, physiological, and genotoxic aspects // J. of Botany. 2012.
5. Christian P., von der Kammer F., Baalousha M., et al. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media // Ecotoxicology. 2008. Vol. 17, № 5. P. 326–343.
6. Gibaud S., Demoy M., Andreux J. P., et al. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs // J. Pharm. Sci. 1996. Vol. 85. P. 944–950.
7. Prabhu B. M., Ali S. F., Murdock R. C., et al. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat // Nanotoxicology. 2010. Vol. 4, № 2. P. 150–160.
8. Atha D. H., Wang H., Petersen E. J., et al. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models // Environ. Sci. Technol. 2012. Vol. 46, № 3. P. 1819–1827.
9. Gottschalk F., Nowack B. The release of engineered nanomaterials to the environment // J. Environ. Monitor. 2011. № 13. P. 1145–1155.
10. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO_2 , ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions // Environ. Sci. Technol. 2009. Vol. 43, № 24. P. 9216–9222.
11. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis // Environ. Toxicol. Chem. 2010. Vol. 29, № 5. P. 1036–1048.
12. Демидчик В. В., Соколик А. И., Юрин В. М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи совр. биологии. 2001. Т. 12, № 5. С. 511–525.
13. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London, 1995.
14. Bergmann W. Nutritional disorders of plants – development, visual and analytical diagnosis. Jena, 1992.
15. Суханов В. М., Папаян Н. Д. Условия получения каллуса и регенерантов в культуре незрелых зародышей пшеницы // Апомиксис и цитозембриология растений. 1983. № 5. С. 124–128.
16. Круглова Н. Н., Катасонова А. А. Незрелый зародыш как морфогенетически компетентный эксплант // Физиология и биохимия культур растений. 2009. Т. 41, № 2. С. 124–131.

17. Круглова Н. Н. Периодизация развития зародыша пшеницы для биотехнологических исследований // Аграр. Россия. 2008. № 3. С. 20–22.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1968. Vol. 15, № 13. P. 473–497.
19. Загребельный С. Н. Биотехнология : в 2 ч. Новосибирск, 2000. Ч. 1 : Культивирование продуцентов и очистка продуктов.
20. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. М., 1978.
21. Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants // *Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 43, № 24. P. 9473–9479.
22. Santos A. R., Miguel A. S., Tomaz L., et al. The impact of CdSe/ZnS Quantum Dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture [Electronic resource]. 2010. URL: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/24> (date of access: 25.10.2016).
23. Lin C., Fugetsu B., Su Y., et al. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* suspension cells // *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 170, № 2/3. P. 578–583.
24. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of *Arabidopsis thaliana* plants // *Plant J.* 2016. Vol. 85, № 2. P. 245–257.

References

1. Lee W. M., An Y. J., Yoon H., et al. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water insoluble nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* 2008. Vol. 27, No. 9. P. 1915–1921.
2. Mura S., Seddaiu G., Bacchini F., et al. Advances of nanotechnology in agro-environmental studies. *IJA.* 2013. DOI: 10.4081/ija.2013.e18.
3. Anjum N. A., Adam V., Kizek R., et al. Nanoscale copper in the soil-plant system – toxicity and underlying potential mechanisms. *Environ. Res.* 2015. Vol. 138. P. 306–325. DOI: 10.1016/j.envres.2015.02.019.
4. Remedios C., Rosario F., Bastos V. Environmental nanoparticles interactions with plants: morphological, physiological, and genotoxic aspects. *J. of Botany.* 2012. ID 751686. DOI: 10.1155/2012/751686.
5. Christian P., von der Kammer F., Baalousha M., et al. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology.* 2008. Vol. 17, No. 5. P. 326–343.
6. Gibaud S., Demoy M., Andreux J. P., et al. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J. Pharm. Sci.* 1996. Vol. 85. P. 944–950.
7. Prabhu B. M., Ali S. F., Murdock R. C., et al. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology.* 2010. Vol. 4, No. 2. P. 150–160.
8. Atha D. H., Wang H., Petersen E. J., et al. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environ. Sci. Technol.* 2012. Vol. 46, No. 3. P. 1819–1827.
9. Gottschalk F., Nowack B. The release of engineered nanomaterials to the environment. *J. Environ. Monitor.* 2011. No. 13. P. 1145–1155. DOI: 10.1039/c0em00547a.
10. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 43, No. 24. P. 9216–9222. DOI: 10.1021/es9015553.
11. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010. Vol. 29, No. 5. P. 1036–1048. DOI: 10.1002/etc.135.
12. Demidchik V. V., Sokolik A. I., Yurin V. M. The toxicity of excess copper and tolerance to it plants. *Successes of modern biology.* 2001. Vol. 12, No. 5. P. 511–525 (in Russ.).
13. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London, 1995.
14. Bergmann W. Nutritional disorders of plants – development, visual and analytical diagnosis. Jena, 1992.
15. Sukhanov V. M., Papazian N. D. Conditions for obtaining a callus and regenerated in the culture of immature embryos of wheat. Apomixis and cytoembryology plants. 1983. No. 5. P. 124–128 (in Russ.).
16. Kruglova N. N., Katasonova A. A. Immature wheat embryo as the morphogenetically competent explant. *Physiol. and biochem. of plants cult.* 2009. Vol. 41, No. 2. P. 124–131 (in Russ.).
17. Kruglova N. N. Periodization of wheat embryo germ for biotechnology research. *Agrarian Russia.* 2008. No. 3. P. 20–22 (in Russ.).
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1968. Vol. 15, No. 13. P. 473–497.
19. Zagrebelsky S. N. Biotechnology : in 2 parts. Novosibirsk, 2000. Part 1 : Cultivation of producers and cleaning products (in Russ.).
20. Rokitsky P. F. Biological Statistics. Moscow, 1978 (in Russ.).
21. Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 43, No. 24. P. 9473–9479.
22. Santos A. R., Miguel A. S., Tomaz L., et al. The impact of CdSe/ZnS Quantum Dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture [Electronic resource]. 2010. URL: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/24> (date of access: 25.10.2016).
23. Lin C., Fugetsu B., Su Y., et al. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* suspension cells. *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 170, No. 2/3. P. 578–583.
24. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* 2016. Vol. 85, No. 2. P. 245–257.

Статья поступила в редколлегию 16.01.2017.
Received by editorial board 16.01.2017.

АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА РОСТ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕНОМНЫХ ПОДХОДОВ

**В. Ю. БОНДАРЕНКО¹⁾, А. И. СОКОЛИК¹⁾, А. А. ВЕТОШКИН¹⁾,
В. Н. ЖАБИНСКИЙ²⁾, В. А. ХРИПАЧ²⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾**

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Изучено воздействие значимых с точки зрения фундаментальной и прикладной биологии растений brassinостероидов (эпибрассинолид, гомобрассинолид и эпикастастерон) на ростовые процессы и архитектуру корней злаковых культур. В качестве объекта были использованы корни яровой пшеницы сорта Василиса белорусской селекции. Эксперименты проводились в оригинальной феномной установке, разработанной авторами и состоящей из прямоугольных стеклянных сосудов, в которые помещались пластиковые пластины с каналами 4 × 4 мм. Все испытанные brassinостероиды оказывали ингибирующее влияние на удлинение корней проростков пшеницы. Выявлено значительное различие дозовых зависимостей эффектов гомобрассинолида и эпикастастерона и внешнее сходство эффектов гомобрассинолида и эпикастастерона. Установлено, что отрицательный эффект ингибирования длины корней сопровождался увеличением их толщины, а также возрастанием длины корневых волосков вплоть до концентрации 10⁻¹⁰–10⁻⁹ моль/л для всех испытанных brassinостероидов. Таким образом, развит и апробирован новый подход к анализу фенотипа корня, позволяющий быстро и точно измерять интегральные ростовые реакции и изменения корневой архитектуры. С использованием данного подхода выявлены закономерности изменения фенотипических показателей корней пшеницы при воздействии brassinостероидов.

Ключевые слова: brassinостероиды; рост и развитие корней; феномные подходы; пшеница.

Образец цитирования:

Бондаренко В. Ю., Соколик А. И., Ветошкин А. А., Жабинский В. Н., Хрипач В. А., Демидчик В. В. Анализ воздействия brassinостероидов на рост корней пшеницы с использованием феномных подходов // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 31–37.

For citation:

Bondarenko V. Y., Sokolik A. I., Vetoshkin A. A., Zhabinsky V. N., Khripach V. A., Demidchik V. V. The analysis of brassinosteroid effects on wheat root growth using phenotyping techniques. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 31–37 (in Russ.).

Авторы:

Владислав Юрьевич Бондаренко – студент биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Алексей Александрович Ветошкин – студент биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Владимир Николаевич Жабинский – доктор химических наук, доцент; главный научный сотрудник лаборатории химии стероидов.

Владимир Александрович Хрипач – академик НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор; заведующий лабораторией химии стероидов.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Vladislav Bondarenko, student at the faculty of biology.
vlad.bondarenko.1995@list.ru

Anatoliy Sokolik, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

sokolik@bsu.by

Alexey Vetoshkin, student at the faculty of biology.

aleksey.vetoshkin@mail.ru

Vladimir Zhabinsky, doctor of science (chemistry), docent; chief researcher at the laboratory of steroid chemistry.

vz@ns.iboch.ac.by

Vladimir Khripach, academician of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (chemistry), full professor; head of the laboratory of steroid chemistry.

khripach@iboch.bas-net.by

Vadim Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

demidchik@bsu.by

Благодарность. Работа проводилась в рамках проекта «Установление сигнальной роли экзогенного аскорбата в клетках корня высших растений» (2015–2017), № ГР 20151026 (научный руководитель – В. В. Демидчик), Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований. Работа также финансировалась Министерством образования Республики Беларусь в рамках ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограммы «Биорегуляторы растений» по заданию «Установление закономерностей воздействия брассиностероидов на корневую систему для направленного синтеза новых биорегуляторов растений» (научный руководитель – А. И. Соколик).

THE ANALYSIS OF BRASSINOSTEROID EFFECTS ON WHEAT ROOT GROWTH USING PHENOTYPING TECHNIQUES

V. Y. BONDARENKO^a, A. I. SOKOLIK^a, A. A. VETOSHKIN^a,
V. N. ZHABINSKY^b, V. A. KHRIPACH^b, V. V. DEMIDCHIK^b

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bInstitute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
acad. V. F. Kuprevich street, 5, building 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: sokolik@bsu.by

Growth reactions of wheat root on 10^{-12} – 10^{-7} mol/l 24-epibrassinolide (EB), 28-homobrassinolide (HB) and 24-epicastasteron (EC) were examined. Wheat cultivar Vasilisa was used. All tested BRs demonstrated inhibitory action on wheat root length. Dose-dependence of the effect showed complex bell-like shape. Low BR levels induced reactions similar to highest BR levels. Concentrations of 10^{-10} – 10^{-9} mol/l caused maximal inhibition of root growth rate. At the same time, root diameter significantly increased after BR treatment, as did mean roots hair length. So the volume of the root did not change significantly while their architecture was dramatically modified by BRs. Manually performed root growth measurements were compared with tests by phenotyping and demonstrated that the designed phenotyping techniques provided very accurate data. The root architecture phenotyping also yielded accurate results. Overall, phenotyping method showed that BRs inhibited wheat root growth and induced increase of root diameter and length of root hairs.

Key words: brassinosteroids; root growth and development; phenomic approach; wheat.

Acknowledgements. This study was carried out as a part of the project «Establishing signalling role of exogenous ascorbate in plant root cells» (2015–2017), state registration number 20151026, supervisor – V. V. Demidchik, funded by Belarusian republican foundation for fundamental research. It was also supported by Belarusian ministry of education and State research program scheme «Chemical technologies and materials», project «Determination of mechanisms of brassinosteroid action on plant root system for directed synthesis of new plant bio-regulators» (supervisor – A. I. Sokolik).

Введение

Брассиностероиды (БС) – класс растительных полигидроксистероидов, структурно родственных стероидным гормонам животных. Одной из особенностей БС является способность воздействовать на процессы роста и развития растения в крайне низких концентрациях (10^{-12} – 10^{-7} моль/л) [1; 2]. Проведенные исследования продемонстрировали эффективность БС в качестве регуляторов ключевых физиологических процессов у высших растений, в частности стрессовых ответов, роста корней, развития цветка и апикального доминирования [3; 4]. Кроме того, есть данные, согласно которым брассиностероиды взаимодействуют с растением путем связывания со специфическими рецепторными киназами BRI-1 на поверхности плазматической мембраны, что приводит к запуску брассиностероид-специфических сигнальных реакций и модификации метаболических и физиологических процессов [1]. Активация BRI-1-рецепторов приводит к стимуляции входа Ca^{2+} через плазматическую мембрану в клетку и росту цитоплазматической активности Ca^{2+} [2; 5]. Данная реакция обнаружена для эпикастастерона (ЭК), эпибрассинолида (ЭБ), ряда других брассиностероидов и опосредуется активацией Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов плазматической мембраны [2; 5].

Исследования физиологической роли БС сфокусированы на надземных органах растений. Работ по анализу воздействия данных гормонов на развитие корневой системы, особенно выполненных в модельных опытах с помощью современных подходов, недостаточно, хотя корневая система растений также играет важнейшую роль в обеспечении ключевых процессов в них, а ее рост и развитие обуславливают

устойчивость к неблагоприятным факторам среды и «программируют» высокую продуктивность растений. Проблема исследования эффектов воздействия БС на корневую систему растений заключается в высокой трудоемкости и субъективности проводимых анализов, чаще всего выполняемых полностью вручную. Феномные подходы, развивающиеся в последние годы, могут существенно повысить эффективность измерений роста и развития корня, а также избавить от проблемы субъективности анализа.

Феномика – новое направление в современной биологии, решающее задачи выявления закономерностей формирования и изменения фенотипа организма при помощи неинвазивных методов измерения и биоинформационных подходов. Отличием феномики от классических низкоэффективных морфометрических измерений является автоматизация получения изображений, сохранения и обсчета данных, а также использование алгоритмов распознавания изображений.

Цель настоящей работы – выявление влияния наиболее значимых с точки зрения фундаментальной и прикладной биологии растений БС – гомобрассинолида (ГБ) и ЭК – на ростовые процессы и архитектуру корня высших растений с использованием феномных подходов. В качестве объекта исследования была взята пшеница как важнейший для сельского хозяйства вид, в то же время плохо изученный в плане воздействия БС.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовались корни проростков яровой пшеницы сорта Василиса белорусской селекции. Была сконструирована специальная установка, состоящая из прямоугольных стеклянных сосудов, в которые помещали прозрачные пластиковые пластины с каналами шириной 4×4 мм, заключенные в изготовленный из оргстекла держатель. Общий вид установки представлен на рис. 1.

Сосуды заполняли необходимым по условиям опыта раствором – разбавленной в соотношении 1 : 5 средой Кнопа (контроль) и с добавлением к контролю испытуемого БС в заданной концентрации (диапазон – от 10^{-12} до 10^{-7} моль/л). Далее, корни проростков пшеницы, выращенных в бумажных рулонах до 3–4-дневного возраста, аккуратно отделяли от бумаги и помещали в каналы пластин так, чтобы каждый корешок размещался в отдельном канале. Среда в камере и каналах периодически обновлялась с помощью подведенной тонкой пластиковой канюли в нижнюю часть каждого канала. Раствор подавался в направлении снизу вверх. Световой режим выбран в последовательности 8 ч темноты и 16 ч света.

Камеры с растениями фотографировали два раза в сутки в определенные моменты времени, затем по фотографиям определяли длину корней. Кроме этого, проводили микрофотографирование зоны корневых волосков: определяли толщину каждого корня и длину корневых волосков. Продолжительность выращивания растений в камерах феномной установки составляла 8 сут.

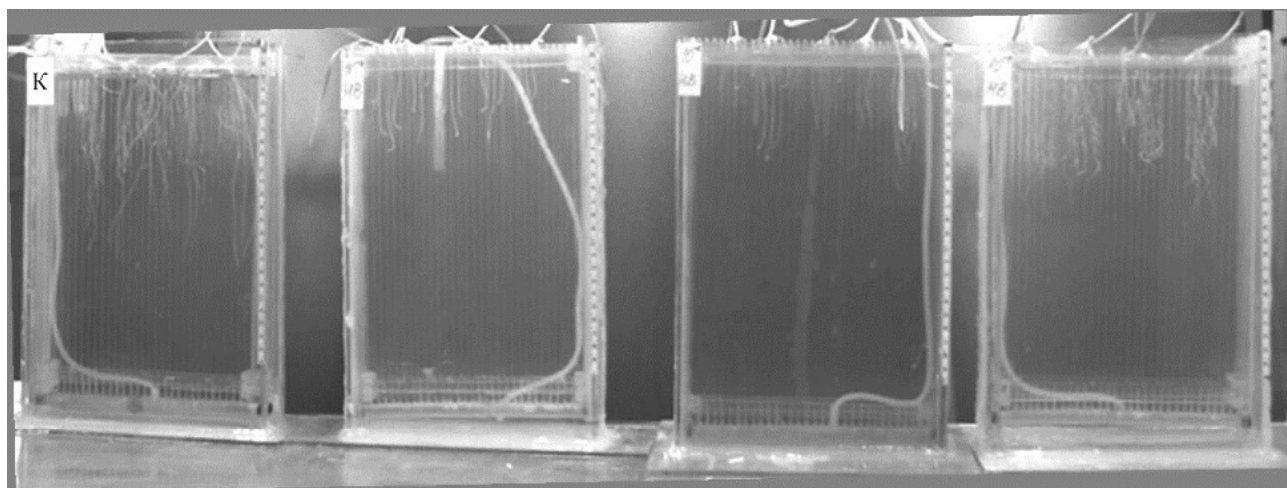


Рис. 1. Общий вид феномной установки для изучения корней проростков пшеницы. Буквой «К» отмечен вариант контроля, затем (слева – направо) расположены варианты с добавлением 10^{-7} ; 10^{-8} и 10^{-9} моль/л ГБ соответственно

Fig. 1. Setup-up for phenotyping wheat roots. «K» is control, then (from left to right) there are treatments by 10^{-7} ; 10^{-8} and 10^{-9} mol/l HB respectively

Результаты исследований и их обсуждение

Концентрационные зависимости воздействия БС на длину корней пшеницы представлены на рис. 2. Величина эффекта определялась как разность средней длины корней в контроле (0,0) в конце выращивания и в среде с БС по отношению к длине корней в контроле. Характер наблюдаемого воздействия был сложным и варьировал в зависимости от концентрации БС в среде. Можно отметить, что ЭБ (см. рис. 2, в) вызывал практически полное торможение роста при наименьшей концентрации (10^{-12} моль/л), в то время как ГБ (см. рис. 2, а) обуславливал схожий эффект при концентрациях на порядок выше. Обращает на себя внимание «выпадение» значений эффекта ингибирования при концентрации 10^{-9} – 10^{-10} моль/л для всех веществ. Примечательной особенностью воздействия ЭБ было то, что при повышении его уровня (начиная с 10^{-12} моль/л) первично сильное ингибирование сменялось менее выраженным и постепенно снижалось до величины порядка 0,25 при 10^{-7} моль/л (см. рис. 2, в).

Имеется очень мало сведений о влиянии БС на корень высших растений, полученных с использованием неинвазивных методов измерения [1; 12; 13]. Чаще всего в литературе регистрировались показатели, характеризующие надземные части растений [1], например степень раскрытия листа пшеницы, степень удлинения эпи- и гипокотилей бобов и томатов [6]. Хорошо известны мощные эффекты воздействия ЭБ на увеличение урожая, массы семян при действии на растения ячменя и пшеницы [8; 9]. Тем не менее зарегистрировано и ингибирующее воздействие БС на рост корней некоторых растений,

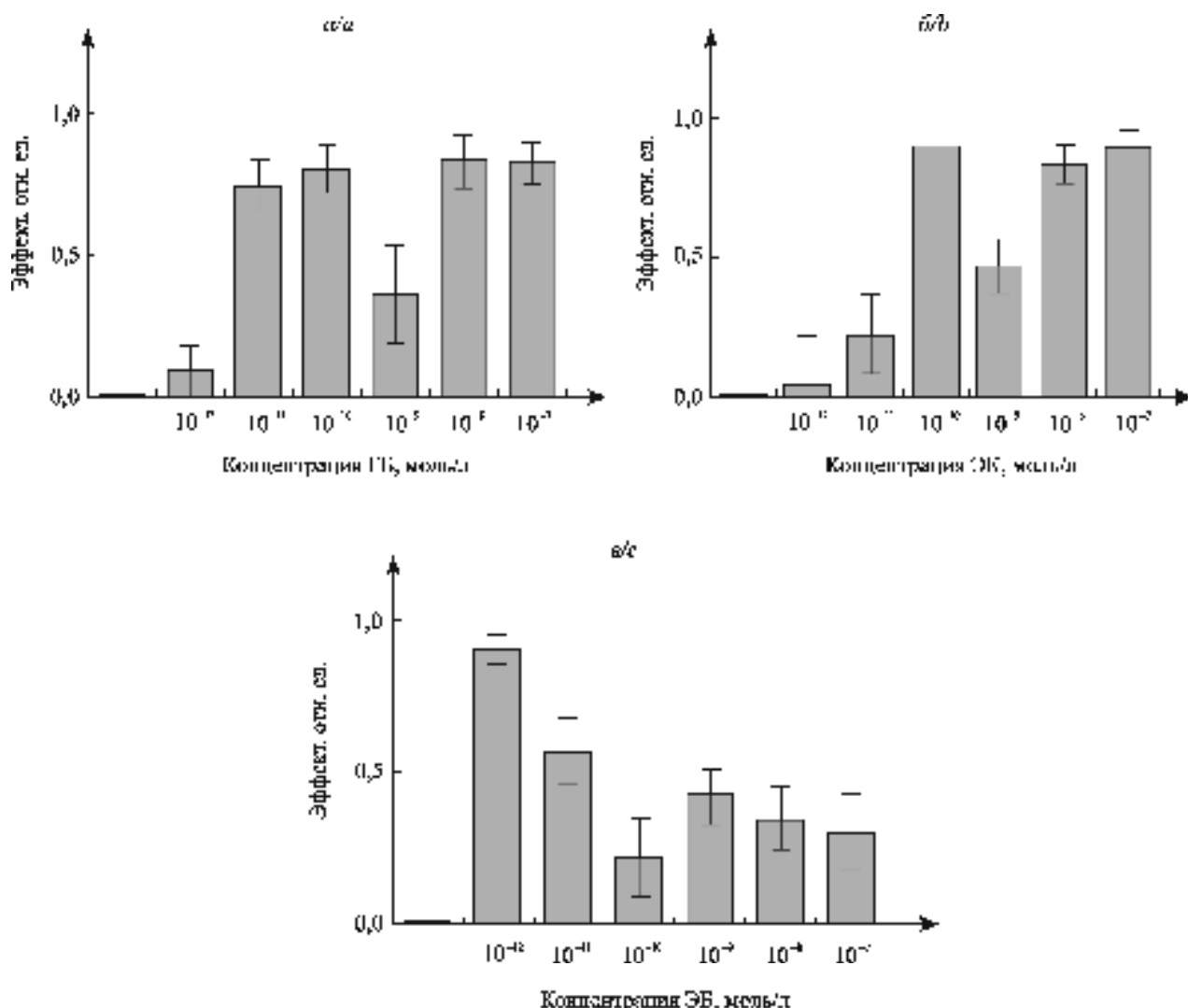


Рис. 2. Концентрационные зависимости ингибирующего действия БС на рост корней проростков пшеницы.

Относительная величина эффекта вычислялась как разность средней длины корней в контроле в конце выращивания и в среде с брассиностероидом по отношению к длине корней в контроле

Fig. 2. The mean inhibitory effect of brassinosteroids on wheat root growth. Values of inhibitory effect were calculated as difference between mean root length in control and mean root length after treatment by brassinosteroid divided by root length in control

например арабидопсиса и плаунов [7]. Имеются данные по увеличению размера корней риса при низких уровнях БС в среде [10]. У растений турецкого гороха отмечено увеличение длины корней на 25 % при воздействии 10^{-9} моль/л ЭБ [11].

Детальное исследование воздействия БС на рост корней было проведено с использованием модельных растений арабидопсиса [13]. Оно показало, что в концентрациях $5 \cdot 10^{-11}$ моль/л важнейшие БС стимулируют рост корней у растений дикого типа, а также восстанавливают нормальный рост у БС-дефицитных нокаутных мутантов [13]. Однако более высокие уровни БС подавляли рост корней растений дикого типа. Примечательно, что действие БС в этом случае было синергичным с важнейшими природными ауксинами, что дает возможность предположить наличие общей мишени для действия данных гормонов в корневой системе. Тем не менее для злаковых растений систематические исследования широкого диапазона концентраций БС пока не проводились.

Полученные данные по влиянию БС на важные показатели функциональной активности корня – его толщину и длину корневых волосков – приведены на рис. 3. Можно отметить возрастание толщины корня по мере роста концентрации всех веществ (см. рис. 3, а). Эпибрассинолид и гомобрассинолид индуцировали монотонное увеличение этого параметра, в то время как действие эпикастастерона имеет более сложный характер. Относительно небольшой положительный эффект вещества в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-8} моль/л прерывается значительным возрастанием толщины корня при концентрации препарата 10^{-10} моль/л. При повышении концентрации до 10^{-7} моль/л толщина корня вновь существенно возрастала. Отметим, что при этой концентрации все три испытанных БС вызывали практически одинаковое значительное увеличение толщины корня.

Эффекты носили иной характер в случае влияния БС на длину корневых волосков (см. рис. 3, б). Эпибрассинолид вызывал возрастание их длины по мере роста концентрации до 10^{-9} моль/л, после чего зафиксировано постепенное укорочение. Аналогичное воздействие оказывал ГБ. Действие ЭК и в этом случае имеет существенные отличия: удлинение волосков, вызванное концентрацией вещества 10^{-12} моль/л, при дальнейшем ее росте уменьшалось и сменялось укорочением (10^{-10} моль/л), которое, в свою очередь, снижалось при концентрации 10^{-8} моль/л. Затем при концентрации 10^{-7} моль/л происходило более сильное укорочение. Заметно, что начиная с концентрации 10^{-9} моль/л все испытанные БС оказывали схожее воздействие на длину корневых волосков.

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что ингибирующее воздействие на рост корней пшеницы оказывают все испытанные БС независимо от природы (как лактонной – ГБ и ЭБ, так и кетонной – ЭК). Следует отметить значительное различие дозовых зависимостей эффекта ГБ и ЭБ и внешнее сходство эффектов ГБ и ЭК. В целом снижение скорости роста корней можно считать отрицательным эффектом для растения, так как при этом снижается поглотительная активность корневой системы.

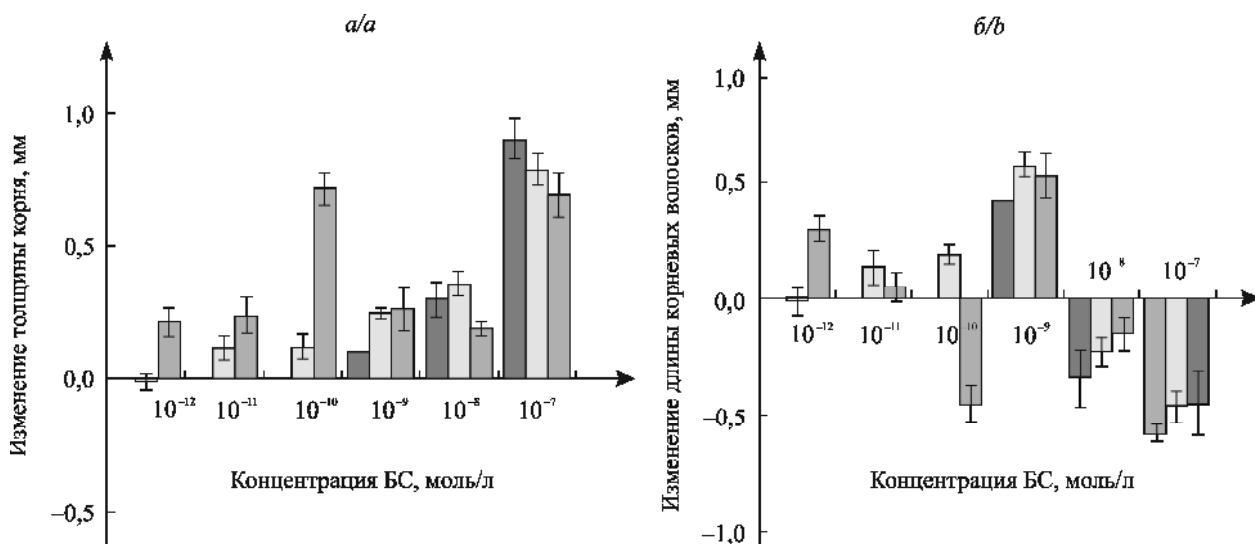


Рис. 3. Влияние ГБ, ЭБ и ЭК на толщину корней (а) и длину корневых волосков (б) проростков пшеницы.

Показатели на вертикальных осях в обоих случаях (а/а; б/б) представляют разность значений параметра в варианте опыта и контроле.

■ – ГБ; □ – ЭБ; ■ – ЭК

Fig. 3. The effect of HB, EB and EC on wheat root diameter (a) and length of root hairs (b).

In both panels, Y-axis shows difference between test and control.

■ – HB; □ – EB; ■ – EC

Однако, как показывают результаты рис. 3, а, этот отрицательный эффект может компенсироваться увеличением толщины корня и, что может быть более важным, возрастанием длины корневых волосков вплоть до концентрации 10^{-9} моль/л для всех испытанных БС. Ранее в литературе не были описаны обработки фитогормонами, которые достоверно вызывали значительное усиление роста корневых волосков и увеличение диаметра основного корня. Такие реакции могут быть необходимы при росте растения на участках почвы, богатых минеральными элементами и водой. Торможение роста при увеличении объема корня и его всасывательной поверхности – фундаментальное физиологическое явление, регуляция которого под действием БС может быть критически значимой в жизни высших растений, включая важнейшие сельскохозяйственные культуры, например пшеницу.

Заключение

Таким образом, можно констатировать, что действие БС на ростовые процессы корня пшеницы и его корневых волосков носит сложный многофазный характер и в значительной степени зависит от вида БС. Оно выражается в ингибировании удлинения основного корня при одновременном значительном увеличении диаметра и длины корневых волосков. Данная реакция может иметь большое физиологическое значение как в развитии ответа на стресс-факторы, так и в процессах онтогенеза. Можно заключить, что развитый метод фенотипирования корневой системы злаковых растений позволяет быстро и точно изучить интегральную реакцию растений на действие различных внешних факторов.

Библиографические ссылки

1. Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence // *Nature*. 2007. № 448 (7152). P. 497–500.
2. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants // *Steroids*. 2015. Vol. 97, № 5. P. 98–106.
3. Хрипач В. А., Жабинский В. Н., Лахвич Ф. А. Брассиностероиды. Минск, 1993.
4. Pereira-Netto A. B. Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health. New York, 2012.
5. Dodd A. N., Kudla J., Sanders D. The Language of Calcium Signaling // *Annual Review Plant Biol.* 2010. Vol. 61. P. 593–620.
6. Zullo M. A. T., Adam G. Brassinosteroid phytohormones – structure, bioactivity and applicatios // *Brazilian J. Plant physiol.* 2002. № 14 (3). P. 143–181.
7. Cheon J., Fujioka S., Dilkes B. P., et al. Brassinosteroids Regulate Plant Growth through Distinct Signaling Pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis* // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, issue 12. e81938.
8. Прусакова Л. Д., Чижова С. И., Хрипач В. А. Устойчивость к полеганию и продуктивность ярового ячменя и многолетней пшеницы под влиянием брассиностероидов // *Сельскохозяйственная биология*. 1995. № 1. С. 93.
9. Takematsu T., Ikekawa N., Shida A. Increasing the yield of cereals by means of brassinolide derivatives // *US Patent*. 1988. 4,767,442.
10. Kim K. S., Sa J. G. Effects of plant growth regulator, brassinolide, on seedling growth in rice (*Oryza sativa* L.) // *Research Reports of Rural Development Administration (Suweon)*. 1989. Vol. 31 (1, Rice). P. 49–53.
11. Singh J., Nakamura S., Ota Y. Effect of epibrassinolide on gram (*Cicer arietinum*) plants grown under water stress in juvenil stage // *Indian J. of Agricult. Sciences*. 1993. Vol. 63. P. 395–397.
12. Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses // *Plant Physiol. and Biochem.* 2009. Vol. 47, № 1. P. 1–8.
13. Müssig C., Shin G.-H., Altmann T. Brassinosteroids Promote Root Growth in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133, № 3. P. 1261–1271.

References

1. Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*. 2007. No. 448 (7152). P. 497–500. DOI: 10.1038/nature05999.
2. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants. *Steroids*. 2015. Vol. 97, No. 5. P. 98–106.
3. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Lakhvich F. A. Brassinosteroids. Minsk, 1993 (in Russ.).
4. Pereira-Netto A. B. Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health. New York, 2012. DOI: 10.2174/97816080529811120101.
5. Dodd A. N., Kudla J., Sanders D. The Language of Calcium Signaling. *Annual Review Plant Biol.* 2010. Vol. 61. P. 593–620. DOI: 10.1146/annurev-arplant-070109-104628.
6. Zullo M. A. T., Adam G. Brassinosteroid phytohormones – structure, bioactivity and applicatios. *Brazilian J. Plant physiol.* 2002. No. 14 (3). P. 143–181.
7. Cheon J., Fujioka S., Dilkes B. P., et al. Brassinosteroids Regulate Plant Growth through Distinct Signaling Pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis*. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, issue 12. e81938. DOI: 10.1371/journal.pone.0081938.
8. Prusakova L. D., Chizhova S. I., Khripach V. A. Resistance to lodging and yielding capacity of cereals under effect of brassinosteroids. *Agric. Biol.* 1995. No. 1. P. 93 (in Russ.).

9. Takematsu T., Ikekawa N., Shida A. Increasing the yield of cereals by means of brassinolide derivatives. *US Patent*. 1988. 4,767,442.
10. Kim K. S., Sa J. G. Effects of plant growth regulator, brassinolide, on seedling growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Research Reports of Rural Development Administration (Suweon)*. 1989. Vol. 31 (1, Rice). P. 49–53.
11. Singh J., Nakamura S., Ota Y. Effect of epibrassinolide on gram (*Cicer arietinum*) plants grown under water stress in juvenil stage. *Indian J. Agricult. Sciences*. 1993. Vol. 63. P. 395–397.
12. Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. and Biochem.* 2009. Vol. 47, No. 1. P. 1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002.
13. Müssig C., Shin G.-H., Altmann T. Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133, No. 3. P. 1261–1271. DOI: 10.1104/pp.103.028662.

Статья поступила в редколлегию 20.01.2017.
Received by editorial board 20.01.2017.

ИНДУКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ У РАСТЕНИЙ РАПСА К ЗАСОЛЕНИЮ ЭЛИСИТОРАМИ – ПРОИЗВОДНЫМИ БАКТЕРИЙ РОДОВ *PSEUDOMONAS* И *BACILLUS*

И. А. ГРИНЕВА¹⁾, Ю. М. КУЛЕШОВА¹⁾, В. А. ЛОМОНОСОВА¹⁾, Д. В. МАСЛАК¹⁾, Л. Е. САДОВСКАЯ¹⁾,
Т. Л. СКАКУН¹⁾, И. Н. ФЕКЛИСТОВА¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Установлено, что элиситоры, являющиеся производными бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494, способны при высоком уровне засоления (250 ммоль/л NaCl) одновременно увеличивать энергию прорастания и полевую всхожесть растений рапса. Оптимизированы условия совместного культивирования названных бактериальных штаммов. Определен оптимальный вариант

Образец цитирования:

Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Скакун Т. Л., Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Индукция устойчивости у растений рапса к засолению элиситорами – производными бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 38–43.

For citation:

Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., Maslak D. V., Sadvovskaya L. E., Skakun T. L., Feklistova I. N., Maksimova N. P. Induction of resistance to salinization in rape plants under the influence of elicitors derived from *Pseudomonas* and *Bacillus* bacteria. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 38–43 (in Russ.).

Авторы:

Ирина Александровна Гринева – старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Юлия Михайловна Кулешова – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Вероника Александровна Ломоносова – научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Диана Викторовна Маслак – заведующий сектором молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Людмила Евгеньевна Садовская – старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Татьяна Леонидовна Скакун – старший научный сотрудник сектора молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Николаевна Феклистова – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

Authors:

Irina Grineva, senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

grineva_ia@mail.ru

Yulia Kuleshova, PhD (biology); senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

yuliakuleshova@yahoo.co.uk

Veronica Lomonosova, researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

nikaglad@gmail.com

Diana Maslak, head of the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

diana-maslak@yandex.ru

Ludmila Sadvovskaya, senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

ludmilasadvovskaya@rambler.ru

Tatyana Skakun, senior researcher at the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

stanysik@yandex.ru

Irina Feklistova, PhD (biology); head of the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

feklistova_iren@rambler.ru

Natalia Maksimova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

nataliamaksimova@yahoo.com

элиситорного препарата для повышения способности растительного организма формировать индуцированную системную устойчивость у растений рапса при засолении 150 ммоль/л NaCl, которая проявилась в достоверном повышении полевой всхожести рапса на 20 % и увеличении длины стебля на 19 %. Бактерии *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 выращивали на среде М9 с мелассой при 28 °C в течение 4 ч, а затем продолжали культивирование при 35 °C до 48 ч. Опытный образец элиситорного препарата был приготовлен путем термической обработки (100 °C, 15 мин) полученной культуральной жидкости.

Ключевые слова: *Pseudomonas*; *Bacillus*; элиситоры; растения рапса; засоление.

INDUCTION OF RESISTANCE TO SALINIZATION IN RAPE PLANTS UNDER THE INFLUENCE OF ELICITORS DERIVED FROM *PSEUDOMONAS* AND *BACILLUS* BACTERIA

I. A. GRINEVA^a, Y. M. KULESHOVA^a, V. A. LOMONOSOVA^a, D. V. MASLAK^a, L. E. SADOVSKAYA^a,
T. L. SKAKUN^a, I. N. FEKLISTOVA^a, N. P. MAKSIMOVA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: grineva_ia@mail.ru

It was established that bacterial elicitors from *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 and *B. subtilis* 494 are capable to increase both the seed vigor and germination of rape plants under high level of salinity condition (250 mmol/l NaCl). Co-cultivation conditions of selected bacterial strains were optimized. The most effective elicitor's variant capable to enhance the ability of the rape plants to generate induced systemic resistance (ISR) under salinity 150 mmol/l NaCl was selected. ISR manifested in a significant increasing of rape plants germination by 20 % and the stem length increased by 19 %. This test elicitor's sample was prepared with heat treatment (100 °C, 15 min) of the culture broth containing *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 and *B. subtilis* 494 grown in M9 medium with molasses at 28 °C for 4 h and then at 35 °C to 48 h.

Key words: *Pseudomonas*; *Bacillus*; elicitors; rape plants; salinization.

Введение

Способность микроорганизмов PGPR-группы стимулировать иммунитет растений и ускорять их рост была открыта более 20 лет тому назад [1, с. 495; 2, с. 728; 3, с. 1508]. Растения, обработанные ризосферными непатогенными бактериями, активируют множественные защитные ответы, которые выражаются в формировании химических и физических барьеров на пути проникновения и развития патогена, включают механизмы, позволяющие выжить в сложившихся неблагоприятных условиях, т. е. в растительном организме возникает индуцированная системная устойчивость к биотическим и абиотическим факторам ISR-типа (ISR – induced systemic resistance) [2, с. 728; 3, с. 1508]. Биопрепараты, в основе действия которых лежит принцип формирования системной устойчивости у растений, обладают рядом преимуществ: они экологически безопасны, не вызывают появления резистентности фитопатогенов, увеличивают урожайность, не накапливаясь в конечном продукте, а также, в отличие от других препаратов, имеют низкие нормы расхода.

В научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ ранее был проведен скрининг коллекции нефитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* на способность проявлять антагонистические свойства относительно грибных и бактериальных фитопатогенов, мобилизовать фосфаты и расти на среде без источников азота. Кроме того, у штаммов *Pseudomonas*, способных улучшать минерализацию почвы и являющихся антагонистами фитопатогенов, ранее была обнаружена и изучена способность стимулировать рост растений, а также проведен ее сравнительный анализ с использованием модельной культуры рапса. По совокупности полезных свойств были отобраны наиболее перспективные в качестве основы для создания биопрепарата бактериальные штаммы [4, с. 154]. Исследования показали, что обработка некоторыми штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, в том числе *P. aurantiaca* В-162 (после дополнительной идентификации *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162) и *P. putida* F19, приводила к наиболее интенсивному удлинению корней 10-дневных проростков рапса. Эти штаммы бактерий включены в работы по созданию основы элиситорного биопрепарата.

Кроме того, было выдвинуто предположение, что в состав потенциального элиситорного препарата также могут быть включены бактерии PGPR-группы *Bacillus subtilis* 494. Дополнение состава

потенциального элиситорного препарата на основе бактерий рода *Pseudomonas* штаммом *B. subtilis* 494 обусловлено наличием ранее установленных нами мощных антибиотических и ростостимулирующих свойств [5, с. 225–227; 6, с. 183–185], а также связано с описываемым в литературных источниках явлением большей эффективности комплексных элиситорных препаратов по сравнению с монопрепаратами [7, с. 182; 8, с. 141; 9, с. 45].

Материалы и методы исследования

В работе использованы штаммы бактерий *Pseudomonas* «флуоресцирующей группы» коллекции биологического факультета БГУ *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *P. putida* F19, а также штамм *B. subtilis* 494.

Посевной материал бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494 получали при индивидуальном культивировании. Дальнейшее совместное культивирование бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 или *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494 производили в колбах Эрленмейера с 50 мл среды на основе солевого концентрата М9 или солевого концентрата Канада с мелассой (1 %); общее количество посевного материала – 5 %, соотношение штаммов в посевном материале составляло 1 : 1; культивирование проводили при 28 °С в течение 4 ч, затем при 35 °С – до 48 ч; титр каждого штамма бактерий в образцах – не менее $1 \cdot 10^7$ КОЕ.

В целях получения элиситорного препарата культивированные вышеописанным методом бактериальные суспензии термически обрабатывали при 100 °С в течение 15 мин, хранили при комнатной температуре в герметично закупоренных сосудах.

Для изучения индукции устойчивости к засолению у растений при обработке элиситорными препаратами семена рапса сорта Зорный проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри с 5 мл раствора NaCl (250 или 150 ммоль/л) и образцами элиситорных препаратов, разведенных в 100 и 1000 раз. Результаты оценивали по изменениям параметров роста трех- и семидневных проростков.

Результаты исследований и их обсуждение

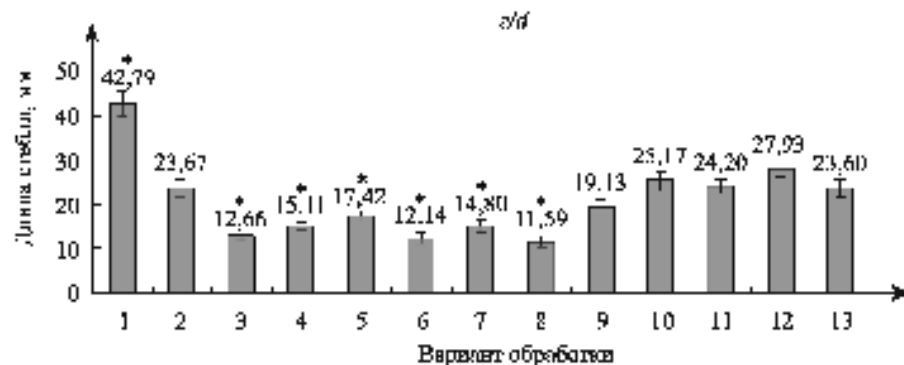
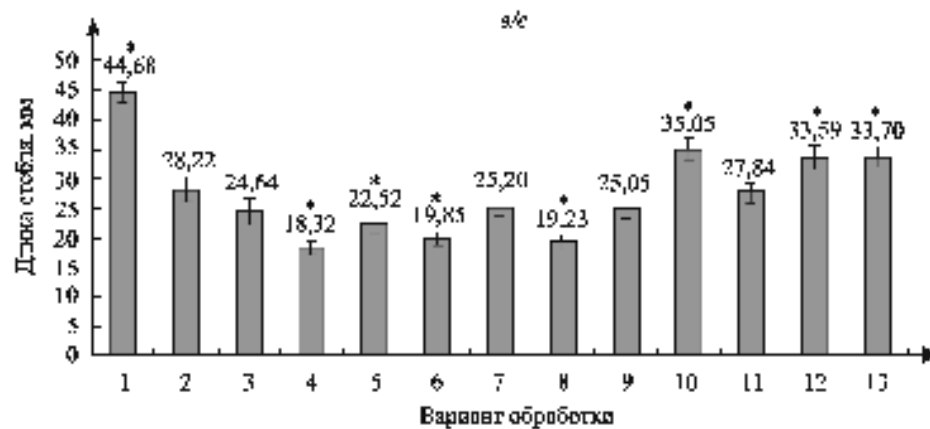
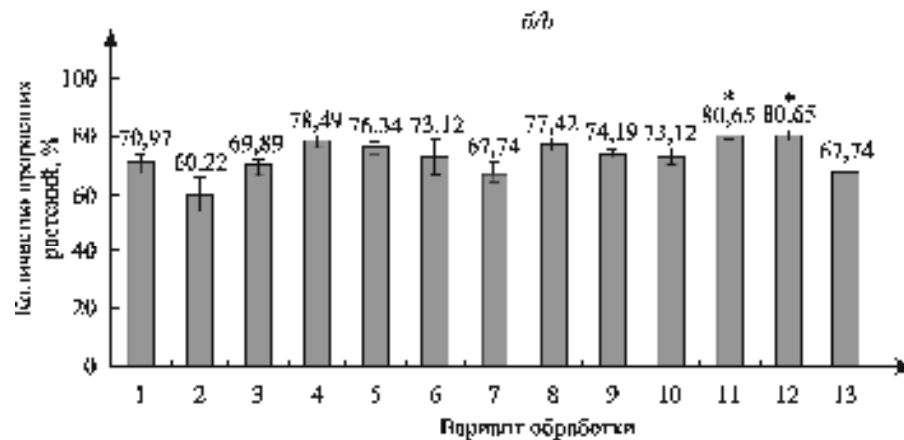
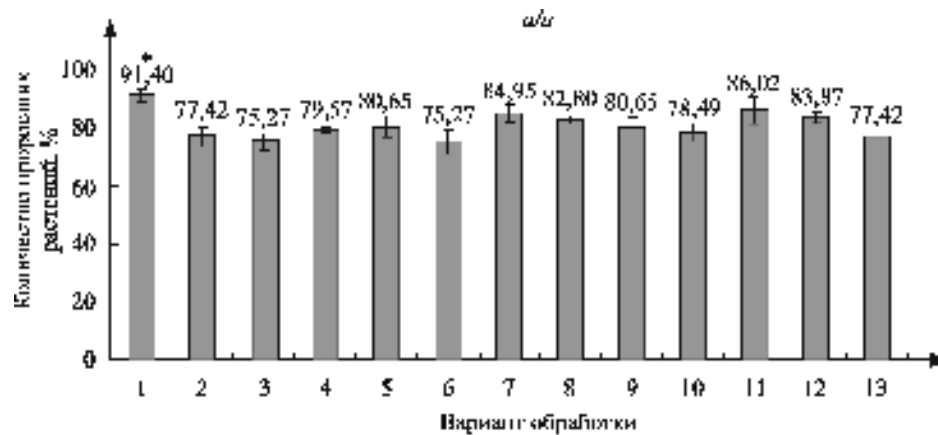
В предварительной серии экспериментов установлено, что элиситоры, приготовленные на основе бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* – *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162, *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494, способны одновременно увеличивать энергию прорастания и полевую всхожесть растений рапса в условиях высокого уровня засоления (250 ммоль/л NaCl).

Для оптимизации условий культивирования отобранных бактериальных штаммов были проведены эксперименты по их совместному культивированию с разными вариантами среды, температуры и соотношения посевного материала. Необходимость подбора условий одновременного культивирования штаммов обосновывалась необходимостью минимизации времени и энергозатрат для получения комплексного элиситорного препарата в промышленных условиях и его удешевления для производителя и потребителей. Поскольку подбор препарата, действующего при низких его концентрациях, является экономически целесообразным как для производителя, так и для потребителя продукции, то в дальнейшей работе были использованы варианты таких элиситорных препаратов, которые при разведении в тысячу раз существенно улучшали энергию прорастания и полевую всхожесть рапса. В таблице приведен композиционный состав отобранных элиситорных биопрепаратов.

На следующем этапе проводилась оценка способности полученных элиситорных препаратов формировать индуцированную системную устойчивость ISR-типа у растений рапса при засолении 150 ммоль/л NaCl.

Из рис. а видно, что в вышеописанном эксперименте достоверного изменения энергии прорастания при применении элиситорных препаратов отмечено не было, достоверное увеличение полевой всхожести на 20 % было зарегистрировано в вариантах опыта 11 и 12. При применении всех остальных элиситоров наблюдалась тенденция увеличения полевой всхожести. Как продемонстрировано на рис. в, длина стебля рапса достоверно увеличивалась при применении элиситоров в вариантах обработки 10, 12 и 13. Тенденция к удлинению корня при использовании в качестве элиситоров препаратов из вариантов обработки 10, 11 и 12 показана на рис. г. Достоверной разницы в массе сухих проростков в эксперименте обнаружено не было.

Продemonстрированная нами индукция системной устойчивости у растений на ранних этапах развития при обработке их семян бактериями PGPR-группы согласуется с описанным в [9, с. 58] явлением праймирования растений при воздействии на их семена элиситоров. Под праймированием подразумевается приобретение растениями состояния готовности быстрее или агрессивнее ответить на биотический или абиотический стресс.



Влияние элиситорных препаратов на растения рапса в условиях засоления (150 ммоль/л NaCl):
а – энергия прорастания, %; б – полевая всхожесть, %; в – длина стебля, мм; г – длина корня, мм.

*Выборки статистически значимо различаются при $p < 0,05$

The effect of eliciting drugs on rape plants under saline (150 mmol/l NaCl):
a – energy of germination, %; b – field germination, %; c – enght of stem, mm; d – root length, mm. * $p < 0.05$

Композиционный состав испытываемых образцов элиситорных биопрепаратов*

The composition of samples eliciting biological products*

Вариант обработки	Бактериальные штаммы (соотношение посевного материала)	Температура культивирования, °С	NaCl, ммоль/л
1	Вода (контроль 1)	—	0
2	Соль (контроль 2)	—	150
3	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 : <i>B. subtilis</i> 494 (1,0 : 4,5 : 4,5)	28	150
4	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 9)	28	150
5	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 9)	28	150
6	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 1)	28	150
7	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 (9 : 1)	28	150
8	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 : <i>B. subtilis</i> 494 (1 : 1 : 1)	28 °С в течение 4 ч, затем 35 °С до 48 ч	150
9	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>P. putida</i> F19 : <i>B. subtilis</i> 494 (1 : 1 : 1)	35 °С в течение 4 ч, затем 28 °С до 48 ч	150
10	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 1)	28 °С в течение 4 ч, затем 35 °С до 48 ч	150
11	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. putida</i> F19 (1 : 1)	35 °С в течение 4 ч, затем 28 °С до 48 ч	150
12	<i>B. subtilis</i> 494 : <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 (1 : 1)	28 °С в течение 4 ч, затем 35 °С до 48 ч	150
13	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> 162 : <i>B. subtilis</i> 494 (1 : 1)	35 °С в течение 4 ч, затем 28 °С до 48 ч	150

*Бактерии культивировали на среде с основой из солевого концентрата М9, титр каждой из культур – не менее 10⁷ КОЕ.

*The bacteria were cultured on a medium based on the salt concentrate M9, the titer of each of the cultures is not less 10⁷ cfu.

Заключение

Таким образом, в экспериментах отобран оптимальный элиситорный препарат из варианта обработки 12, обеспечивающего повышение способности растительного организма формировать индуцированную системную устойчивость у растений рапса в начале их вегетации. Системная устойчивость проявилась в достоверном возрастании полевой всхожести рапса на 20 % и увеличении длины стебля на 19 % в условиях действия неблагоприятного абиотического фактора (150 ммоль/л NaCl). Опытный образец был получен путем термической обработки (100 °С, 15 мин) культуральной жидкости бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494, выращенных на среде М9 с мелассой при 28 °С в течение 4 ч, а затем при 35 °С – до 48 ч.

Необходимо отметить, что обработка рапса образцом из варианта 10 приводила к увеличению длины стебля на 24 %, а образцом из варианта 11 – к увеличению всхожести на 20 %. Указанные образцы – производные бактерий *P. putida* F19 и *B. subtilis* 494 – также могут быть предложены в качестве основы для элиситорного препарата и дальнейших испытаний.

Библиографические ссылки

1. Alstrom S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere *Pseudomonads* // J. Gen. Appl. Microbiol. 1991. Vol. 37. P. 495–501.
2. Van Peer R., Niemann G. J., Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 // Phytopathol. 1991. Vol. 81. P. 728–734.
3. Wei G., Kloepper J. W., Tuzun S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria // Phytopathol. 1991. Vol. 81. P. 1508–1512.
4. Кулешова Ю. М., Рыбакова В. И., Феклистова И. Н. и др. Стимуляция роста рапса бактериями рода *Pseudomonas* – антагонистами фитопатогенов // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2016. Т. 11 : в 2 ч. Ч. 1. С. 154–161.
5. Максимова Н. П., Лысак В. В., Комарова М. С. и др. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* КМБУ 30043 – антагонист фитопатогенных микроорганизмов // Молекулярная генетика и биотехнология : материалы междунар. конф. (Минск, 6–8 апр. 1998 г.). Минск, 1998. С. 225–227.

6. Максимова Н. П., Лысак В. В., Комарова М. С. и др. Перспективы использования биопрепаратов микробного происхождения для защиты растений // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI ст. : материалы междунар. конф. (Минск, 1–2 июня 2000 г.). Минск, 2000. С. 183–185.
7. Figueiredo V. B., Burity H. A., Martinez C. R., et al. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici* // Appl. Soil Ecol. 2008. № 40. P. 182–188.
8. Kohler J., Hernandez J. A., Caravaca F., et al. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants // Funct. Plant Biol. 2008. № 35. P. 141–151.
9. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore, 2016.

References

1. Alstrom S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere *Pseudomonads*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1991. Vol. 37. P. 495–501.
2. Van Peer R., Niemann G. J., Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417. *Phytopathol.* 1991. Vol. 81. P. 728–734.
3. Wei G., Kloepper J. W., Tuzun S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* 1991. Vol. 81. P. 1508–1512.
4. Kuleshova Yu. M., Rybakova V. I., Feklistova I. N., et al. Stimulyatsiya rosta rapsa bakteriyami roda *Pseudomonas* – antagonistami fitopatogenov [Stimulation of rape growth by *Pseudomonas* bacteria – antagonists of phytopathogens]. *Tr. BGU. Ser.: Fiziol., biokhim. i mol. osnovy funkts. biosist.* 2016. Vol. 11 : in 2 parts. Part 1. P. 154–161 (in Russ.).
5. Maksimova N. P., Lysak V. V., Komarova M. S., et al. Shtamm bakterii *Bacillus subtilis* KMBU 30043 – antagonist fitopatogennykh mikroorganizmov [The strain *Bacillus subtilis* bacteria KMBU 30043 – antagonist of pathogenic microorganisms]. *Molecular genetics and biotechnology* : materialy mezhdunar. konf. (Minsk, 6–8 April, 1998). Minsk, 1998. P. 225–227 (in Russ.).
6. Maksimova N. P., Lysak V. V., Komarova M. S., et al. Perspektivy ispol'zovaniya biopreparatov mikrobnogo proiskhozhdeniya dlya zashchity rastenii [Prospects for the use of biological products microbial plant protection]. *Microbiology and Biotechnology at the turn of the XXI century* : materialy mezhdunar. konf. (Minsk, 1–2 June, 2000). Minsk, 2000. P. 183–185 (in Russ.).
7. Figueiredo V. B., Burity H. A., Martinez C. R., et al. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* 2008. No. 40. P. 182–188.
8. Kohler J., Hernandez J. A., Caravaca F., et al. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Funct. Plant Biol.* 2008. No. 35. P. 141–151.
9. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore, 2016.

Статья поступила в редакцию 28.11.2016.
Received by editorial board 28.11.2016.

УДК 591.044+591.5

ЛЕГОЧНОЕ ДЫХАНИЕ И МЫШЕЧНАЯ ЛОКОМОЦИЯ *LYMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЗАКИСЛЕНИЯ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

М. ШАХРАНИ¹⁾, А. В. СИДОРОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

В опытах на моллюсках установлено, что недельное нахождение животных в аквариумах с pH воды 6,3 приводит к интенсификации легочного дыхания, выражающейся в увеличении его длительности (в 1,5 раза) и частоты (в 1,4 раза), а также к равновеликому возрастанию скорости локомоции (на третьи сутки после начала экспериментов). К седьмому дню инкубации скорость перемещения моллюсков по субстрату вновь уравнивалась с таковой для контрольной группы (содержание в аквариумах с pH воды 7,3). Предполагается, что указанные различия могут быть обусловлены неодинаковой чувствительностью к уровню pH интерстиция дофамин- и серотонинергических нейронов и синапсов, вовлеченных в контроль дыхательной и локомоторной активностей соответственно.

Ключевые слова: моллюски; поведение; кислотно-основное равновесие (pH); экология пресных вод; адаптация.

LUNG RESPIRATION AND MUSCULAR LOCOMOTION OF *LYMNAEA STAGNALIS* AT CHRONIC ACIDIFICATION OF ENVIRONMENT

M. SHAHRANI^a, A. V. SIDOROV^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: sidorov@bsu.by

In experiments on molluscs is assumed that weekly incubation of animals in aquariums with water pH level at 6.3 units, results in intensification of lung respiration, accompanied by its duration (1.5-time) and frequency (1.4-time) increase, as well as in equivalent rise of locomotion speed (on 3rd day after the beginning of experiments). On seventh day of incubation, locomotion speed became the same in comparison with control group (incubation in aquariums with water pH level at 7.3 units). We suggest that mentioned above differences are due to the different sensitivity of dopamine- and serotonin-containing neurons and synapses, which are involves in motor control of lung respiration and muscular locomotion respectively, to interstitial pH level.

Key words: molluscs; behavior; acid-base balance (pH); fresh water ecology; adaptation.

Образец цитирования:

Шахрани М., Сидоров А. В. Легочное дыхание и мышечная локомоция *Lymnaea stagnalis* в условиях хронического закисления среды обитания // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 44–48.

For citation:

Shahrani M., Sidorov A. V. Lung respiration and muscular locomotion of *Lymnaea stagnalis* at chronic acidification of environment. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 44–48 (in Russ.).

Авторы:

Мохаммед Шахрани – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Сидоров.

Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Mohamed Shahrani, postgraduate student at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

alshahranimohamed45@gmail.com

Alexander Sidorov, doctor of science (biology), docent; professor at the department of physiology of human and animals, faculty of biology.

sidorov@bsu.by

Введение

Развитие физиологических адаптаций – непереносимое условие приспособления живых организмов к новым условиям существования. Характер возникающих изменений у животных во многом определяется реакцией со стороны нервной системы, играющей ключевую роль в формировании итогового поведенческого паттерна. Кислотно-основное равновесие (рН) является одним из факторов, определяющих экологическое состояние пресных вод, а также плотность популяции различных видов гидробионтов [1; 2]. Моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) – типичный обитатель пресных вод Беларуси, зачастую предпочитает мелкие мелиоративные каналы, окружающие сельскохозяйственные угодья. Физиолого-экологические особенности вида делают его идеальным как для биомониторинга [3], так и для исследования функций нервной системы [4, с. 5–12]. Вместе с тем нейронные механизмы адаптации *идентифицированных* элементов ЦНС, в том числе и формирование устойчивости к действию чрезвычайных раздражителей, например ацидофикации, остаются предметом пристального изучения [5], даже несмотря на ряд установленных мембранных систем, ответственных за поддержание постоянства рН цитоплазмы (протонные помпы, ионообменники и т. п.) [6; 7]. В большинстве исследований подобного рода речь идет об острых эффектах рН, в то время как хроническому действию указанного фактора уделяется гораздо меньшее внимание. В связи с этим целью настоящей работы является установление особенности двух моторных форм поведения *Lymnaea stagnalis* – легочной респирации и мышечной локомоции – в условиях длительного нахождения животных в среде обитания с новым уровнем рН.

Материалы и методы исследования

Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в осенний период года. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 0,5 л воды) при температуре 20 ± 1 °С. Воду меняли каждые три дня. Пищей служили листья одуванчика (питание *ad libitum*). Во всех экспериментальных сериях использовали животных одинакового размера (длина раковины – от 4,0 до 4,5 см) и одинаковой массы (от 5 до 6 г).

Экспериментальные группы. Животные были разделены на две условные группы. В состав контрольной группы входили моллюски, содержащиеся в аквариумах с рН воды $7,3 \pm 0,1$. Опытная группа была представлена особями, находящимися в аквариумах с рН воды $6,3 \pm 0,1$. В качестве буфера использовали N-2-гидроксиэтилпиперазин-N’2-этансульфоновую кислоту (HEPES) в конечной концентрации 10 моль/л. Требуемое значение рН доводили при помощи раствора NaOH в концентрации 1 моль/л. Контроль за уровнем рН аквариумной воды (каждые сутки) осуществляли путем применения рН-метра РеррНесТ 310 (*ATI Orion*, США) при 20 °С. Длительность экспозиции в аквариумах составила одну неделю.

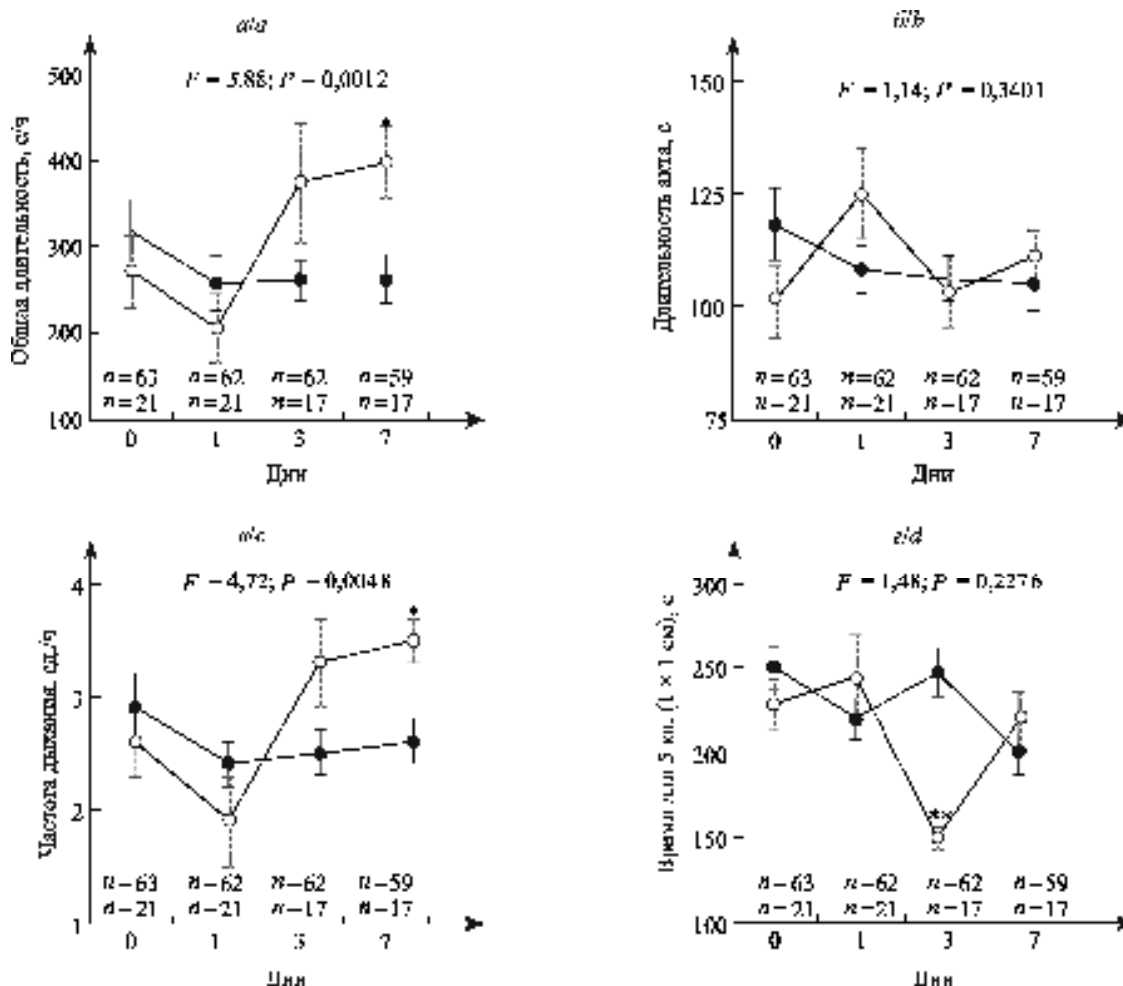
Анализ форм поведения. Для оценки дыхательного поведения моллюсков помещали в аквариумы (объем – 4,5 л, высота – 50 см) по 5 особей на сосуд. Регистрировали количество респираторных циклов (открытие – закрытие пневмостома) за 1 ч наблюдения (частота респирации), а также длительность каждого цикла отдельно у каждого моллюска. Рассчитывали среднюю длительность респираторного акта, суммарную длительность респирации за 1 ч наблюдения. Для оценки мышечной локомоции животных переносили в кристаллизаторы, стоящие на миллиметровой бумаге и наполненные отстоявшейся водопроводной водой (высота слоя – 0,5 см). Через 10 мин после помещения улиток в новые условия с помощью секундомера фиксировали время, необходимое для преодоления 5 квадратов (кв.) (1×1 см). Анализ поведения проводили непосредственно до изменения условий содержания, а затем на первый, третий и седьмой дни после помещения животных в аквариумы с заданным уровнем рН воды.

Статистика. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [8]. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро – Уилка. Достоверность различий временных изменений показателей дыхательного и локомоторного поведения отдельно по каждой группе определяли при помощи *F*-критерия Фишера посредством дисперсионного анализа по однофакторной схеме (one-way ANOVA). Для сравнения совокупности данных по временной динамике исследуемых показателей для двух экспериментальных групп использовали метод дисперсионного анализа для повторных измерений (repeated measures ANOVA). Для статистически различных независимых пар данных дополнительно рассчитывали значение *t*-критерия Стьюдента. Число животных (*n*) указано для каждой серии опытов отдельно. При оценке выживаемости в группах использовали метод Гехана, рассчитывая *z*-критерий (сравнение двух выборок). Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*P*) меньше 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ выживаемости моллюсков не выявил статистически значимых различий между экспериментальными группами (тест Гехана: $z = -1,5$, $P = 0,1332$), что свидетельствует об отсутствии токсического воздействия аквариумной воды с pH 6,3 на организм моллюсков. Для животных контрольной серии нами не обнаружено статистически достоверных различий для показателей дыхательной и локомоторной активностей с течением времени (рисунок).

Значения F -критерия составили: $F = 0,96$, $P = 0,4141$ – общая длительность респирации; $F = 1,26$, $P = 0,2877$ – длительность отдельного акта; $F = 0,7276$, $P = 0,5364$ – частота респирации; $F = 1,12$, $P = 0,3419$ – скорость локомоции. Напротив, содержание животных в аквариумах с pH воды 6,3 (закисление) приводило к выраженному изменению характеристик легочного дыхания и мышечной локомоции по сравнению с исходными. По прошествии недели после нахождения моллюсков в новых условиях отмечено статистически достоверное увеличение (в 1,5 раза) общей длительности легочного дыхания ($F = 2,99$, $P = 0,0366$), происходящее на фоне равновеликого возрастания (в 1,4 раза) частоты



Показатели легочного дыхания и мышечной локомоции у моллюсков, длительно содержавшихся в условиях закисления аквариумной воды: а – общая длительность легочной респирации; б – длительность отдельного респираторного акта; в – частота респирации; г – скорость мышечной локомоции. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего. Ось абсцисс – время (дни), прошедшее с момента помещения (принят за 0) улиток в аквариумы с новыми условиями содержания. ● – Контрольная группа (pH воды 7,3); ○ – экспериментальная группа (pH воды 6,3). Число животных (n) в каждый временной отрезок указано отдельно (верхний ряд – контрольная, нижний – экспериментальная группы). Приведено значение F -критерия и уровня значимости P (дисперсионный анализ для повторных измерений).

*, ** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем в тот же временной отрезок, $P < 0,05$ или $P < 0,01$ соответственно (t -критерий Стьюдента)

Lung respiration and muscular locomotion of mollusks after long-term incubation in aquariums with acidic pH: a – total respiratory time; b – pneumostome open time; c – amount of respiratory cycles; d – muscular locomotion rate. Data present mean value $\pm$ SEM. Abscissa – time (days) after the beginning of exposition (accepted as 0) of animals in aquariums with novel conditions. ● – Control group (water pH 7.3); ○ – experimental group (water pH 6.3). Number of animals (n) presented individually for each time gap (upper row – control, bottom row – experimental group). F -test and significance level (P) meanings for repeated measures ANOVA are presented. *, ** Significant, in comparison with control at the same time gap, $P < 0.05$ or $P < 0.01$ respectively (Student's t -test)

респирации ($F = 3,55$, $P = 0,0186$) при неизменной длительности респираторного акта ($F = 1,38$, $P = 0,2552$). Схожее возрастание (в 1,5 раза) скорости передвижения моллюсков по субстрату зафиксировано на третьи сутки после начала эксперимента ($F = 4,41$, $P = 0,0068$). Непосредственное сравнение двух групп выявило схожие черты различий в исследованных показателях дыхательной активности (см. рисунок) – расхождения в реакциях начинали отмечаться через трое суток после смены условий содержания и достигли максимума по прошествии семи дней после начала эксперимента. Исключение составили данные по скорости локомоции – дисперсионный анализ для повторных измерений не выявил статистически значимых различий во временной динамике указанного показателя между контрольной и опытной группами.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что нахождение животных в условиях ацидофикации не сказывается на выживании особей, т. е. не влияет на численный состав популяции *Lymnaea stagnalis*. Это позволяет предположить, что, даже несмотря на известную проницаемость кожных покровов беспозвоночных для небольших ионов [9], прудовик обладает достаточно эффективным механизмом поддержания постоянства кислотно-основного равновесия внутренней среды организма, что позволяет свести к минимуму колебания pH гемолимфы, возникающие под действием внешних факторов [10], и удерживать данный показатель в пределах физиологической нормы. На уровне отдельных нейронов речь может идти об активации специфических каналов плазмалеммы, впервые описанных именно у моллюсков и обеспечивающих перенос избыточных протонов из цитоплазмы в интерстиций, тем самым нормализуя pH внутри клетки [11].

С другой стороны, наблюдаемые изменения поведенческой активности свидетельствуют о том, что колебания pH можно рассматривать в качестве корректирующего фактора в отношении моторных программ ЦНС. При этом статистически значимые эффекты проявляются в отдаленном периоде (третьи и седьмые сутки после начала воздействия), что вполне согласуется с нашими более ранними данными [12], выявившими относительную устойчивость показателей поведения *Lymnaea stagnalis* в условиях 24 ч действия аквариумной воды с pH, равным 6. Следует отметить, что нейронная сеть, вовлеченная в контроль мышечной локомоции, оказывается более устойчивой к изменению pH по сравнению с таковой для легочной респирации. Известно, что ключевым нейромедиатором, обеспечивающим транслокацию моллюска, является серотонин [13], в то время как выраженность легочного дыхания определяется активностью дофаминергических путей мозга [14]. Полученные ранее данные свидетельствуют о выраженном снижении эффективности передачи сигнала в дофаминергических контактах ЦНС *Lymnaea stagnalis* и относительной устойчивости спонтанной электрической активности центральных серотонинергических клеток мозга [4, с. 170–176] при закислении межклеточного пространства. В связи с этим факт усиления легочного дыхания (частоты и общей длительности) у животных, находившихся в аквариумах с низким pH воды, может быть объяснен со следующих позиций. Снижение эффективности синаптической передачи в дофаминергических контактах между центральными нейронами и мотонейронами мышц закрывающих пневмостом, как это и происходит в ходе естественной активации дыхательного ритма (фаза «вдоха») [15], приводит к тому, что пневмостом более длительное время находится в открытом состоянии, тем самым увеличивая выраженность легочного дыхания. Анализ корреляционной зависимости между pH гемолимфы и длительностью легочной респирации, а также скоростью перемещения моллюсков выявил наличие отрицательной корреляции в первом случае и отсутствие статистически значимой взаимосвязи – во втором [4, с. 139–142; 16]. В сочетании с полученными нами данными это свидетельствует о большей степени устойчивости (при пониженных pH) мышечной локомоции и контролирующей ее серотонинергической системы мозга.

Заключение

Таким образом, длительное нахождение моллюсков в условиях ацидофикации приводит к пролонгированному изменению легочного дыхания на фоне остающейся неизменной локомоторной активности. Отмеченные различия могут быть обусловлены неодинаковой чувствительностью центральных дофамин- и серотонинергических нейронов к концентрации свободных протонов в межклеточной жидкости (pH интерстиция).

Библиографические ссылки

1. Camargo J. A., Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment // Environ. Int. 2006. Vol. 6. P. 831–849.
2. Hasler C. T., Butman D., Jeffrey J. D., et al. Freshwater biota and rising pCO₂? // Ecol. Lett. 2016. Vol. 19 (1). P. 98–108.
3. Elder J. F., Collins J. J. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1991. Vol. 122. P. 37–79.

4. Сидоров А. В. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск, 2011.
5. Сидоров А. В. Регуляция и модуляция нейронных функций при колебаниях уровня pH интерстиция // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2008. № 3. С. 67–72.
6. Schwiening C. J. pH phantoms – a physiological phenomenon? // *Physiol. News*. 2003. Vol. 50. P. 15–19.
7. Reeh P. W., Steen K. H. Tissue acidosis in nociception and pain // *Prog. Brain Res.* 1996. Vol. 113. P. 143–151.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1998.
9. Laverack M. S. Tactile and chemical perception in earthworms // *Comp. Biochem. Physiol.* 1961. Vol. 2. P. 22–34.
10. Sidorov A. V., Polyanina I. P. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis* // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2003. Vol. 39, № 5. P. 555–561.
11. Byerly L., Moody W. J. Membrane currents of internally perfused neurones of the snail, *Lymnaea stagnalis*, at low intracellular pH // *J. Physiol.* 1986. Vol. 376. P. 477–491.
12. Сидоров А. В., Полянина И. П. Влияние изменения кислотно-основного равновесия (pH) воды на поведение моллюска *Lymnaea stagnalis* // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2003. № 3. С. 46–48.
13. Цыганов В. В. Координация активности моноаминергических педальных нейронов у пресноводных улиток // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2000. Т. 86. С. 369–378.
14. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea* // *Science*. 1990. Vol. 250, issue 4978. P. 282–285.
15. Syed N. I., Harrison D., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Behavioral analyses and the identification of motor neurones // *J. Comp. Physiol.* 1991. Vol. 169A. P. 541–555.
16. Sidorov A. V. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH) // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 42, вып. 1. P. 43–48.

References

1. Camargo J. A., Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 2006. Vol. 6. P. 831–849.
2. Hasler C. T., Butman D., Jeffrey J. D., et al. Freshwater biota and rising pCO₂? *Ecol. Lett.* 2016. Vol. 19 (1). P. 98–108. DOI: 10.1111/ele.12549.
3. Elder J. F., Collins J. J. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1991. Vol. 122. P. 37–79.
4. Sidorov A. V. Nerve centers functional activity in invertebrates. Minsk, 2011 (in Russ.).
5. Sidorov A. V. Regulation and modulation of neuronal functions under interstitial pH alterations. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2008. No. 3. P. 67–72 (in Russ.).
6. Schwiening C. J. pH phantoms – a physiological phenomenon? *Physiol. News*. 2003. Vol. 50. P. 15–19.
7. Reeh P. W., Steen K. H. Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog. Brain Res.* 1996. Vol. 113. P. 143–151.
8. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow, 1998 (in Russ.).
9. Laverack M. S. Tactile and chemical perception in earthworms. *Comp. Biochem. Physiol.* 1961. Vol. 2. P. 22–34.
10. Sidorov A. V., Polyanina I. P. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2003. Vol. 39, No. 5. P. 555–561.
11. Byerly L., Moody W. J. Membrane currents of internally perfused neurones of the snail, *Lymnaea stagnalis*, at low intracellular pH. *J. Physiol.* 1986. Vol. 376. P. 477–491.
12. Sidorov A. V., Polyanina I. P. Water acid-base balance (pH) modulates the behavior of the mollusk, *Lymnaea stagnalis*. *Vestnik Beloruss. gos. univ. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2003. No. 3. P. 46–48 (in Russ.).
13. Tsyganov V. V. Coordination of the activity of monoaminergic pedal neurons in fresh water snails. *Ross. Fiziol. Zh. im. I. M. Sechenova*. 2000. Vol. 86. P. 369–378 (in Russ.).
14. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science*. 1990. Vol. 250, issue 4978. P. 282–285.
15. Syed N. I., Harrison D., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Behavioral analyses and the identification of motor neurones. *J. Comp. Physiol.* 1991. Vol. 169A. P. 541–555.
16. Sidorov A. V. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 42, issue 1. P. 43–48.

Статья поступила в редколлегию 04.10.2016.
Received by editorial board 04.10.2016.

ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 582.736:633.367.1:577.13

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛКАЛОИДНЫХ И БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРНЫХ ПРИЗНАКОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОБРАЗЦОВ РАЗНЫХ ВИДОВ ЛЮПИНА

И. Ю. РОМАНЧУК¹⁾, В. С. АНОХИНА¹⁾, И. Б. САУК¹⁾, В. В. ДУКСИНА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Приведены результаты исследования компонентов алкалоидного и белкового комплексов разных видов люпина (*Lupinus* L.). У коллекционных образцов люпина желтого, белого, узколистного и других видов установлено

Образец цитирования:

Романчук И. Ю., Анохина В. С., Саук И. Б., Дуксина В. В. Использование алкалоидных и белковых комплексов в качестве маркерных признаков генетической характеристики образцов разных видов люпина // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 49–55.

For citation:

Ramanchuk I. Y., Anokhina V. S., Sauk I. B., Duksina V. V. Use alkaloid and protein complexes as a marker genetic characteristics of samples of different species of lupine. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 49–55 (in Russ.).

Авторы:

Ирина Юрьевна Романчук – научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Вера Степановна Анохина – кандидат биологических наук, доцент; заведующий сектором генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Борисовна Саук – старший научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Валентина Викторовна Дуксина – научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Irina Ramanchuk, researcher at the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

Vera Anokhina, PhD (biology), docent; head of the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology. anokhina@tut.by

Irina Sauk, researcher at the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

Valentina Duksina, researcher at the plant genetics sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

наличие видоспецифичных компонентов алкалоидного комплекса. Отмечено также отсутствие полиморфизма по этому показателю у образцов люпина узколистного в течение разных этапов онтогенеза растений. Показана возможность применения белковых спектров различных образцов для установления филогенетических связей внутри вида даже при незначительном полиморфизме компонентов спектра. С помощью методов гибридизации и мутагенеза получены новые образцы люпина узколистного с аллелем устойчивости к антракнозу. Приведенные результаты могут быть использованы для составления биохимической части паспорта сорта.

Ключевые слова: люпин; виды; алкалоиды; запасные белки.

Благодарность. Исследования проведены при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и в рамках программы «Генофонд».

USE ALKALOID AND PROTEIN COMPLEXES AS A MARKER GENETIC CHARACTERISTICS OF SAMPLES OF DIFFERENT SPECIES OF LUPINE

I. Y. RAMANCHUK^a, V. S. ANOKHINA^a, I. B. SAUK^a, V. V. DUKSINA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: anokhina@tut.by

Biochemical and molecular-genetic analysis of BSU core collection samples have shown wide diversity of parent lines, cultivars and variants according to examined marker-based traits. According to alkaloid content of vegetative parts and seeds analysis in yellow lupin, sources of high and low alkaloid content were found, with means of further practical use in various direct in of selection. Also, its confirmed there is presence of rare storage protein components, which can be recommended for cultivar certification. Data of biochemical polymorphism in samples are confirmed also by molecular-genetic marking results.

Key words: lupine; species; alkaloids; storage proteins.

Acknowledgements. The research was carried out with the support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research and out within the framework of the «Genofond» program.

Введение

Значимость культуры люпина в сельском хозяйстве обусловлена его биологическими характеристиками: высоким содержанием легкоусвояемого белка, мощной корневой системой, делающей доступными питательные вещества из глубоких слоев почв, азотфиксирующей способностью в симбиозе с бактериями, благодаря чему возможно использовать разные виды люпина на сидеральные, кормовые, лекарственные, а также в перспективе и пищевые цели [1; 2].

Для эффективного подбора родительских компонентов скрещивания в зависимости от целей и направлений селекции возникает необходимость их идентификации по комплексу признаков как морфологических, так и биохимических и молекулярно-генетических.

Материалы и методы исследований

Алкалоидность определяли в семенах и зеленой массе разных видов люпина по [3]. Электрофорез и изучение компонентов спектра проводили по [4; 5]. Детекцию гена антракнозостойчивости осуществляли с применением праймера AnMan [6].

Результаты и их обсуждение

Изучение количественного содержания и качественного состава алкалоидного комплекса различных образцов люпина показало значительные колебания этих показателей в зависимости от года возделывания, а также места репродукции. При этом качественный состав алкалоидного комплекса сортов разных видов люпина был практически неизменным независимо от условий возделывания (табл. 1 и 2), что подтверждается также данными других исследований [7–9].

Необходимо отметить, что у отдельных сортов люпина желтого нами был выявлен алкалоид индольной группы грамин в отличие от наличия только хинолизидиновых алкалоидов у других форм.

Большинство из граминсодержащих образцов относились к сортам польской селекции либо являлись формами, полученными от скрещивания этих сортов с другими, не содержащими грамина. С использованием чистого алкалоида грамина установлена иная по сравнению с хинолизидиновыми алкалоидами длина волны поглощения спектра грамином, что позволяет легко идентифицировать граминсодержащие формы (рис. 1), что было показано нами впервые [10].

Анализ качественного состава алкалоидного комплекса подтвердил наличие основных алкалоидов: люпинина и спартеина – у люпина желтого, люпанина и 13-гидроксилюпанина – у люпина узколистного, альбина – у люпина белого. Наличие разных алкалоидов в названных видах люпина дает основания для их использования при идентификации и служит маркерным признаком между видами (см. табл. 1) [11].

У отдельных образцов с минимальным содержанием алкалоидов не удалось провести анализ качественного состава алкалоидного комплекса.

Таблица 1

Алкалоидный комплекс разных видов люпина

Table 1

Alkaloid complex of different types of lupine

Вид	Известные алкалоиды-стандарты, имеющиеся в наличии						Неизвестные алкалоиды
	Г	П	СП	ЛА	13ГЛ	ЛИ	
<i>Lupinus albus</i> , сорт Пищевой	–	–	+	+	+	–	+
<i>L. albus</i> № 1165	–	–	+	+	+	–	+
<i>L. hybridus</i> Lem.	–	–	–	+	+	–	–
<i>L. elegans</i> H. B. K.	–	–	+	+	+	–	–
<i>L. subcarnosus</i> Hook.	–	–	+	+	+	–	–
<i>L. digitatus</i> Forsk.	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. linifolius</i> Roth.	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. termis</i>	–	–	–	–	–	–	+
<i>L. luteus</i> L.	+	–	+	–	–	+	–
<i>L. angustifolius</i> L.	–	+	–	+	+	–	–
<i>L. mutabilis</i> L.	–	–	–	+	–	–	+

Примечание. Г – грамин; П – пахикарпин; СП – спартеин; ЛА – люпанин; 13ГЛ – 13-гидроксилюпанин; ЛИ – люпинин.

Таблица 2

Алкалоидный комплекс сортообразцов люпина узколистного

Table 2

Alkaloid complex varieties of blue lupine

Образец сорта	Место возделывания	Алкалоидность, % относительно сухого вещества (ОСВ)	Алкалоиды						Другие алкалоиды
			П	СП	ЛА	13ГЛ	ЛИ	ЦОГЛ	
Результаты экологического испытания (семена)									
Вясковы	Жодино	≤ 0,013*				+			+
	Пружаны	≤ 0,013*				+			+
	Минск	0,042 ± 0,001*				+	+		+
Лангуст	Жодино	0,048 ± 0,000*			+				+
	Пружаны	0,031 ± 0,003*			+				
	Минск	0,057 ± 0,002*				+			

Образец сорта	Место возделывания	Алкалоидность, % относительно сухого вещества (ОСВ)	Алкалоиды						Другие алкалоиды
			П	СП	ЛА	13ГЛ	ЛИ	ЦОГЛ	
Радужный	Жодино	$\leq 0,013^*$							
	Пружаны	$\leq 0,013^*$							
	Минск	$0,022 \pm 0,000^*$	+		+				
Прывабны	Жодино	$\leq 0,013^*$							
	Пружаны	$\leq 0,013^*$	+						
	Минск	$\leq 0,013^*$			+				
Добрыня	Жодино	$0,030 \pm 0,001^*$				+			+
	Пружаны	$0,032 \pm 0,001^*$				+			+
	Минск	$0,040 \pm 0,000^*$				+			+
Дзіўны	Жодино	$0,072 \pm 0,000^*$	+						
	Пружаны	$0,077 \pm 0,001^*$	+		+				
	Минск	$0,075 \pm 0,002^*$				+			+
Знічка	Жодино	$0,074 \pm 0,001^*$							+
	Пружаны	$0,074 \pm 0,000^*$							+
	Минск	$0,084 \pm 0,003^*$							+
Результаты исследования на разных этапах развития растений									
Брянский 1121	Семена	$0,086 \pm 0,003^*$		+					+
	Листья	$0,067 \pm 0,005^*$	+						+
Брянский 123	Семена	$0,095 \pm 0,000^*$		+					+
	Листья	$0,047 \pm 0,001^*$	+						+
Миртан	Семена	$0,232 \pm 0,000^*$		+		+			+
Шляггіе	Семена	$\leq 0,013^*$							+
Хвалько	Семена	$0,212 \pm 0,000^*$	+			+			+
Кристалл	Семена	$0,115 \pm 0,001^*$	+			+			+

* Результаты достоверны при P не менее 0,05. ЦОГЛ – циннамоилоксигидроксилупанин.

В работах [4; 5; 12] показано, что люпин узколистый (*L. angustifolius* L.) и люпин белый (*L. albus* L.) имеют большую степень разнообразия в спектрах запасных белков, что связано, видимо, с достаточно широким использованием в селекции исходного материала из разных мест происхождения. Сорта же люпина желтого (*L. luteus* L.) не показывают такого разнообразия белковых спектров и обладают большей гомологией запасных белков. Сходные данные были получены и при исследованиях в БГУ коллекций двух видов люпина [13]. Спектры, полученные в результате исследований и представленные в виде статистических таблиц, были обработаны с помощью пакета программ *Statistica 8.0*.

Выявленные различия обеспечили возможность построения филогенетического древа сортов стержневых коллекций люпина желтого и узколистного, имеющихся в БГУ, результаты которого подтверждались также историей происхождения сортов (рис. 2 и 3).

Однако полная информация о происхождении и близкородственных связях известна сегодня не для всех образцов. В связи с этим применение белковых маркеров способствовало выделению среди образцов двух стержневых коллекций (люпина желтого и узколистного) близкородственных и филогенетически удаленных групп, что может использоваться при разработке программ дальнейшей селекции люпина для разных целей.

По данным молекулярно-генетического анализа, нами также выявлен полиморфизм внутри видов как по праймерам хозяйственно ценных признаков, так и по праймерам генов функциональных белков. На основании системы скрещиваний и методов мутагенеза получены новые перспективные генотипы с генами устойчивости к антракнозу (пример приведен на рис. 4 в дорожках 4; 5; 7 у образцов 64/09, контроль; 58/09, 750 Гр; 58/09, контроль).

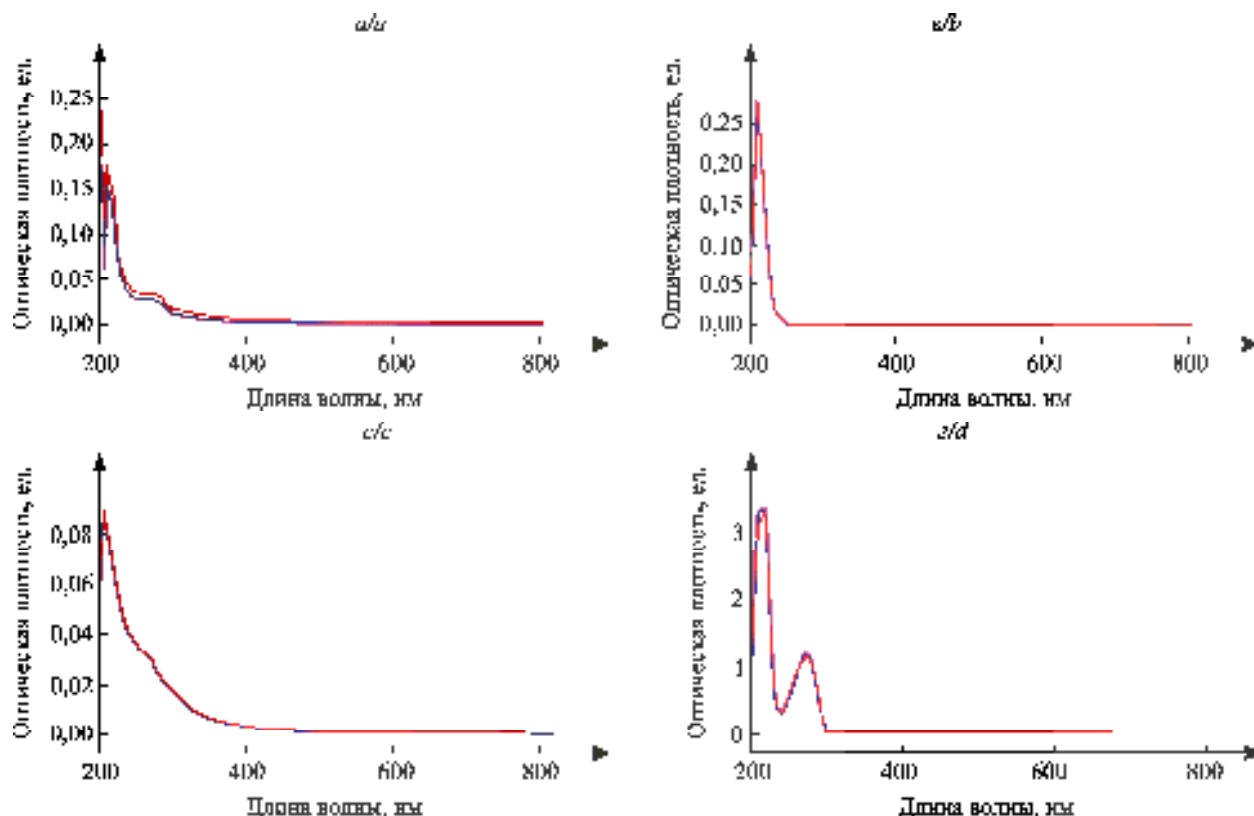


Рис. 1. Спектры поглощения алкалоидов-стандартов при разведении в 1 % соляной кислоте:
а – спартеина сульфат пятиводный; б – люпинина перхлорат; в – люпинин; г – грамин чистый. Цветом выделены повторности опыта: красным – первая; синим – вторая; фиолетовым – третья
Fig. 1. The absorption spectra of the alkaloids standards at a dilution of 1 % hydrochloric acid:
а – sparteine sulfate; б – lupanine perchlorate; в – lupinine; г – gramine pure. Color is marked repetition of the experiment:
red – the first; blue – the second; purple – the third

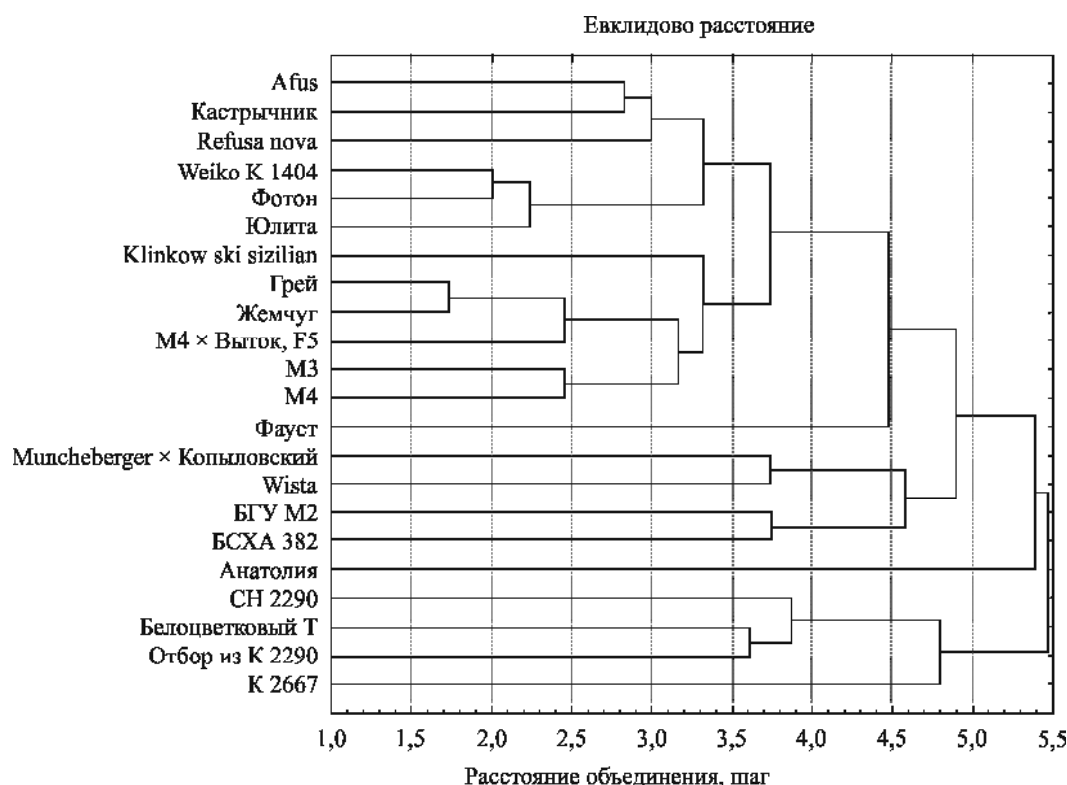


Рис. 2. Филогенетическое древо люпина желтого, построенное по спектрам запасных белков
Fig. 2. The phylogenetic tree of yellow lupine, built from the spectra of storage proteins

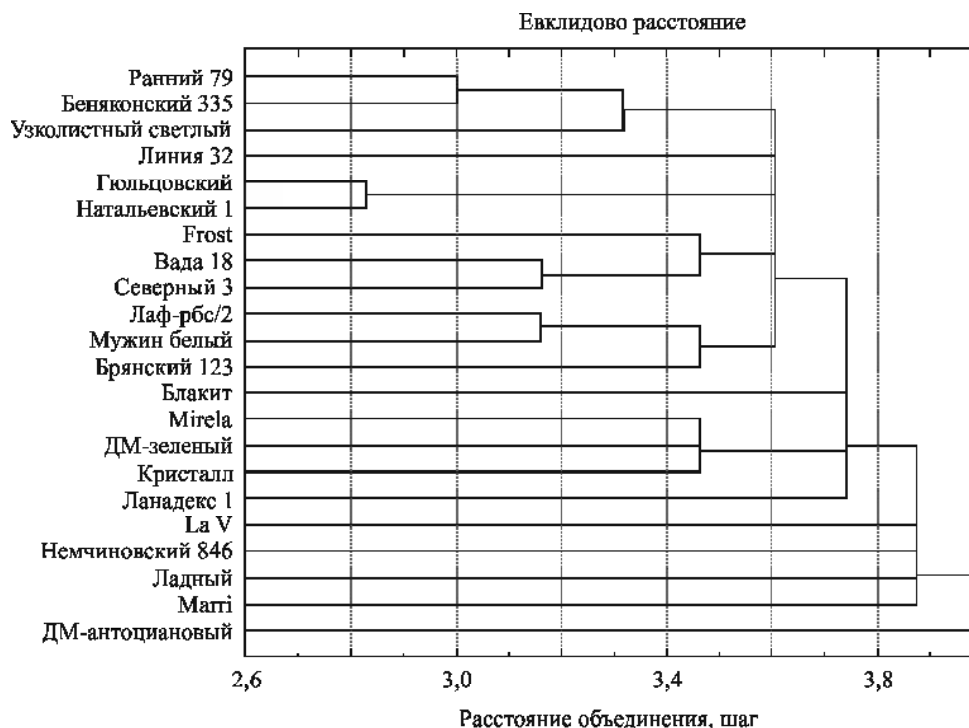


Рис. 3. Филогенетическое древо люпина узколистного, построенное по спектрам запасных белков

Fig. 3. The phylogenetic tree of blue lupine, built from the spectra of storage proteins

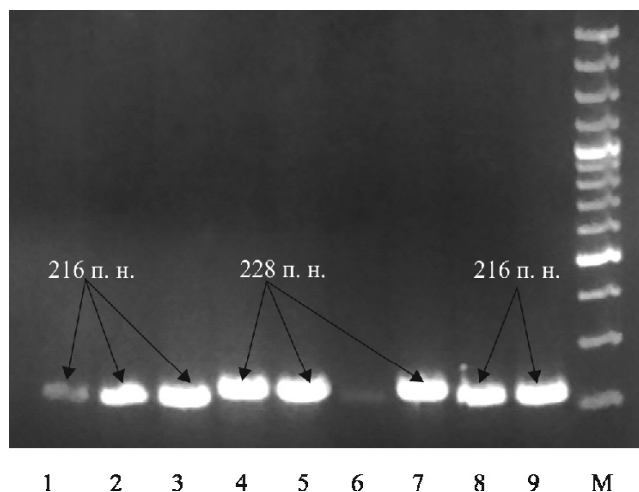


Рис. 4. Родительские и мутантные образцы с перспективным аллелем

антракнозуустойчивости (228 п. н.) [6] по праймеру AnMan: 1 – Кристалл (1000 Гр); 2 – Кристалл (750 Гр); 3 – Кристалл (контроль); 4 – 64/09 (контроль); 5 – 58/09 (750 Гр); 6 – 58/09 (1000 Гр); 7 – 58/09 (контроль); 8 – Фазан (1000 Гр); 9 – 836/05 (контроль); М – маркер молекулярного веса от 1500 до 100 п. о.

Fig. 4. Parent and mutant samples with allele resistance to anthracnose (228 bp) [6] on the primer AnMan: 1 – Crystal (1000 Gy); 2 – Crystal (750 Gy); 3 – Crystal (control); 4 – 64/09 (control); 5 – 58/09 (750 Gy); 6 – 58/09 (1000 Gy); 7 – 58/09 (control); 8 – Fasan (1000 Gy); 9 – 836/05 (control), M – DNA Ladder, Fermentas (1500–100 bp)

Заклучение

На основании проведенных исследований в секторе генетики растений кафедры генетики биологического факультета БГУ были изучены стержневые коллекции люпина желтого и узколистного по комплексу биохимических и молекулярно-генетических признаков и составлены паспорта образцов, которые обеспечивают защиту авторских прав. Полученные данные также следует учитывать при подборе родительских компонентов в случае селекции люпина на различные цели.

Библиографические ссылки

1. Анохина В. С., Дебелый Г. А., Конорев П. М. Люпин: селекция, генетика, эволюция. Минск, 2012.
2. Купцов Н. С., Привалов Ф. И., Матыс И. С. Стержневая генетическая коллекция *Lupinus angustifolius* L.: генетика, формирование биологического банка генов, использование. Минск, 2014.
3. Яговенко Т. В., Рудометкина М. В., Рудометкин С. В. и др. Усовершенствованный колориметрический метод определения алкалоидов в люпине // Кормопроизводство. 2004. № 3. С. 27–29.
4. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / под ред. В. Г. Конарева. СПб., 2000.
5. Eggi Э. Э. Идентификация сортов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) с использованием электрофоретического спектра полипептидов белков семян. СПб., 2013.
6. Yang H., Renshaw D., Thomas G., et al. A strategy to develop molecular markers applicable to wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*L. angustifolius* L.) // Mol. Breeding. 2008. Vol. 21. P. 473–483.
7. Kamel K. A., Swiecicki W., Kaczmarek Z., et al. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) // Genet. Resour. Crop. Evol. 2015. Vol. 3. P. 239–245.
8. Świecicki W., Kamel K., Barzyk P. Alkaloids in seeds of the Polish *Lupinus angustifolius* L. collection // Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015). Milan, 2015. P. 129.
9. Mulder P. P. J., de Nijs M. Determination of quinolizidine alkaloids in lupin flour by LC-MS/MS A promising novel way of analysis // Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015). Milan, 2015. P. 75.
10. Анохина В. С., Цибульская И. Ю. О возможности использования современных методических приемов анализа качественного состава комплекса алкалоидов люпина // Материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию со дня рождения С. И. Жегалова (Москва, 7–9 авг. 2006 г.). М., 2006. Т. 2. С. 46–48.
11. Романчук И. Ю., Анохина В. С. Алкалоидный и белковый комплексы как маркерные признаки для генетической характеристики видов люпина // Материалы Междунар. науч. конф. (Санкт-Петербург, 1–3 нояб. 2016 г.). СПб., 2016. С. 87–89.
12. Eggi Э. Э., Вишневецкая М. С., Агеева П. А. и др. Использование полиморфизма белков семян для сортовой идентификации люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) // Аграр. Россия. 2012. № 4. С. 2–8.
13. Романчук И. Ю., Анохина В. С., Саук И. Б. и др. Молекулярно-генетическая и биохимическая характеристика образцов стержневой коллекции люпина желтого // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2015. Т. 10, №. 1. С. 127–132.

References

1. Anokhina V. S., Debeliy G. A., Konorev P. M. Lupin: selektsiya, genetika, evolutsiya [Lupine: selection, genetic, evolution]. Minsk, 2012 [in Russ.].
2. Kuptsov N. S., Privalov F. I., Matys I. S. Sterzhnevaya geneticheskaya kollektsiya *Lupinus angustifolius* L.: genetika, formirovanie biologicheskogo banka genov, ispol'zovanie [Core genetic collection *Lupinus angustifolius* L.: genetic, the formation of biological gene bank, the use]. Minsk, 2014 [in Russ.].
3. Yagovenko T. V., Rudometkina M. V., Rudometkin S. V., et al. Usovershenstvovannyi kolorimetricheskii metod opredeleniya alkaloidov v lyupine [Advanced colorimetric method for the determination of alkaloids in lupine]. *Kormoproizvodstvo*. 2004. No. 3. P. 27–29 [in Russ.].
4. Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rastenii po belkam semyan [Identification of varieties and registration of the genofond of cultivated plants by seed proteins] / ed. by V. G. Konarev. Saint Petersburg, 2000 [in Russ.].
5. Eggi E. E. Identifikatsiya sortov lyupina uzkolistnogo (*Lupinus angustifolius* L.) s ispol'zovaniem elektroforeticheskogo spektra polipeptidov belkov semyan [Identification of varieties of blue lupine (*Lupinus angustifolius* L.) using electrophoretic spectrum of polypeptides seed proteins]. Saint Petersburg, 2013 [in Russ.].
6. Yang H., Renshaw D., Thomas G., et al. A strategy to develop molecular markers applicable to wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*L. angustifolius* L.). *Mol. Breeding*. 2008. Vol. 21. P. 473–483.
7. Kamel K. A., Swiecicki W., Kaczmarek Z., et al. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2015. Vol. 3. P. 239–245.
8. Świecicki W., Kamel K., Barzyk P. Alkaloids in seeds of the Polish *Lupinus angustifolius* L. collection. *Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015)*. Milan, 2015. P. 129.
9. Mulder P. P. J., de Nijs M. Determination of quinolizidine alkaloids in lupin flour by LC-MS/MS A promising novel way of analysis. *Proc. Book of the XIV Int. Lupin conf. (Milan, 21–26 June, 2015)*. Milan, 2015. P. 75.
10. Anokhina V. S., Tsibul'skaya I. Yu. O vozmozhnosti ispol'zovaniya sovremennykh metodicheskikh priemov analiza kachestvennogo sostava kompleksa alkaloidov lyupina [On the possibility of the use of modern teaching methods of the analysis of qualitative composition of the complex alkaloid lupine]. *Proc. Int. sci. and pract. conf. (Moscow, 7–9 August, 2006)*. Moscow, 2006. Vol. 2. P. 46–48 [in Russ.].
11. Romanchuk I. Yu., Anokhina V. S. Alkaloidnyi i belkovyi komplekсы kak markernye priznaki dlya geneticheskoi kharakteristiki vidov lyupina [Alkaloid and protein complexes as marker signs for genetic characteristics of species of lupin]. *Proc. Book Int. sci. conf. (Saint Petersburg, 1–3 Novemb., 2016)*. Saint Petersburg, 2016. P. 87–89 [in Russ.].
12. Eggi E. E., Vishnevskaya M. S., Ageeva P. A., et al. Ispol'zovanie polimorfizma belkov semyan dlya sortovoi identifikatsii lyupina uzkolistnogo (*Lupinus angustifolius* L.) [Using polymorphism seed proteins for varietal identification of blue lupine (*Lupinus angustifolius* L.)]. *Agrarnaya Rossiya*. 2012. No. 4. P. 2–8 [in Russ.].
13. Romanchuk I. Yu., Anokhina V. S., Sauk I. B., et al. Molekulyarno-geneticheskaya i biokhimicheskaya kharakteristika obraztsov sterzhnevoi kollektsii lyupina zheltogo [Molecular genetic and biochemical characterization of samples of core collection of yellow lupine]. *Tr. BGU. Ser.: Fiziol., biokhim. i mol. osnovy funkts. biosist.* 2015. Vol. 10, No. 1. P. 127–132 [in Russ.].

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАЗМИДЫ pK18mob ДЛЯ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Е. Г. ВЕРЕМЕЕНКО¹⁾, Ю. А. ШИЛОВА¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

В результате исследования разработана методика сайт-направленного инсерционного мутагенеза с использованием суицидального интегративного вектора pK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*. Показано, что оптимальное соотношение клеток донора и реципиента составляет 50 : 50. Вместе с тем у бактерий *P. chlororaphis*, а также их подвидов наблюдается смещение оптимального соотношения в сторону преобладания клеток донора. Использование данной методики позволяет увеличить выход трансконъюгантов более чем в четыре раза, что существенно расширяет возможности по поиску и отбору интересующих исследователя вариантов штаммов. Установлено, что коллекционные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* обладают различными скоростями роста. Продemonстрировано, что в геномах всех исследованных штаммов присутствует ген *psrA*.

Ключевые слова: сайт-специфический инсерционный мутагенез; суицидальный интегративный вектор; генно-инженерная конструкция; трансконъюганты.

OPTIMIZATION OF METHODS OF SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS FOR *PSEUDOMONAS* BACTERIA GENUS USING pK18mob PLASMID VECTOR

E. G. VEREMEENKO^a, Y. A. SHILOVA^a, N. P. MAXIMOVA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: veremeenkokatya@yandex.ru

In the course of this study, a method for site-directed insertional mutagenesis was developed using the pK18mob suicide integral vector for bacteria of the genus *Pseudomonas*. It is shown that the optimal ratio of donor and recipient cells is 50 : 50. At the same time, in bacteria of *P. chlororaphis*, as well as their subspecies, the optimal ratio is shifted towards the predominance of donor cells. The use of this technique allows to increase the yield of transconjugants more than 4 times, which significantly expands the possibilities for searching and selecting the variants of strains of interest

Образец цитирования:

Веремеенко Е. Г., Шилова Ю. А., Максимова Н. П. Оптимизация методики проведения сайт-направленного мутагенеза с использованием плазмиды pK18mob для бактерий рода *Pseudomonas* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 56–61.

For citation:

Veremeenko E. G., Shilova Y. A., Maximova N. P. Optimization of methods of site-specific mutagenesis for *Pseudomonas* bacteria genus using pK18mob plasmid vector. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 56–61 (in Russ.).

Авторы:

Екатерина Геннадьевна Веремеенко – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Юлия Александровна Шилова – аспирантка кафедры генетики биологического факультета.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

Authors:

Katsiaryna Veremeenko, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

veremeenkokatya@yandex.ru

Yuliya Shilova, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

juliashilova1@gmail.com

Natalia Maximova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

nataliamaximova@yahoo.com

to the researcher. It was also found that the collection strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* have different growth rates. It was demonstrated that the gene *psrA* is present in the genomes of all strains studied.

Key words: site-specific insertion mutagenesis; suicide integrative vector; geno-engineering construction; trans-conjugants.

Введение

Сайт-направленный инсерционный мутагенез относится к наиболее перспективным подходам к изучению функции генов и их продуктов. Одним из интегративных суицидальных векторов, используемых для проведения сайт-направленного мутагенеза, является плаزمида pK18mob. Данный вектор имеет относительно небольшой размер – около 3 т. п. о., что облегчает его перенос в клетки реципиента. В составе плазмиды имеются гены устойчивости к антибиотикам ампициллину и канамицину, позволяющие проводить селективный отбор трансконъюгантов. В участке, где локализован ген устойчивости к ампициллину, помещен полилинкер. В данный сайт осуществляется клонирование участка гена, который собираются инактивировать. Это делается в целях создания области гомологии между плазмидой и хромосомой и обеспечивает дальнейшее встраивание плазмиды в ген посредством гомологичной рекомбинации. С обеих сторон полилинкер окружен областями, гомологичными участкам генома фага M13, что дает возможность использовать стандартные праймеры для последующего обнаружения сайта, в который внедрена генно-инженерная конструкция. Плаزمида переносится в клетки донора только путем конъюгации, что позволяет использовать ее для направленной инактивации генов у тех бактерий, у которых трансформация невозможна или затруднительна [1]. Кроме того, такой способ передачи повышает эффективность ее интеграции в геном. Данный тип клонирующих векторов обеспечивает иммобилизацию в широком диапазоне грамотрицательных и грамположительных бактерий. Как известно, большое влияние на эффективность инсерционного мутагенеза с использованием pK18mob оказывает подбор оптимальных концентраций клеток донора и реципиента, используемых в скрещивании. Следовательно, определение этих параметров – важное условие эффективной инактивации целевого гена. Большинство работ, посвященных инактивации генов с помощью вектора pK18mob, касаются бактерий родов *Xanthomonas*, *Corynebacterium* и *Rhizobium*, тогда как для бактерий рода *Pseudomonas*, представители которых являются продуцентами многих ценных биологически активных соединений, эта методика применяется достаточно редко [2].

Цель настоящей работы – подбор и оптимизация условий для проведения сайт-направленного инсерционного мутагенеза с использованием плазмиды pK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*.

Материалы и методика исследований

В работе использовали штамм *P. chlororaphis* ssp. *aurantiaca* B-162 из коллекции кафедры генетики БГУ (коллекционный номер ВКМВ-162), а также штаммы *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. mendocina*, *P. aureofaciens*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* B-1391, *P. corrugata* из коллекции БГУ, мобилизирующий штамм *E. coli* BW19851 (*recA*, Ω RP4 *tra*, *uidA::pir+*) [3] из коллекции кафедры молекулярной биологии БГУ.

Бактерии культивировали в стандартных питательных средах: в питательной среде для антибиотиков (ПСА), предложенной в [4], питательном бульоне (ПБ), приготовленном на основе сухого концентрата, производства ФГУП «НПО «Микроген»» (г. Махачкала, Россия). Количество жизнеспособных клеток определяли методом серийных разведений путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашках Петри на агаризованной среде. Бактерии рода *Pseudomonas* культивировались при температуре 28 °C, а *E. coli* – при температуре 37 °C. Жизнеспособность клеток определяли по методу Коха.

Полимеразную цепную реакцию проводили в смеси стандартного состава [5] согласно рекомендациям производителя с использованием программируемого амплификатора Thermo HybaibPX2 (США). Параметры циклов амплификации: первичная денатурация – 1 мин при 94 °C; затем 10 циклов: денатурация – 94 °C, 30 с; отжиг – 59 °C, 30 с; элонгация – 68 °C, 1 мин; 20 циклов: денатурация – 94 °C, 30 с; отжиг – 53 °C, 30 с; элонгация – 68 °C, 1 мин; заключительная достройка – 70 °C, 5 мин. Для идентификации инсерции генно-инженерной конструкции на основе плазмиды pK18mob в область хромосомного *psrA*-гена проводили ПЦР-анализ (ПЦР – полимеразная цепная реакция) с использованием смеси полимераз Taq и Pfu и праймеров к полноразмерному гену. ПЦР-анализ на наличие генно-инженерной конструкции в составе бактериальной хромосомы осуществляли по следующей программе амплификации: первичная денатурация – 3 мин при 94 °C; затем 30 циклов: денатурация – 94 °C, 1 мин; отжиг – 55 °C, 30 с; элонгация – 68 °C, 3 мин; заключительная достройка – 68 °C, 5 мин. Использовали ПЦР-амплификатор C1000 Touch™ ThermalCycler BIO RAD (Германия).

В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы MBIFermentas (Литва).

Результаты исследований и их обсуждение

Поскольку была поставлена задача по стандартизации методик сайт-направленного мутагенеза с использованием плазмиды rK18mob для всех бактерий рода *Pseudomonas*, на следующем этапе работы проводилась проверка на наличие гена *psrA*, который был выбран в качестве мишени для инактивации, так как согласно литературным данным он должен присутствовать в геномах большинства представителей этого рода [6; 7]. Для проверки наличия данного гена в геномах коллекционных штаммов был проведен ПЦР-скрининг с использованием праймеров к данному гену. Полученные результаты представлены на рис. 1.

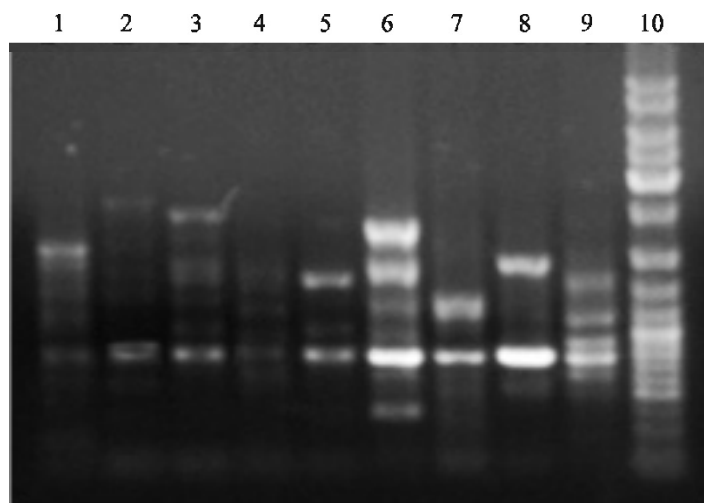


Рис. 1. Электрофоретический анализ на наличие *psrA*-гена у бактерий рода *Pseudomonas*:
1 – *P. putida*; 2 – *P. mendocina*; 3 – *P. chlororaphis aureofaciens*; 4 – *P. syringae*;
5 – B-162; 6 – *P. aeruginosa*; 7 – *P. fluorescens*; 8 – *P. chlororaphis*; 9 – *P. corrugata*;
10 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Mid Range 10 kb DNA Ladder

Fig. 1. Electrophoretic analysis for the presence of the *psrA* gene in bacteria of the genus *Pseudomonas*:
1 – *P. putida*; 2 – *P. mendocina*; 3 – *P. chlororaphis aureofaciens*; 4 – *P. syringae*;
5 – B-162; 6 – *P. aeruginosa*; 7 – *P. fluorescens*; 8 – *P. chlororaphis*; 9 – *P. corrugata*;
10 – marker of molecular weights of DNA fragments Mid Range 10 kb DNA Ladder

Из литературных источников известно, что большое влияние на эффективность инсерционного мутагенеза с использованием rK18mob оказывает подбор оптимальных концентраций клеток донора и реципиента, используемых в скрещивании. Соответственно, необходимо было подобрать такие соотношения для бактерий рода *Pseudomonas*. Однако для этого на предварительном этапе требовалось установить ростовые характеристики коллекционных штаммов *Pseudomonas* и мобилизующего штамма *E. coli* BW19851. Данные бесплазмидные штаммы предварительно были проверены на способность к росту в присутствии антибиотика канамицина, устойчивости к которому обеспечивается плазмидой rK18mob. Оказалось, что практически все штаммы, за исключением *P. aeruginosa*, проявляют высокую чувствительность к данному антибиотику. Все они, кроме устойчивого вида, были использованы в дальнейших экспериментах.

Полученные результаты продемонстрировали, что все исследованные штаммы обладают различными скоростями роста. По этому параметру данные штаммы бактерий можно условно разделить на три группы. Первая группа включает бактерии, обладающие относительно невысокими скоростями роста. В нее входят *E. coli* BW19851, *P. syringae*, *P. chlororaphis ssp. aureofaciens*, *P. mendocina*, *P. corrugata*. Ко второй группе отнесены бактерии, скорость роста которых приблизительно в два раза ниже таковой контрольного штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162. Это бактерии *P. chlororaphis* B-1391, *P. putida*. Штамм *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162, как оказалось, обладал наибольшей скоростью роста и был выделен в самостоятельную группу.

На следующем этапе работы была проведена серия экспериментов по подбору оптимальных температурных условий для осуществления конъюгации исследуемых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* и штамма *E. coli* BW19851, который использовался в качестве донора рекомбинантной плазмиды. Температуры в эксперименте варьировали от 28 °C (температура, оптимальная для реципиента) до 37 °C (температура, оптимальная для донора). В пределах проводимого опыта использовались также температуры 29, 30 и 31 °C, но в этом случае не наблюдалось образования трансконъюгантов. Показано,

что штамм *E. coli* BW19851 рос при всех температурах примерно с одинаковой интенсивностью, тогда как задержка роста *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 наблюдалась уже при 32 °C, а при 37 °C рост отсутствовал. В связи с этим для дальнейших экспериментов по скрещиванию решено было использовать температуру, оптимальную для реципиентов.

Далее, был проведен подбор оптимальных концентраций клеток донора и реципиента для всех анализируемых штаммов в целях увеличения выхода трансформантов. Полученные данные приведены в таблице.

Соотношение клеток донора и реципиента
для сайт-направленного мутагенеза с помощью плазмиды pK18mob
Proportion of donor cells and recipients
for site-directed mutagenesis using plasmid pK18mob

Штамм	Соотношение клеток донора и реципиента, мкл	Количество колоний на чашке
<i>P. putida</i>	50 : 50	11 ± 2
	40 : 60	20 ± 5
	60 : 40	31 ± 3
	70 : 30	29 ± 5
<i>P. chlororaphis ssp. aurantiaca</i> B-162	50 : 50	18 ± 1
	40 : 60	23 ± 2
	60 : 40	0
	70 : 30	36 ± 7
<i>P. mendocina</i>	50 : 50	12 ± 3
	40 : 60	22 ± 3
	70 : 30	17 ± 1
<i>P. chlororaphis aureofaciens</i>	50 : 50	20 ± 4
	40 : 60	9 ± 2
	70 : 30	2,0 ± 0,3
<i>P. syringae</i>	50 : 50	17 ± 1
	40 : 60	27 ± 3
	70 : 30	31 ± 6
<i>P. fluorescens</i>	50 : 50	32 ± 2
	40 : 60	27 ± 4
	70 : 30	25 ± 2
<i>P. chlororaphis</i> B-1391	50 : 50	13 ± 3
	40 : 60	15 ± 1
	70 : 30	19 ± 6
<i>P. corrugata</i>	50 : 50	4,0 ± 0,7
	40 : 60	21 ± 5
	70 : 30	17 ± 2

На основании результатов исследований нами была предложена методика конъюгации для бактерий рода *Pseudomonas*. Установлено, что оптимальное соотношение клеток донора и реципиента для большей части исследованных в этом отношении представителей рода *Pseudomonas* достигает почти 50 : 50. При данном соотношении и близком к нему соотношении 40 : 60 наблюдается наибольшее количество колоний трансконъюгантов у пяти из восьми исследованных штаммов. В то же время интересным оказался тот факт, что для *P. chlororaphis* B-1391 и родственного ему исследуемого штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 оптимальное соотношение «донор – реципиент» было существенно смещено в сторону преобладания клеток донора. Вследствие этого именно данное соотношение и было в дальнейшем использовано для проведения экспериментов по сайт-направленному инсерционному мутагенезу.

Продemonстрировано также, что большую роль в увеличении выхода трансконъюгантов играло совместное выдерживание клеток донора и реципиента в жидкой среде в течение 1 ч до внесения их на агаризованный питательный субстрат. Исходя из этого, была выработана следующая методика.

Первый день. Засевали ночную культуру в рыбный бульон (клетки донора и реципиента). В роли донора выступала *E. coli* BW19851.

Второй день. Измерив оптическую плотность (ОП) ночной культуры клеток при длине волны 600 нм ($ОП_{600}$), с помощью полученных ранее графиков кривых роста вычисляли концентрацию клеток донора и реципиента и затем смешивали их в соотношении 70 : 30 так, чтобы количество клеток реципиента было не менее $1 \cdot 10^9$. Смесь клеток донора и реципиента инкубировали в жидкой питательной среде в течение часа и затем после осаждения переносили на поверхность полноценной агаризованной среды в виде медальонов. Чашки инкубировали 24 ч при 28 °С.

Третий день. В чашки с полноценной агаризованной средой, содержащей 50 мкг/мл канамицина и 200 мкг/мл левомицетина (использовали для удаления клеток донора, содержащих плазмиду), с помощью шпателя высевали клетки, выросшие в медальонах. Инкубировали чашки 42 ч при 28 °С.

Пятый день. Идентификация трансконъюгантов. По разработанной методике конъюгации был проведен инсерционный мутагенез штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162. Для этого фрагмент размером 230 п. о., соответствующий центральной области гена *psrA*, был клонирован в составе суицидального интегративного вектора pK18mob для создания области гомологии мутирующей генно-инженерной конструкции с необходимым участком генома. Полученная генно-инженерная конструкция была обозначена как pK18mob230*psrA*. В результате проведения скрещивания исследуемого штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 с донорным штаммом *E. coli* BW19851, несущим генно-инженерную конструкцию pK18mob230*psrA*, было отобрано 60 трансконъюгантов. Для идентификации вставки в нужную область генома был проведен ПЦР-анализ с помощью праймеров к полноразмерному гену *psrA* (рис. 2).

В результате проведения ПЦР-анализа был получен ожидаемый фрагмент размером 4770 п. о., который соответствует размеру гена *psrA*, содержащего инсерцию вектора pK18mob230*psrA*, а также выявлено отсутствие фрагмента в 750 п. о., соответствующего полноразмерному гену. Из приведенных данных следует, что инсерция генно-инженерной конструкции произошла в требуемую область.

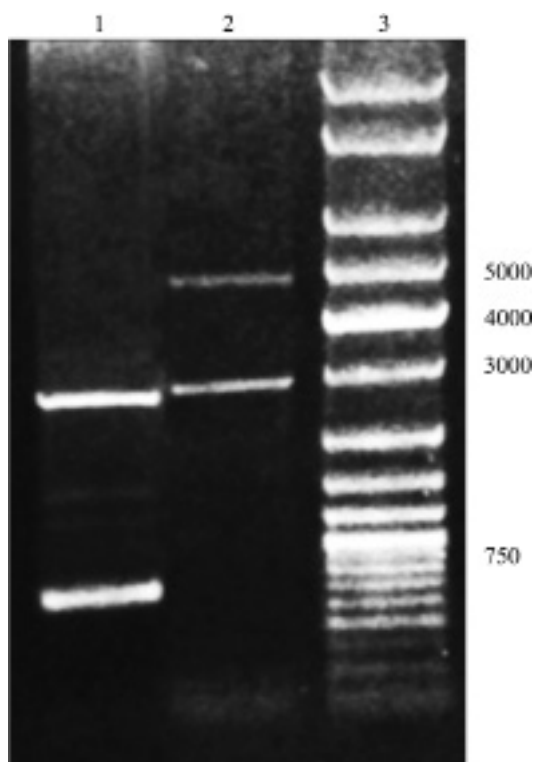


Рис. 2. ПЦР-анализ трансконъюгантов на основе *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162:
1 – штамм дикого типа B-162; 2 – рекомбинантный штамм B-162 pK18mob230*psrA*; 3 – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК Long Range DNA Ladder (100 bp – 10 kb), Jena Bioscience

Fig. 2. PCR analysis of transconjugants based on *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162:
1 – wild type strain B-162; 2 – recombinant strain B-162 pK18mob230*psrA*; 3 – marker of molecular weights of DNA fragments Long Range DNA Ladder (100 bp – 10 kb), Jena Bioscience

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования были подобраны оптимальные условия проведения сайт-направленного инсерционного мутагенеза с использованием суицидального интегративного вектора рK18mob для бактерий рода *Pseudomonas*. Данная методика дает возможность существенно увеличить выход трансконъюгантов (более чем в четыре раза), содержащих вставку генно-инженерной конструкции в целевой области, у представителей данного рода. Это, в свою очередь, расширяет возможности отбора штаммов с наиболее интересными фенотипическими проявлениями мутаций в данном гене, что позволяет точнее определить его функциональное значение и роль PsrA-белка в регуляции вторичного метаболизма у представителей рода *Pseudomonas*. Наличие данного гена в геномах всех исследованных в этом отношении штаммов *Pseudomonas* дополнительно подтверждает его важность для протекания биохимических процессов в клетках бактерий этого рода.

Библиографические ссылки

1. Katzen F., Becker A., Ielmini V. M., et al. New Mobilizable Vectors Suitable for Gene Replacement in Gram-Negative Bacteria and Their Use in Mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65, № 1. P. 278–282.
2. Garcia B., Olivera E. R. Strategy for Cloning Large Gene Assemblages as Illustrated Using the Phenylacetate and Polyhydroxyalkanoate Gene Clusters // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 5019–5025.
3. Metcalf W. W., Jiang W., Wanner B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. Vol. 138. P. 1–7.
4. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains // J. Bacteriol. 1970. Vol. 103, № 1. P. 16–19.
5. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York, 2001.
6. Kang Y., Lunin V. V., Skarina T., et al. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. Microbiol. 2009. Vol. 73, № 1. P. 120–136.
7. Chatterjee A., Cui Y., Hasegawa H., et al. PsrA, the *Pseudomonas* Sigma Regulator, Controls Regulators of Epiphytic Fitness, Quorum-Sensing Signals, and Plant Interactions in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Strain DC3000 // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, № 11. P. 3684–3694.

References

1. Katzen F., Becker A., Ielmini V. M., et al. New Mobilizable Vectors Suitable for Gene Replacement in Gram-Negative Bacteria and Their Use in Mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65, No. 1. P. 278–282.
2. Garcia B., Olivera E. R. Strategy for Cloning Large Gene Assemblages as Illustrated Using the Phenylacetate and Polyhydroxyalkanoate Gene Clusters. Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 5019–5025.
3. Metcalf W. W., Jiang W., Wanner B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. Gene. 1994. Vol. 138. P. 1–7.
4. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains. J. Bacteriol. 1970. Vol. 103, No. 1. P. 16–19.
5. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York, 2001.
6. Kang Y., Lunin V. V., Skarina T., et al. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 2009. Vol. 73, No. 1. P. 120–136. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06757.x.
7. Chatterjee A., Cui Y., Hasegawa H., et al. PsrA, the *Pseudomonas* Sigma Regulator, Controls Regulators of Epiphytic Fitness, Quorum-Sensing Signals, and Plant Interactions in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Strain DC3000. Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, No. 11. P. 3684–3694.

Статья поступила в редколлегию 28.11.2016.
Received by editorial board 28.11.2016.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНОГО ГЕНА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЛЯГУШКИ И ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА К В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI*

Н. В. СОВГИР¹⁾, С. Г. ГОЛЕНЧЕНКО¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Исследовалось клонирование и изучались особенности экспрессии в клетках *E. coli* химерного гена, состоящего из генов антимикробного пептида лягушки (*Rana esculenta* L., 1758) эскулентина и эндолизина бактериофага К семейства Myoviridae. Разработаны праймеры для слияния генов эскулентина и эндолизина стафилококкового бактериофага К для получения химерного белка с гистидиновой меткой на С-конце. Гибридный ген клонирован в клетках бактерий *E. coli* и секвенирован. В результате индукции экспрессии гена установлено внутриклеточное накопление химерного белка эскулентин-С/эндолизин КHis, который синтезируется в клетках *E. coli* преимущественно в нерастворимой форме, однако часть белковых молекул остается растворимой и проявляет литическую активность против живых клеток *Staphylococcus aureus*. Области применения: биотехнология, молекулярная биология, фармацевтика.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; эскулентин; эндолизин стафилококкового бактериофага К; фьюжн-белок; антистафилококковая активность; КОЕ.

EXPRESSION FEATURES OF HYBRID GENE OF FROG ANTIMICROBIAL PEPTIDE AND STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE K ENDOLYSIN IN BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

N. V. SOVGIR^a, S. G. GOLENCHENKO^a, U. A. PRAKULEVICH^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: sovgirnv@inbox.ru

The aim of this study was cloning and expression analysis of hybrid gene consisted of frog (*Rana esculenta* L., 1758) antimicrobial peptide esculentin gene and the Myoviridae family staphylococcal bacteriophage K endolysin gene in *E. coli* cells. Primers to fuse esculentin and staphylococcal bacteriophage K endolysin genes were designed to obtain the chimeric protein with His-tag at the C-terminus. The hybrid gene was cloned in *E. coli* cells and sequenced. The subsequent

Образец цитирования:

Совгир Н. В., Голенченко С. Г., Прокулевич В. А. Особенности экспрессии химерного гена антимикробного пептида лягушки и эндолизина бактериофага К в бактериях *Escherichia coli* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 62–70.

For citation:

Sovgir N. V., Golenchenko S. G., Prakulevich U. A. Expression features of hybrid gene of frog antimicrobial peptide and staphylococcal bacteriophage K endolysin in bacteria *Escherichia coli*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 62–70 (in Russ.).

Авторы:

Наталья Владимировна Совгир – ассистент кафедры микробиологии биологического факультета.
Сергей Георгиевич Голенченко – научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета.
Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Natalia Sovgir, assistant at the department of microbiology, faculty of biology.
sovgirnv@inbox.ru
Sergey Golenchenko, researcher at the department of microbiology, faculty of biology.
golenchenko@inbox.ru
Uladzimir Prakulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.
prakulevich@mail.ru

analysis of gene expression revealed the intracellular accumulation of fusion protein esculentin-C/endolysin KHis. Recombinant protein accumulated in *E. coli* cells predominantly in the insoluble form, but some of protein molecules remained soluble and exhibited antistaphylococcal activity. Applications: biotechnology, molecular biology, pharmaceuticals.

Key words: antimicrobial peptides; esculentin; staphylococcal bacteriophage K endolysin; fusion protein; antistaphylococcal activity; CFU (colony forming unit).

Введение

Проблема широкого распространения множественно резистентных штаммов патогенных бактерий остается крайне актуальной для медицины и ветеринарии [1]. Новый класс антибактериальных агентов – антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются многими исследователями как потенциальный прорыв в решении данной проблемы [2]. Одними из самых активных АМП являются пептиды группы эскулентинов, выделенные из кожных секретов прудовой лягушки (*Rana esculenta* L., 1758), в частности эскулентин-1b и его полный функциональный аналог эскулентин-С. Эскулентин-С – это короткий катионный мембранотропный пептид, антимикробное действие которого заключается в нарушении целостности бактериальных мембран. Благодаря низкой специфичности механизма действия эскулентин-С эффективен в отношении широкого спектра инфекционных агентов, включая грамотрицательные и грамположительные бактерии [2–4].

Основное препятствие для широкого применения эскулентинов – сложность их получения: методы выделения из природного источника и химический синтез обеспечивают лишь аналитические количества целевого пептида, а биологический синтез сталкивается с проблемой токсичности продукта для бактерии-продуцента [4; 5]. Между тем существует подход к биотехнологическому синтезу эскулентина в составе рекомбинантных фьюжн-белков. Белок-партнер в таких конструкциях должен обратимо инактивировать эскулентин (например, способствуя образованию нерастворимых агрегатов), в результате чего решается проблема токсичности для продуцента. После накопления достаточного количества продукта АМП может быть реактивирован путем рефолдинга, отщепления от партнера или иным способом.

В настоящей работе белком-партнером эскулентина-С выступал эндолизин стафилококкового бактериофага К – эндолизин К, что обусловлено рядом причин. Во-первых, эндолизин К хорошо экспрессируется в клетках *E. coli*, где накапливается в виде телец включения. Во-вторых, он достаточно крупный (495 а. о.) для того, чтобы экранировать эскулентин в тельцах включения, но в то же время эффективно поддается рефолдингу, что позволяет получить активный продукт в препаративных количествах. В-третьих, данный белок обладает мощнейшим и специфическим литическим действием против живых клеток *Staphylococcus aureus*, что дает возможность использовать его в качестве репортерной метки, позволяющей выявлять пикомолярные количества целевого фьюжн-продукта, если он находится в активной форме [6; 7]. Более того, при отсутствии интерференции активностей эскулентина-С и эндолизина К химерный белок можно будет использовать *tale quale* без дополнительных этапов отрезания и очистки эскулентина. Цель настоящей работы – получение и исследование экспрессии в клетках *E. coli* гибридного белка эскулентин-С/эндолизин КHis, который несет на С-конце гистидиновою метку для металл-хелатной хроматографии.

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы. Для клонирования рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* XL-1Blue (F' *proAB lacI^qlacZΔM15 Tn10(Tc^r)/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ. Для индуцибельной экспрессии генов в системе экспрессии бактериофага Т7 [8] применяли штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (F' *ompT hsdS r_Bm_B*)*dcm* + Tet^r *gal* □ (DE3) *endA Hte* [*argU proL Cam^r*] [*argU ileY leuW Strep/Spec^r*]) из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ. Штамм *S. aureus* 141 из коллекции научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ использовали при определении антистафилококковой активности белка турбидиметрическим методом.

Плазмиды и гены. Ранее сконструированные плазмиды pET-Esc-C [5] и pET-LD3K1 [6], выступающие в качестве матриц в полимеразной цепной реакции (ПЦР), включают кодирующие области генов антимикробного пептида эскулентина-С (141 п. о.) и полноразмерного эндолизина бактериофага К (1485 п. о.) соответственно с модифицированными для усиления экспрессии в клетках бактерий *E. coli* синонимическими кодонами. Гены *esc-C* и *lysK* клонированы по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI. Плазмиду pET-24b(+) (*Novagen*, Великобритания) использовали в качестве вектора для клонирования гибридного гена.

Амплификация генов. Амплификацию проводили при помощи ПЦР в смеси стандартного состава [9] с использованием программируемого термостата Veriti 96 Well Thermal Cyclor (*Applied Biosystems*, Великобритания) и реактивов компании *Thermo Scientific* (Литва). В работе использовали праймеры производства фирм *Invitrogen* (США) и *Праймтех* (Беларусь). Дизайн праймеров и их анализ осуществляли при помощи программы *OligoAnalyzer 3.1* [10]. Режим ПЦР с праймерами EscCLysK-F и LysK_R_His: 94 °C – 5 мин; 94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 3 мин (30 циклов); 72 °C – 7 мин. Режим ПЦР с праймерами EscCL-F и LysK_R_His: 94 °C – 5 мин; 94 °C – 30 с, 62 °C – 30 с, 72 °C – 3 мин (30 циклов); 72 °C – 7 мин.

Генно-инженерные методы и ферменты. Для клонирования использовали ферменты и буферные системы компании *Thermo Scientific*, коммерческие наборы фирмы *QIAGEN* (Германия). Кальциевую трансформацию бактерий *E. coli* и электрофоретический анализ ДНК проводили согласно стандартным методикам [11].

Индукция экспрессии клонированного гена в составе вектора pET-24b(+). Индукцию проводили согласно предложенному производителем плазмид серии pET протоколу [12]. Ночную культуру бактерий *E. coli* разводили в 20 раз и культивировали в колбах с 10 мл полноценного бульона LB, содержащего канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (15 мкг/мл), при 37 °C с аэрацией и перемешиванием (180 об/мин). При оптической плотности ≈ 1 ($A = 600$ нм) в среду добавляли синтетический аналог лактозы – ИПТГ (изопронил- β -D-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 0,5 ммоль/л. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Cary 50 (*Varian*, США).

Построение кривых роста бактерий и определение t_{tripa} клеток чашечным методом Коха. Ночную культуру бактерий *E. coli* разводили в 20 раз в 100 мл полноценного бульона LB. Спустя 90 мин культивирования при оптической плотности $\approx 0,8$ ($A = 600$ нм) культуры разделяли на две одинаковые порции и в одну из них добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,5 ммоль/л. Оптическую плотность измеряли каждые полчаса на протяжении всего эксперимента с момента разведения ночной культуры. На основе результатов измерений оптической плотности бактериальной культуры в трехкратной повторности вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для построения графиков.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом Коха согласно [13] путем посева суспензии микроорганизмов из ряда последовательных разведений в физиологическом растворе на LB-агар, содержащий канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (15 мкг/мл). На основе результатов подсчета КОЕ в трехкратной повторности вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для построения графиков.

Разрушение бактериальных клеток. Клетки разрушали набором реактивов B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (*Thermo Scientific*, США) согласно инструкции производителя. Лизаты анализировали электрофоретически.

Электрофоретический анализ клеточных белков *E. coli* осуществляли в 16 % полиакриламидных гелях (ПААГ) в денатурирующих условиях по методу Laemmli [14]. Гели окрашивали в растворе Кумасси синего R-250. Аминокислотные последовательности белков анализировали по алгоритму, реализованному в программе *ProtParam* Швейцарского института биоинформатики [15]. Процентное содержание экспрессируемых белков определяли денситометрически, для этого пробы, полученные в результате нескольких (не менее трех) экспериментов по индукции, выравнивали по оптической плотности перед внесением в ПААГ, после электрофореза и окраски гели оцифровывали, а изображения анализировали с использованием программы *TotalLab 2.0* фирмы *Nonlinear Dynamics Ltd.* (Великобритания).

Антистафилококковую активность выявляли в супернатанте лизата клеток, индуцированных при температуре, способствующей повышению растворимости белков (19 °C), по отношению к живым клеткам *S. aureus* 141 турбидиметрическим методом согласно [7]. В качестве отрицательного контроля суспензию клеток штамма *S. aureus* 141 ($A_{600} \approx 0,4$) инкубировали с буфером (CaCl_2 (10 ммоль/л), трис-HCl (50 ммоль/л), pH 7,5), на основе которого готовили бактериальную суспензию. Положительным контролем являлась инкубация суспензии клеток штамма *S. aureus* 141 с супернатантом, содержащим эндолизин К. Результаты анализировали на основе графиков изменения оптической плотности бактериальной суспензии ($A = 600$ нм). Измерения оптической плотности производили на спектрофотометре Cary 50 (*Varian*).

Результаты исследований и их обсуждение

Получение гибридной генетической конструкции *esc-C/lysKHis* на основе генов эскулентина-С (*esc-C*) и полноразмерного эндолизина К (*lysK*) проводили в процессе двух последовательных ПЦР согласно схеме, представленной на рис. 1. Свойства использованных праймеров приведены в таблице.

Характеристика праймеров для синтеза гибридного гена *esc-C/lysKHis*

Primers for hybrid gene *esc-C/lysKHis* synthesis

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'–3'	T_m , °C*	Особенности и дополнительные функциональные участки
Праймер для слияния генов			
EscCLysK-F	attaaaggtgaatgtatggctaaccag	42,2/49,3	Комплементарен к 5'-концу гена <i>lysK</i> и 3'-концу гена <i>esc-C</i>
Прямой праймер к гену <i>esc-C</i>			
EscCL-F	gag catatg ggcatttctccaaattg	59,2	Сайт для рестриктазы <i>Nde</i> I: catatg
Обратный праймер к гену <i>lysK</i>			
LysK_R_His	atgctcg agttgaaaacaccccaagca	59,0	Сайт для рестриктазы <i>Xho</i> I: ctcgag

*Указана T_m (температура плавления праймера) только для участков комплементарности. Жирным шрифтом выделены сайты рестрикции.

* T_m (primer melting temperature) indicated only for complementary parts. Restriction sites are highlighted in bold.

В результате первой реакции (рис. 1, ПЦР 1) с помощью праймеров EscCLysK-F и LysK_R_His на матрице pET-LD3K1 синтезировали фрагмент ДНК, содержащий полноразмерный ген *lysK* с небольшим (15 п. н.) участком гена *esc-C* на 5'-конце. Помимо этого, с помощью праймера LysK_R_His стоп-кодон в конце кодирующей части гена *lysK* заменен на сайт рестрикции *Xho* I, что необходимо для получения белкового продукта с гистидиновой меткой. Продукт первой ПЦР использовали в качестве субстрата для второй (см. рис. 1, ПЦР 2), где он выступал одновременно в роли праймера и матрицы: участок гена *esc-C* на 5'-конце первого продукта образовывал зону комплементарности с 3'-концом гена *esc-C*, благодаря чему происходил синтез гибридной последовательности *esc-C/lysKHis*, затем с помощью праймеров EscCL-F и LysK_R_His данную последовательность амплифицировали (см. рис. 1).

Полученную таким образом химерную последовательность по сайтам рестрикции *Nde* I и *Xho* I вводили в состав вектора pET-24b(+) и клонировали в клетках бактерий *E. coli* XL-1Blue. Наличие целевых вставок во всех клонах проверяли рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Следует отметить, что при клонировании по сайтам *Nde* I и *Xho* I в вектор pET-24b(+) химерный ген *esc-C/lysKHis* становится в одну рамку считывания с последовательностью на плазмиде, детерминирующей синтез пептида из шести «плазмидных» остатков гистидина. В результате экспрессирующийся с данной матрицы белковый продукт несет гистидиновую метку на С-конце. Формированию такой метки на С-конце эндолизина К препятствует тандем стоп-кодонов на 3'-конце последовательности гена *lysK*.

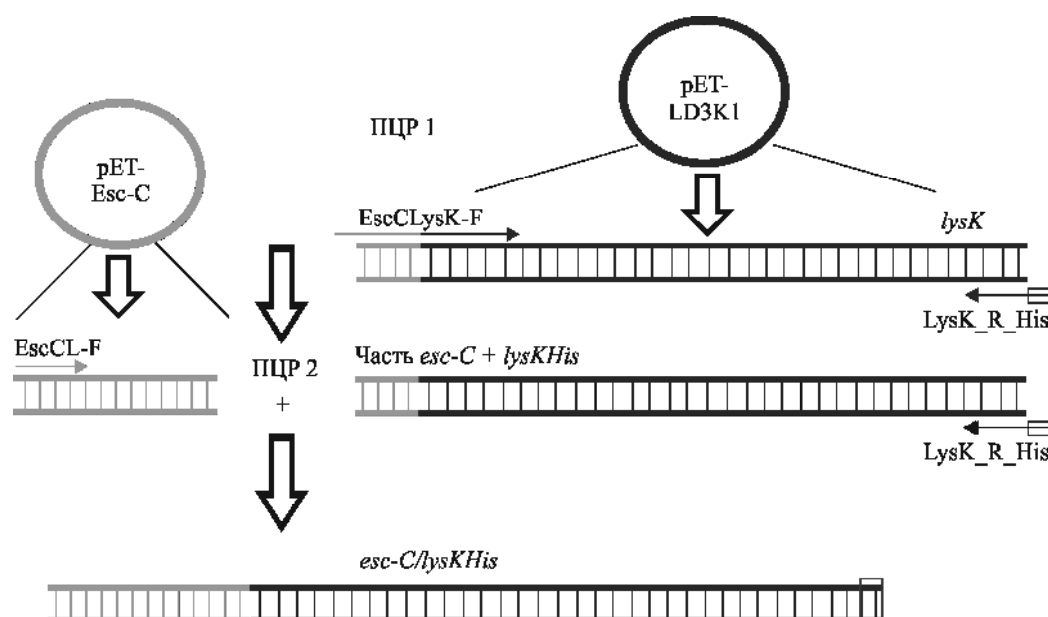


Рис. 1. Схема получения гибридного гена *esc-C/lysKHis*:
EscCLysK-F, EscCL-F – прямые праймеры; LysK_R_His – обратный праймер

Fig. 1. Scheme of hybrid gene *esc-C/lysKHis* synthesis:
EscCLysK-F, EscCL-F – forward primers; LysK_R_His – reverse primer

Рекомбинантной плазмидой, содержащей химерный ген *esc-C/lysKHis*, трансформировали клетки бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Клетки клонов, в которых наличие целевых генов было подтверждено ПЦР, выращивали в течение 4 ч в присутствии ИПТГ для индукции экспрессии, после чего лизаты клеток исследовали электрофоретически.

Результаты электрофоретического анализа суммарных клеточных белков одного из проверенных клонов после индукции представлены на рис. 2. В качестве контролей выступают клетки, несущие собственнo ген эндолизина К (см. рис. 2, дорожка 1), выращенные в тех же условиях, а также клетки с химерным геном, выращенные без индуктора (см. рис. 2, дорожка 3). Белковый продукт, соответствующий по массе эскулентину-С (4,8 кДа), в бактериальных клетках не выявляется (см. рис. 2, дорожка 5), что согласуется с утверждением других авторов о невозможности получения индивидуального эскулентина-С путем биосинтеза в клетках *E. coli* [4]. В клетках, наследующих плазмиду с химерным геном *esc-C/lysKHis*, после индукции накапливается белок, соответствующий по массе ожидаемому фьюжн-продукту эскулентин-С/эндолизин KHis: 60,5 кДа (см. рис. 2, дорожка 2).

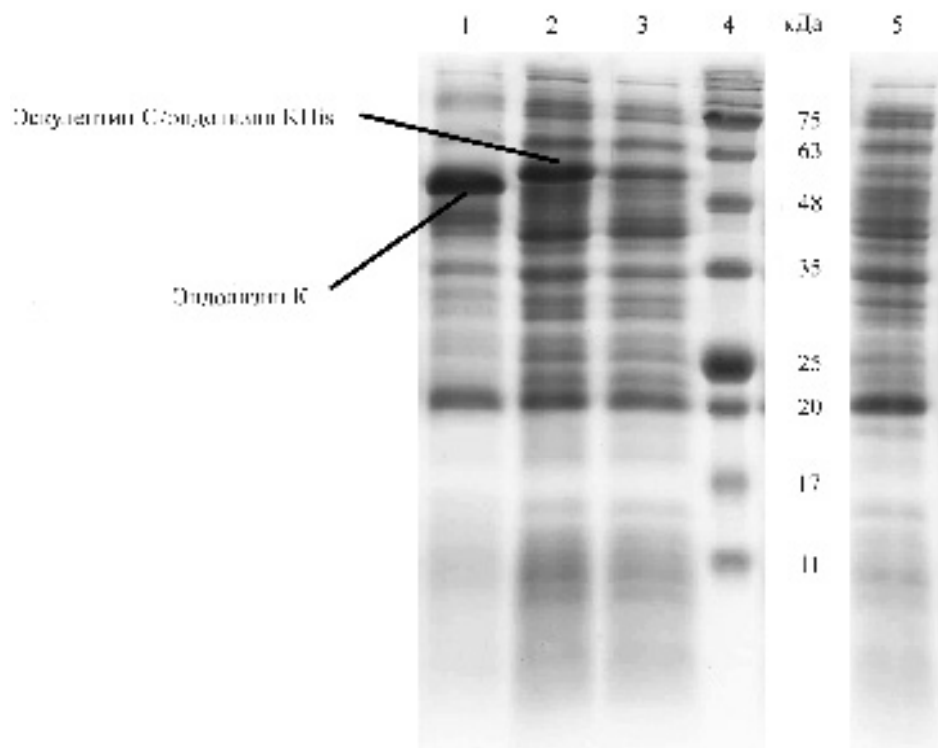


Рис. 2. Электрофоретический анализ суммарных клеточных белков рекомбинантных штаммов *E. coli* через 4 ч после индукции:
1 – эндолизин К (0,5 ммоль/л ИПТГ); 2 – эскулентин-С/эндолизин KHis (0,5 ммоль/л ИПТГ);
3 – эскулентин-С/эндолизин KHis (без ИПТГ, отрицательный контроль); 4 – белки-стандарты молекулярных масс (кДа) Blue wide Range Protein Ladder (Cleave Scientific Ltd., Великобритания);
5 – эскулентин-С (0,5 ммоль/л ИПТГ)

Fig. 2. Electrophoretic data for total cellular proteins of *E. coli* recombinant strains after 4 h induction:
1 – endolysin K (0.5 mmol/l IPTG); 2 – esculentin-C/endolysin KHis (0.5 mmol/l IPTG);
3 – esculentin-C/endolysin KHis (w/o IPTG, negative control); 4 – Blue wide Range Protein Ladder (Cleave Scientific Ltd., United Kingdom); 5 – esculentin-C (0.5 mmol/l IPTG)

По данным денситометрического анализа, содержание химерного белка эскулентин-С/эндолизин KHis в клетках продуцента спустя 4 ч после индукции составляет в среднем 16 % ($\pm 0,27$) общего белка клетки, а интактного эндолизина К достигает 25 %.

Эндолизин К является строго специфическим белком и проявляет лизирующую бактерицидную активность только против бактерий *S. aureus*. Индукция синтеза этого белка в клетках *E. coli* не влияет на динамику роста бактерий и накопление биомассы (рис. 3, 1). Однако индукция синтеза химерного белка, так же как и эскулентина-С, проявляющего антимикробную активность широкого спектра, в том числе в отношении грамотрицательных бактерий, уже через 30 мин после добавления индуктора полностью останавливает накопление биомассы клеток-продуцентов (см. рис. 3, 3 и 4).

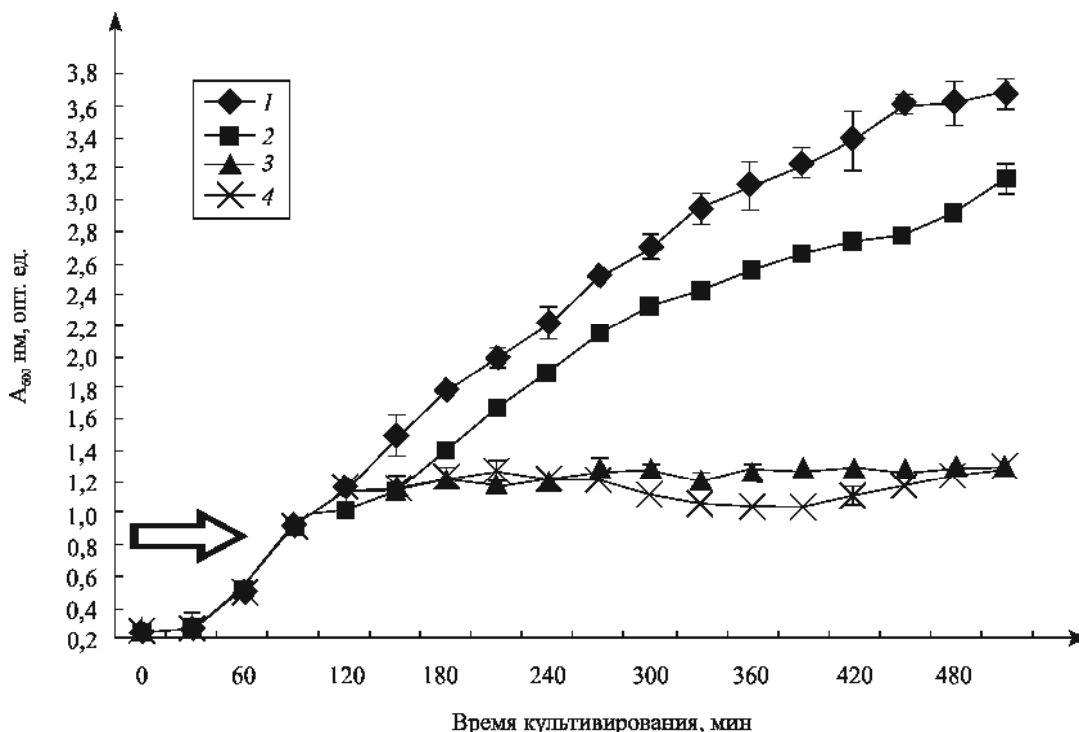


Рис. 3. Изменение оптической плотности культур рекомбинантных штаммов *E. coli* в условиях индукции:
1 – эндолизин К (0,5 ммоль/л ИПТГ); 2 – эскулентин-С/эндолизин КHis (без ИПТГ, отрицательный контроль); 3 – эскулентин-С (0,5 ммоль/л ИПТГ); 4 – эскулентин-С/эндолизин КHis (0,5 ммоль/л ИПТГ).
Стрелкой обозначен момент добавления индуктора (0,5 ммоль/л ИПТГ) при $A_{600} \approx 0,8$

Fig. 3. Optical density dynamics of *E. coli* recombinant strains under induction conditions:
1 – endolysin K (0.5 mmol/l IPTG); 2 – esculentin-C/endolysin KHis (w/o IPTG, negative control);
3 – esculentin-C (0.5 mmol/l IPTG); 4 – esculentin-C/endolysin KHis (0.5 mmol/l IPTG).
Induction time (0.5 mmol/l IPTG) at $A_{600} \approx 0.8$ is indicated by the arrow

Прекращение в условиях индукции накопления биомассы клетками, несущими гены как интактного эскулентина-С, так и химерного белка, сопровождается остановкой роста количества КОЕ (рис. 4, 2 и 3). При этом жизнеспособность бактериальных клеток падает незначительно и восстанавливается после высева бактерий на плотные питательные среды, не содержащие индуктор (ИПТГ), что свидетельствует о бактериостатическом характере наблюдаемого эффекта. Некоторая потеря жизнеспособности индуцированных клеток наблюдается после 5–7 ч культивирования в состоянии индукции на фоне бактериостатического эффекта и, скорее всего, связана с переходом в фазу естественного отмирания (автолиза) неделящихся клеток.

Таким образом, из приведенных данных можно сделать вывод о том, что экспрессия гена антистафилококкового эндолизина К в бактериях *E. coli* происходит с высокой эффективностью (целевой белок составляет до 25 % общего внутриклеточного белка) и накапливаемый белок не влияет на жизнеспособность клеток продуцента. Индукция синтеза антимикробного пептида эскулентина-С в тех же бактериях вызывает бактериостатический эффект, который длится на протяжении всего периода индукции. При этом клетки сохраняют жизнеспособность, их деление восстанавливается при прекращении экспрессии гетерологичного гена в бактериях после высева на питательную среду, не содержащую индуктор. Точно так же ведет себя и химерный белок, т. е. эффект экспрессии эскулентина не меняется при слиянии этого короткого пептида с крупным полноразмерным белком – эндолизином К.

Функциональная целостность эндолизина К в составе фьюжн-белка эскулентин-С/эндолизин КHis также сохраняется, о чем свидетельствуют данные по высокой антистафилококковой активности супернатантов индуцированных культур клеток – продуцентов эндолизина К (рис. 5, 1) и химерного белка (см. рис. 5, 2), в то время как в контроле оптическая плотность суспензии бактерий *S. aureus* 141 не меняется (см. рис. 5, 3).

Результаты экспериментов по выявлению антистафилококковой активности белка эскулентин-С/эндолизин КHis подтверждают в функциональном тесте, что в клетках-продуцентах синтезируется именно гетерологичный рекомбинантный фьюжн-белок, детерминируемый сконструированным химерным геном, а не близкий ему по массе какой-либо белок *E. coli*.

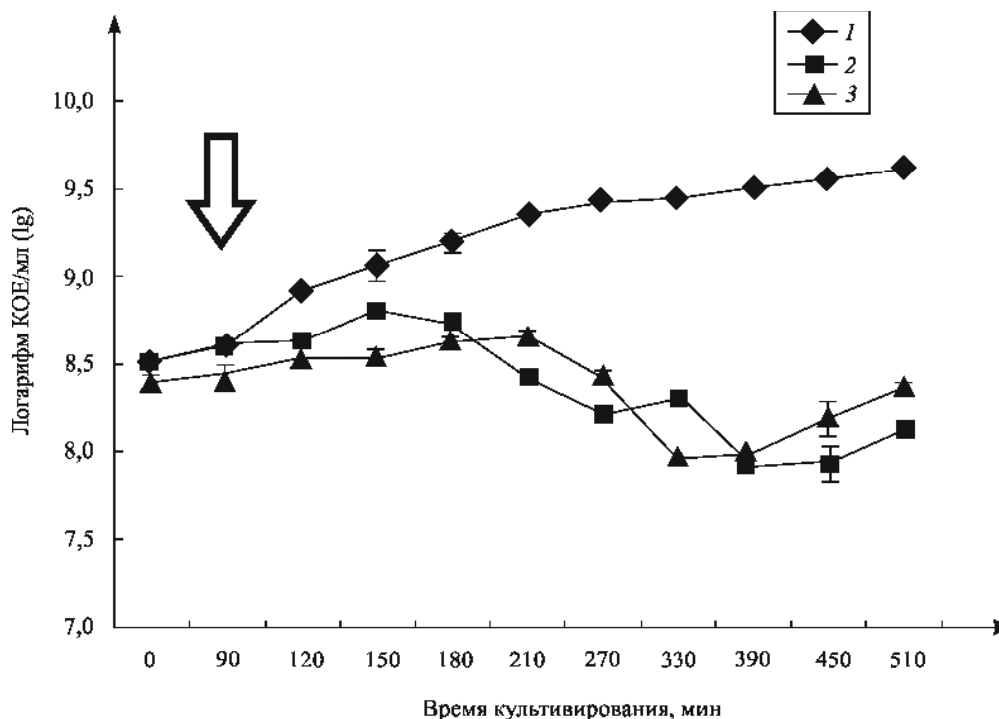


Рис. 4. Жизнеспособность клеток рекомбинантных штаммов *E. coli* в условиях индукции:
1 – эндолизин К; 2 – эскулентин-С; 3 – эскулентин-С/эндолизин KHis.
Стрелкой обозначен момент добавления индуктора (0,5 ммоль/л ИПТГ) при $A_{600} \approx 0,8$

Fig. 4. The viability of *E. coli* recombinant strains under induction conditions:
1 – endolysin K; 2 – esculentin-C; 3 – esculentin-C/endolysin KHis.
Induction time (0.5 mmol/l IPTG) at $A_{600} \approx 0.8$ is indicated by the arrow

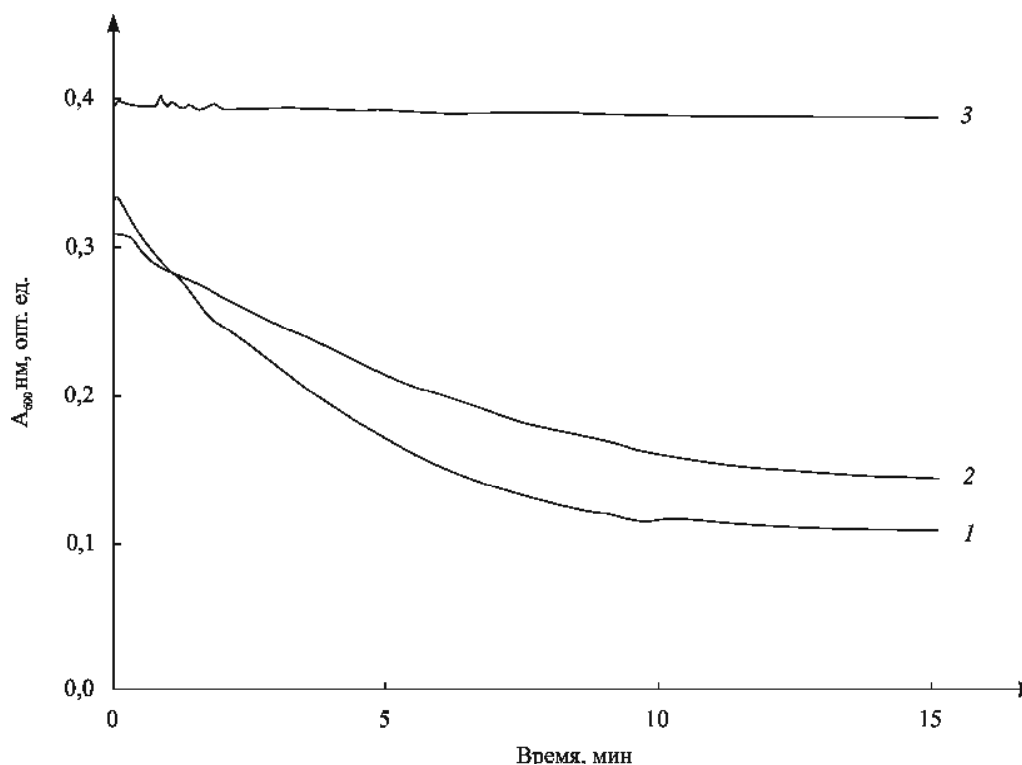


Рис. 5. График изменения оптической плотности суспензии живых клеток штамма *S. aureus* 141:
1 – инкубация с супернатантом, содержащим эндолизин К; 2 – инкубация с супернатантом, содержащим эскулентин-С/эндолизин KHis; 3 – инкубация с буфером (отрицательный контроль)

Fig. 5. Optical density dynamics of *S. aureus* 141 live cells suspension: 1 – incubation with supernatant containing endolysin K; 2 – incubation with supernatant containing esculentin-C/endolysin KHis; 3 – incubation with buffer (negative control)

Антистафилококковая активность супернатантов индуцированных культур указывает на возможность экспрессии генов с правильным фолдингом получаемых белков в процессе биосинтеза. Однако обычно при сверхэкспрессии рекомбинантных белков в *E. coli*, которая наблюдается в исследуемой системе (от 12 до 25 % – целевые белки), избыточное количество белка переходит в неактивную нерастворимую форму, образуя внутри клеток так называемые тельца включения [16].

В целях определения возможных форм состояния фьюжн-белка эскулентин-С/эндолизин КHis проводили индукцию экспрессии кодирующего его гена при температурах 19 и 37 °С, затем клетки разрушали, центрифугировали, а супернатант и осадок подвергали электрофоретическому анализу (рис. 6). В качестве контроля использовали лизат клеток, экспрессирующих интактный эндолизин К.

Белки эскулентин-С/эндолизин КHis и эндолизин К в клетках *E. coli*, как видно на рис. 6, в основном накапливаются в нерастворимой форме при температуре культивирования как 19 °С, так и 37 °С (см. рис. 6, дорожки 2; 4 и 7; 9 соответственно). Одновременно оба белка также присутствуют в растворимой фракции лизата, но в гораздо меньших количествах (см. рис. 6, дорожки 1; 3 и 6; 8 соответственно).

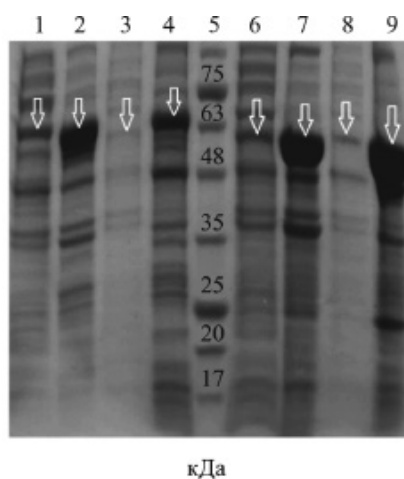


Рис. 6. Электрофоретический анализ белков клеточных лизатов бактерий *E. coli* после индукции:

- 1 – эскулентин-С/эндолизин КHis (супернатант, 19 °С); 2 – эскулентин-С/эндолизин КHis (осадок, 19 °С); 3 – эскулентин-С/эндолизин КHis (супернатант, 37 °С); 4 – эскулентин-С/эндолизин КHis (осадок, 37 °С); 5 – белки-стандарты молекулярных масс (кДа) Blue wide Range Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd., Великобритания); 6 – эндолизин К (супернатант, 19 °С); 7 – эндолизин К (осадок, 19 °С); 8 – эндолизин К (супернатант, 37 °С); 9 – эндолизин К (осадок, 37 °С). Белки эскулентин-С/эндолизин КHis и эндолизин К указаны стрелками

Fig. 6. Electrophoretic data for proteins of *E. coli* cell lysates after induction:

- 1 – esculentin-C/endolysin KHis (supernatant, 19 °C); 2 – esculentin-C/endolysin KHis (sediment, 19 °C); 3 – esculentin-C/endolysin KHis (supernatant, 37 °C); 4 – esculentin-C/endolysin KHis (sediment, 37 °C); 5 – Blue wide Range Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd, United Kingdom); 6 – endolysin K (supernatant, 19 °C); 7 – endolysin K (sediment, 19 °C); 8 – endolysin K (supernatant, 37 °C); 9 – endolysin K (sediment, 37 °C). Esculentin-C/endolysin KHis and endolysin K proteins are indicated by the arrows

Заключение

Таким образом, в клетках бактерий *E. coli* в составе стабильно наследуемого вектора клонирован гибридный ген, детерминирующий синтез фьюжн-белка эскулентин-С/эндолизин КHis. Несмотря на то что синтез химерного белка сопровождается бактериостатическим действием на культуру продуцента, химерный белок эффективно накапливается в клетках продуцента преимущественно в нерастворимой форме. Установленные антистафилококковый и бактериостатический против *E. coli* эффекты химерного белка свидетельствуют о том, что в молекуле сохраняются активности, присущие как эскулентину, так и эндолизину К, выступающим в качестве фьюжн-партнеров в созданной конструкции.

Библиографические ссылки

1. Anthony A. A., Adekunle C. F., Gulshan S., et al. Antibiotic resistant superbugs: assessment of the interrelationship of occurrence in clinical settings and environmental niches // *Molecules*. 2017. Vol. 22, № 1. P. 29–45.
2. Cappiello F., Di Grazia A., Segev-Zarko L. A., et al. Esculentin-1a-derived peptides promote clearance of *Pseudomonas aeruginosa* internalized in bronchial cells of cystic fibrosis patients and lung cell migration: biochemical properties and a plausible mode of action // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, № 12. P. 7252–7262.

3. Ouardien S., Brul S., Zaat S. A. J. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria // *Front. Cell Dev. Biol.* 2016. Vol. 4, № 111. P. 1–16.
4. Ponti D., Mignogna G., Mangoni M. L., et al. Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an antimicrobial peptide from amphibian skin // *Eur. J. of Biochem.* 1999. Vol. 263, № 3. P. 921–927.
5. Совгир Н. В., Прокулевич В. А. Клонирование и экспрессия гена антимикробного белка эскулентина-1b (*Rana esculenta*) в клетках бактерий *Escherichia coli* // Тр. БГУ. Сер.: Биол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2011. Т. 8 : в 2 ч. Ч. 1. С. 70–75.
6. Голенченко С. Г., Прокулевич В. А. Синтез и экспрессия гена лизирующего фермента стафилококкового бактериофага К в клетках *E. coli* // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2012. Т. 7, ч. 1. С. 199–204.
7. Horgan M., O'Flynn G., Garry J., et al. Phage lysin LysK can be truncated to its chap domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant *Staphylococci* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, № 3. P. 872–874.
8. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 189. P. 113–130.
9. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Oxford, 2000.
10. OligoAnalyzer tool [Electronic resource]. URL: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (date of access: 15.02.2015).
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
12. pET Manual system [Electronic resource]. 2005. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf/ (date of access: 02.06.2015).
13. Лысак В. В., Желдакова Р. А. Микробиология : метод. рекомендации к лаб. занятиям, контроль самостоят. работы студентов. Минск, 2002.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
15. ProtParam tool [Electronic resource] // Swiss Institute of Bioinformatics. 2014. URL: <http://web.expasy.org/protparam/> (date of access: 17.02.2016).
16. Singh S. M., Panda A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins // *J. Biosci. Bioeng.* 2005. Vol. 99, № 4. P. 303–310.

References

1. Anthony A. A., Adekunle C. F., Gulshan S., et al. Antibiotic resistant superbugs: assessment of the interrelationship of occurrence in clinical settings and environmental niches. *Molecules*. 2017. Vol. 22, No. 1. P. 29–45.
2. Cappiello F., Di Grazia A., Segev-Zarko L. A., et al. Esculentin-1a-derived peptides promote clearance of *Pseudomonas aeruginosa* Internalized in bronchial cells of cystic fibrosis patients and lung cell migration: biochemical properties and a plausible mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, No. 12. P. 7252–7262.
3. Ouardien S., Brul S., Zaat S. A. J. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016. Vol. 4, No. 111. P. 1–16.
4. Ponti D., Mignogna G., Mangoni M. L., et al. Expression and activity of cyclic and linear analogues of esculentin-1, an antimicrobial peptide from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.* 1999. Vol. 263, No. 3. P. 921–927.
5. Совгир Н. В., Прокулевич В. А. Cloning and expression of antimicrobial peptide esculentin-1b gene (*Rana esculenta*) in *Escherichia coli* cells. *Tr. BGU. Ser.: Fiziol., biokhim. i mol. osnovy funkts. biosist.* 2011. Vol. 8 : in 2 parts. Part 1. P. 70–75 (in Russ.).
6. Golenchenko S. G., Prokulevich V. A. Synthesis and expression of staphylococcal phage lysin gene in *E. coli*. *Tr. BGU. Ser.: Fiziol., biokhim. i mol. osnovy funkts. biosist.* 2012. Vol. 7, part 1. P. 199–204 (in Russ.).
7. Horgan M., O'Flynn G., Garry J., et al. Phage Lysin LysK can be truncated to its chap domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant *Staphylococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, No. 3. P. 872–874.
8. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 189. P. 113–130.
9. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Oxford, 2000.
10. OligoAnalyzer tool [Electronic resource]. URL: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (date of access: 15.02.2015).
11. Maniatis T., Fritch E., Sembruk Dzh. Metody geneticheskoi inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie [Genetic engineering methods. Molecular cloning]. Moscow, 1984 (in Russ.).
12. pET Manual system [Electronic resource]. 2005. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf/ (date of access: 02.06.2015).
13. Lysak V. V., Zheldakova R. A. Mikrobiologiya : metod. rekomendatsii k lab. zanyatiyam, kontrol' samostoyat. raboty studentov [Microbiology : guidelines for laboratory work, control of student's individual work]. Minsk, 2002 (in Russ.).
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
15. ProtParam tool [Electronic resource]. *Swiss Inst. Bioinform.* 2014. URL: <http://web.expasy.org/protparam/> (date of access: 17.02.2016).
16. Singh S. M., Panda A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 2005. Vol. 99, No. 4. P. 303–310.

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

ECOLOGY AND CONSERVANCY

УДК 631.6:631.879.4:631.445.24

АГРОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ НА ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТЫХ ПЕСЧАНЫХ ПОЧВАХ БЕЛАРУСИ

Я. К. КУЛИКОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Показана высокая эффективность оптимизации дерново-подзолистой песчаной почвы путем разового внесения высоких доз суглинка и торфонавозного компоста. Оптимизация песчаной почвы достигается за счет значительного повышения содержания физической глины и гумуса и совершенствования его качественного состава. На этой основе улучшаются агрохимические свойства и водный режим почвы, а также возрастает ее биологическая активность. Оптимизированная почва обеспечивает формирование высоких и стабильных урожаев сельскохозяйственных культур независимо от погодных условий.

Ключевые слова: торфование; землевание; песчаная почва; торфонавозный компост; суглинок; водоудерживающая способность почвы; физическая глина; гумус; пористость; микробиологическое разнообразие; биологическая активность.

Образец цитирования:

Куликов Я. К. Агроэкологические особенности земледелия на дерново-подзолистых песчаных почвах Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 71–76.

For citation:

Kulikov Ya. K. Agroecological specificities agriculture of sandy soddy-podzolic soils Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 71–76 (in Russ.).

Автор:

Ярослав Константинович Куликов – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.

Author:

Yaroslav Kulikov, doctor of science (biology), docent; professor at the department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.
ecodept@tut.by

AGROECOLOGICAL SPECIFICITIES AGRICULTURE OF SANDY SODDY-PODZOLIC SOILS BELARUS

Ya. K. KULIKOV^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

A high efficiency of the single application of peat-manure compost and loam for optimizing the properties of sandy soddy-podzolic soil was shown. The scolded improvement of sandy soil is reached by significant increase of the content of the physical clay and humus, and its qualitative composition improvement as well. Thereupon the agrochemical characteristics and water regime of soil are improved, as well as the biological activity increased. Optimized soil provided for the high and stable yield of agricultural crops regardless of weather impacts.

Key words: peat fertilization; earthing; sandy soil; peat-manure compost; loam; water-holding capacity; clay; humus; porosity; microbiological diversity; biological activity.

Введение

Окультуривание почв требует улучшения их основных свойств – повышения содержания гумуса и оптимизации гранулометрического состава, которые медленно изменяются во времени. Одним из перспективных направлений коренного улучшения низкоплодородных почв является повышение их качества на основе торфования и землевания. Это особенно актуально для дерново-подзолистых песчаных почв, занимающих более 20 % площади пахотных земель Беларуси. Почвы такого типа характеризуются низким плодородием и в процессе сельскохозяйственного использования быстро истощаются. Использование нетрадиционных мелиоративных мероприятий, в частности землевания и торфования, резко меняет направленность почвообразовательных процессов, стабилизирует состав и свойства улучшаемых почв и способствует их ускоренному окультуриванию. Однако теоретические основы таких структурных мелиораций разработаны недостаточно вследствие слабой изученности механизмов образования органоминеральных комплексов, обеспечивающих закрепление органических веществ в почве [1; 2].

Повышение продуктивности сельскохозяйственных культур на низкоплодородных песчаных почвах невозможно без разработки новых приемов и методов их использования, основанных на максимальной интродукции биологических факторов, в частности почвенной микробиоты. Поэтому выбор и уточнение адекватных, объективных и достоверных целевых индикаторов биологического состояния земель сельскохозяйственного назначения являются актуальными и необходимыми как для определения качества почв, так и при разработке мер по воспроизводству почвенного плодородия в каждом конкретном регионе. Это дает возможность достигнуть высокого уровня экономической эффективности использования песчаных почв, позволяющего снять вопрос о целесообразности вывода их из сельскохозяйственного оборота и тем самым повысить уровень продовольственной безопасности страны [3; 4].

Отсутствие комплексного подхода к освоению и сельскохозяйственному использованию дерново-подзолистых песчаных почв не позволяет коренным образом улучшать их свойства и режимы, повышать и стабилизировать плодородие. В связи с этим целью наших исследований стала разработка научно-методических основ оптимизации дерново-подзолистой песчаной почвы путем ее торфования и землевания. Сущность оптимизации этой почвы заключается в том, чтобы создать искусственный пахотный горизонт со свойствами, которые характерны для дерновой связносупесчаной почвы: мощность – от 25 до 30 см, содержание физической глины – от 15 до 18 %, органического вещества – от 6 до 7 %, в том числе 3,0–3,5 % гумуса. На этой основе улучшаются все агрохимические, водно-физические и биологические свойства почвы.

Материал и методика исследования

Полевые опыты проводились на базе хозяйства «ПМК-16-Агро» Борисовского района Минской области на дерново-подзолистой связнопесчаной почве.

Для анализа отбирали почвенные образцы, в которых определяли pH в солевой вытяжке, подвижный фосфор по Кирсанову, обменный калий по Масловой, сумму поглощенных оснований по методу Каппена – Гильковица, гумус по Тюрину, физическую глину по Качинскому [5].

Схема полевого опыта включает 5 вариантов, где на опытные делянки площадью 50 м² в четырехкратной повторности вносился суглинок из расчета 100, 200, 300 и 400 т/га, а также торфонавозный компост в дозе 200 т/га с соотношением навоза к торфу 1 : 1.

Вносимый легкий суглинок характеризовался следующими агрохимическими показателями: pH – 6,1; сумма поглощенных оснований – 4,3 мг-экв/100 г почвы; подвижный фосфор – 22,9 мг/100 г почвы; обменный калий – 33 мг/100 г почвы; содержание меди – 1 мг/кг; цинка – 4,6 мг/кг; бора – 0,44 мг/кг. Содержание физической глины составляло 26 %, гумуса – 1,8 %.

Для приготовления торфонавозного компоста нами использовался низинный торф с зольностью 30 %, который характеризовался следующими показателями: pH – 6,4; сумма поглощенных оснований – 19,6 мг-экв/100 г почвы; подвижный фосфор – 99,1 мг/100 г почвы; обменный калий – 120 мг/100 г почвы; содержание меди – 3,6 мг/кг; цинка – 14,4 мг/кг; бора – 2,7 мг/кг.

В торфонавозном компосте 70 % влажности содержалось органического вещества 220 кг/т; $N_{\text{общ}}$ – 6; P_2O_5 – 2; K_2O – 5; CaO – 4,5; MgO – 1 кг/т.

В первый год оптимизации песчаной почвы возделывалась пропашная культура (картофель), что позволило уже в течение этого года создать равномерное перемешивание минеральных и органических частиц пахотного горизонта. Во второй год оптимизации выращивался ячмень. При возделывании зерновой культуры практически создается равномерный органоминеральный пахотный горизонт. Последствие оптимизации на третий – пятый год после внесения торфонавозного компоста и суглинка изучали на многолетних бобово-злаковых травах (клевер луговой *Trifolium pretense* L., тимopheевка луговая *Phleum pretense* L., ежа сборная *Dactylis glomerata* L.). В качестве фона вносили минеральные удобрения из расчета $N_{20}P_{40}K_{80}$ (картофель), $P_{40}K_{80}$ (ячмень) и $N_{40}P_{80}K_{120}$ (многолетние травы) в виде аммиачной селитры, простого суперфосфата и хлористого калия.

Обработку почвы, сроки посадки и уход за культурой в период вегетации осуществляли в соответствии с агротехническими требованиями, рекомендуемыми для центральной части Беларуси.

Урожай учитывали поделочно с использованием общепринятой методики. Во время уборки урожая проводили отбор образцов клубней, зерна и сена с пяти вариантов в четырехкратной повторности, в которых определяли общий азот методом Кьельдаля, содержание протеина – путем умножения общего азота на коэффициент 5,7, микроэлементы и тяжелые металлы – на атомно-абсорбционном спектрофотометре по методу ЦИНАО. Статистическая обработка урожайных данных выполнена по Доспехову [6].

Активность целлюлозоразрушающих микроорганизмов дерново-подзолистой песчаной почвы изучалась с помощью метода аппликаций по методике Д. Г. Звягинцева [7]. В почву на глубину 50 см в вертикальном положении закладывались стеклянные пластинки размером 5 × 50 см, обернутые льняной тканью, предварительно взвешенной.

Опыт проводился в девятикратной повторности. Через определенное время (экспозиция – от 30 до 80 дней) пластинки выкапывали, с них осторожно смывались частички почвы, ткань просушивали и повторно взвешивали. По разности веса ткани до экспозиции и после нее определялась интенсивность жизнедеятельности целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Учет численности микроорганизмов, определение дыхания почвы и активности ее гидролитических ферментов выполняли по общепринятой методике [7].

Результаты исследований и их обсуждение

В процессе оптимизации дерново-подзолистой песчаной почвы путем торфования и землевания мощность гумусового горизонта возрастала с 16 до 26 см, содержание физической глины повышалось с 9 до 16 %, а гумуса – с 1,4 до 3,0 %. Содержание ила в пахотном горизонте увеличивалось с 6 до 12 %. При этом существенным образом изменялась структура илистого материала. Так, если в исходной связнопесчаной почве основная масса ила была агрегирована полутораоксидами, то в оптимизированной почве резко снижалась их доля как агрегирующего агента при четко выраженной тенденции роста значимости гумусоорганических веществ и тонкодисперсных почвенных минералов.

Результаты рентгендифрактометрических анализов показали, что в оптимизированной песчаной почве в значительных количествах накапливались минералы с высоким некомпенсированным зарядом в набухающих пакетах (смектиты, вермикулиты), а также минералы с высокой степенью структурной неупорядоченности (слюды, гидрослюды), которые, взаимодействуя с органическим веществом, образовывали водопрочные глиногумусовые микроагрегаты.

Влажность пахотного горизонта песчаной почвы под действием оптимизации существенно возрастала. И хотя абсолютная величина влажности в течение вегетационного периода изменялась в результате неравномерного выпадения атмосферных осадков, колебания влажности почвы на оптимизированных участках приобретали более выравненный характер, что улучшало экологические условия для роста и развития сельскохозяйственных культур. Данная закономерность прослеживалась во все годы исследований почвы под различными сельскохозяйственными культурами. Создание почвенного профиля с добавлением торфа и суглинка позволяло более рационально использовать влагу и быстрее восстанавливать оптимальный водный режим при экстремальных погодных условиях.

Содержание гумуса в пахотном горизонте песчаной почвы под действием оптимизации способом торфования и землевания возрастало с 1,4 до 3,0 %. И в последующие годы оно продолжало оставаться на высоком уровне. Изучение фракционно-группового состава гумуса показало, что оптимизация оказывает на его качественный состав положительное влияние, которое проявилось в возрастании удельного веса гуминовых кислот и уменьшении доли фульвокислот, что сопровождалось увеличением отношения углерода гуминовых кислот к углероду фульвокислот. Это свидетельствует об активизации темпов гумификации органического вещества под действием оптимизации песчаной почвы. Следует отметить, что содержание гуминовых кислот возрастало главным образом за счет первой и третьей фракций, т. е. фракций, связанных с полуторфными оксидами и глинистыми минералами. Это значит, что в результате оптимизации песчаной почвы органическое вещество превращается в менее подвижные формы. Оно становится более устойчивым к разрушениям и вымыванию и, следовательно, более способным к закреплению и накоплению в верхних слоях почвы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в пахотном горизонте песчаной почвы под действием оптимизации усиливается дерновый процесс почвообразования.

Расчетные данные показали, что в первый год оптимизации песчаной почвы при возделывании картофеля в почве складывается положительный баланс гумуса, который значительно возрастает с увеличением доз внесенного суглинка. Это объясняется тем, что накопление гумуса в почве за счет гумификации значительно превосходит его потери, связанные с минерализацией. На второй год оптимизации при возделывании ячменя на всех вариантах опыта формировался отрицательный баланс гумуса. Это обусловлено тем, что накопление гумуса в почве за счет гумификации не компенсировало его потери, связанные с минерализацией, т. е. минерализация гумуса происходила активнее, чем гумификация. В последующие годы при возделывании многолетних трав накопление гумуса за счет гумификации происходило более интенсивно, чем его минерализация, что и обеспечило формирование положительного баланса гумуса в почве. За три года в оптимизированной почве сформировался положительный баланс гумуса. Например, на варианте с применением суглинка в дозе 400 т/га накопление гумуса в почве за счет гумификации примерно в четыре раза превосходило его потери, связанные с минерализацией.

Оптимизация песчаной почвы оказала положительное влияние на содержание подвижных форм калия и фосфора. И хотя в последующие годы содержание этих питательных элементов несколько снижалось, оно не выходило за пределы оптимальных значений этих величин. И в целом следует отметить, что содержание данных питательных элементов определялось главным образом величиной доз применяемых фосфорных и калийных удобрений.

Окультуривание песчаной почвы способом торфования и землевания оказало положительное влияние на ее биологическую активность. Это проявилось в росте численности гетеротрофных бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов. Увеличение численности аммонифицирующих и нитрифицирующих бактерий обеспечивало активную минерализацию органического вещества, внесенного с торфом и суглинком в песчаную почву, освобождение азота и превращение его в аммонийные и нитратные соединения.

Оптимизация песчаной почвы оказала положительное влияние на развитие целлюлозоразрушающих микроорганизмов, активность которых возрастала с увеличением доз внесенного суглинка. Выявленная закономерность в изменении активности целлюлозоразрушающих микроорганизмов наблюдалась во все годы исследований. Необходимо отметить, что наиболее высокая активность целлюлозоразрушающих микроорганизмов регистрировалась под картофелем, наиболее низкая – под многолетними травами, а ячмень по этой характеристике занимал промежуточное положение (таблица).

**Интенсивность разложения клетчатки в оптимизированной
дерново-подзолистой песчаной почве в зависимости от глубины профиля**
**Intensity of cellulose decomposition in optimized soddy-podzolic sandy soil,
depending on the depth of the profile**

Вариант опыта	Вес ткани до экспозиции, г	Вес ткани после экспозиции, г	Степень разложения ткани	
			г	%
Картофель, 2006 г.				
На глубине 0–30 см				
1	16,97	9,49	7,48	44,1
2	17,03	8,29	8,74	51,3
3	16,35	7,46	8,89	54,4

Окончание таблицы
Ending table

Вариант опыта	Вес ткани до экспозиции, г	Вес ткани после экспозиции, г	Степень разложения ткани	
			г	%
4	16,21	6,87	9,34	57,6
5	15,93	6,23	9,70	60,9
На глубине 30–50 см				
1	12,42	10,41	2,01	16,2
2	12,83	9,91	2,92	22,8
3	12,77	9,45	3,32	26,0
4	11,84	8,49	3,35	28,3
5	12,16	8,46	3,70	30,4
Ячмень, 2007 г.				
На глубине 0–30 см				
1	17,13	10,14	6,99	40,8
2	16,89	9,17	7,72	45,7
3	16,21	8,43	7,78	48,0
4	15,48	7,65	7,83	50,6
5	15,67	7,13	8,54	54,5
На глубине 30–50 см				
1	12,46	10,72	1,74	14,0
2	12,07	9,63	2,44	20,2
3	11,56	8,85	2,71	23,4
4	11,73	8,68	3,05	26,0
5	12,11	8,65	3,46	28,6
Многолетние травы, 2008 г.				
На глубине 0–30 см				
1	16,8	12,4	4,4	26,2
2	15,9	11,3	4,6	28,9
3	16,6	11,1	5,5	33,1
4	17,3	11,0	6,3	36,4
5	17,8	11,1	6,7	37,6
На глубине 30–50 см				
1	13,5	11,9	1,6	11,8
2	13,9	11,6	2,3	16,5
3	11,4	9,0	2,4	21,5
4	12,8	9,6	3,2	25,0
5	13,1	9,6	3,5	26,7

Примечание. Схема полевого опыта включала пять вариантов: 1) контроль (фон); 2) фон + 200 т/га компоста + 100 т/га суглинка; 3) фон + 200 т/га компоста + 200 т/га суглинка; 4) фон + 200 т/га компоста + 300 т/га суглинка; 5) фон + 200 т/га компоста + 400 т/га суглинка.

Разрушение целлюлозы, как показал опыт, особенно активно шло в верхнем, пахотном, горизонте. В более глубоких слоях почвы активность целлюлозоразрушения заметно уменьшалась. Снижение активности целлюлозоразрушающих микроорганизмов с глубины более 30 см объясняется уменьшением запаса органических соединений и ухудшением воздушного режима почвы.

Заключение

Оптимизация дерново-подзолистой песчаной почвы путем внесения торфонавозного компоста и суглинка в количествах, способствующих повышению содержания гумуса до 3 % и физической глины до 16 %, является эффективным агротехническим приемом, обеспечивающим накопление абсолютно сухой биомассы растений, увеличение их фотосинтетического потенциала, ускоряющим рост и развитие культур. Это позволяет получать на оптимизированной почве урожай картофеля от 200 до 230 ц/га, ячменя – от 30 до 35 ц/га и сена многолетних трав за два укоса – от 100 до 110 ц/га.

Окультуривание дерново-подзолистой песчаной почвы на основе торфования и землевания – высокоэффективный способ повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Он позволяет получать дополнительный чистый доход уже в первый год окультуривания почвы на сумму 900–1000 долл. США/га, или 1,3–1,5 долл. дохода на каждый доллар затрат.

Таким образом, полученные данные открывают хорошую перспективу восстановления плодородия песчаных почв естественным путем, т. е. за счет механизмов, характерных для природных экосистем.

Библиографические ссылки

1. Андронов Е. Е., Иванова Е. А., Перишина Е. В. Анализ показателей почвенного микробиома в процессах, связанных с почвообразованием, трансформацией органического вещества и тонкой регуляцией вегетационных процессов // Бюл. Почв. ин-та им. В. В. Докучаева. 2015. Вып. 80. С. 83–93.
2. Добровольский Г. В. Деградация и охрана почв. М., 2002.
3. Соколов М. С., Дородных Ю. Л., Марченко А. И. Здоровая почва как необходимое условие жизни человека // Почвоведение. 2010. № 7. С. 858–866.
4. Маринеску К. М. Экология микробного ценоза эродированных черноземов и восстановление его функций // Идентификация, ресурсосбережение и охрана почв в адаптивно-ландшафтных системах земледелия. Курск, 2008. С. 550–554.
5. Ягодин Б. А., Дерюгин И. П., Жуков Ю. П. Практикум по агрохимии. М., 1987.
6. Доспехов Б. А. Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных. М., 1972.
7. Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М., 1991.

References

1. Andronov E. E., Ivanova E. A., Pershina E. V. Analysis of soil microbiome in processes associated with soil formation, transformation of organic matter and fine regulation of vegetation processes. *Bull. of the Soil Inst. named after V. V. Dokuchaeva*. 2015. Vol. 80. P. 83–93 (in Russ.).
2. Dobrovol'skii G. V. Degradatsiya i okhrana pochv [Degradation and protection of soils]. Moscow, 2002 (in Russ.).
3. Sokolov M. S., Dorodnykh Yu. L., Marchenko A. I. Zdorovaya pochva kak neobkhodimoe uslovie zhizni cheloveka [Healthy soil as a necessary condition of human life]. *Pochvovedenie*. 2010. No. 7. P. 858–866 (in Russ.).
4. Marinesku K. M. Ekologiya mikrobnogo tsenoza erodirovannykh chernozemov i vosstanovlenie ego funktsii [Ecology of the microbial cenosis of eroded chernozems and restoration of its functions]. *Identif., resourc conservation and soil protection in adaptive-landscape syst. of agriculture*. Kursk, 2008. P. 550–554 (in Russ.).
5. Yagodin B. A., Deryugin I. P., Zhukov Yu. P. Praktikum po agrokhimii [Workshop on agrochemistry]. Moscow, 1987 (in Russ.).
6. Dospiehov B. A. Planirovaniya polevogo opita i statisticheskaya obrabotka ego dannix [Planning of field experience and statistical processing of its data]. Moscow, 1972 (in Russ.).
7. Zvyagintsev D. G. Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhimii [Methods of soil microbiology and biochemistry]. Moscow, 1991 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 23.11.2016.

Received by editorial board 23.11.2016.

СТРУКТУРА И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ РАЗВИТИЕ ФИТОПЛАНКТОНА ВОДОТОКОВ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА «ПРИПЯТСКИЙ»

Т. М. МИХЕЕВА¹⁾, А. А. СВИРИД²⁾, Е. В. ЛУКЬЯНОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка,
ул. Советская, 18, 220050, г. Минск, Республика Беларусь

Приведены данные о таксономической структуре, летнем уровне биомассы фитопланктона, степени колонизации фитопланктонного сообщества и средней массе планктонной единицы р. Припяти и ее притоков, канализированных ручьев и каналов, расположенных в пределах Национального парка «Припятский» (Беларусь). В реках выявлены 218, в канализированных ручьях и каналах – 102 вида с наибольшим представительством зеленых (хлорококковых) водорослей. Диапазон различий общей биомассы фитопланктона в реках составлял 0,05–9,01 мг/л, еще большим он был в канализированных ручьях и каналах – от 0,1 до 48,8 мг/л. Наибольшая степень колонизации и ее вариабельность были присущи организмам р. Припяти: минимальное число клеток на организм составляло 6,8, максимальное – 93,0. Организмы, имевшие минимальную массу ($0,042 \cdot 10^{-6}$ мг), обитали в Крушинном канале. Отмечена высокая степень специфичности изученных водотоков.

Ключевые слова: Беларусь; Национальный парк «Припятский»; водотоки (реки, ручьи, каналы); таксономическая структура фитопланктона; биомасса; степень колонизации.

STRUCTURE AND QUANTITATIVE PHYTOPLANKTON DEVELOPMENT OF WATERCOURSES OF THE NATIONAL PARK «PRIPYATSKY»

T. M. MIKHEEVA^a, A. A. SVIRID^b, E. V. LUKYANOVA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bBelarusian State Pedagogic University named after Maxim Tank,
Sovetskaya avenue, 18, 220050, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: mikheyeva@tut.by

The data on taxonomic structure, on the level of summer phytoplankton biomass and the degree of phytoplankton community colonization and average mass of plankton unity in Pripyat' River and its tributaries (right-bank – Stviga,

Образец цитирования:

Михеева Т. М., Свирид А. А., Лукьянова Е. В. Структура и количественное развитие фитопланктона водотоков Национального парка «Припятский» // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 77–85.

For citation:

Mikheeva T. M., Svirid A. A., Lukyanova E. V. Structure and quantitative phytoplankton development of watercourses of the National Park «Pripyatsky». *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 77–85 (in Russ.).

Авторы:

Тамара Михайловна Михеева – доктор биологических наук, доцент; главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета.

Анна Анатольевна Свирид – кандидат биологических наук; доцент кафедры общей биологии и ботаники факультета естествознания.

Елена Васильевна Лукьянова – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета.

Authors:

Tamara Mikheeva, doctor of science (biology), docent; chief researcher at the research laboratory of aquatic ecology, faculty of biology.

mikheyeva@tut.by

Anna Svirid, PhD (biology); associate professor at the department of general biology and botany, faculty of natural science. sviridanna.61@mail.ru

Elena Lukyanova, researcher at the research laboratory of aquatic ecology, faculty of biology.

elena_lukyanova@tut.by

Svinovod, Snyadinka, Belyanka, Ubort' and left-bank – Skripitsa, Naut', Utvokha), in streams and channelized streams (right-bank – Krushinny, Bytchok, Khlupinsky – relief channel drainage system and left-bank – Najdo-Belevsky, channel-gatherers pond system beside pumping station near r. Naut', Lutchinez stream and others) located within National Park «Pripyatsky» (Belarus) are represented. 218 phytoplankton species were revealed in rivers and 102 in streams and channelized streams, the mostly diverse were green algae. Differences' range of total phytoplankton biomass in rivers was 0.05–9.01 mg/l. In streams and channelized streams it was more wider – from 0.1 to 48.8 mg/l. The more high degree of colonization and its variability was inherent to phytoplankton organisms of r. Pripyat': minimal cell number per organism was equal to 6.8, maximal – to 93.0. The organisms with the lowest weight ($0,042 \cdot 10^{-6}$ mg) inhabited Krushinny channel. The high specificity of investigated watercourses was inherent to all of them.

Key words: Belarus; National Park «Pripyatsky»; watercourses (rivers, streams, channels); phytoplankton taxonomic structure; biomass; degree of colonization.

Изученность и постановка проблемы

Изученность альгофлоры водоемов и водотоков Национального парка (НП) «Припятский» до начала наших исследований в 2009 г. и опубликованные работы исследователей достаточно полно представлены в [1; 2]. Анализ этих работ показал, что более чем из 500 разнотипных водных объектов на территории парка изучена ничтожно малая их доля. В данной работе представлены результаты изучения некоторых водотоков НП «Припятский».

Объекты и методика исследований

НП «Припятский» расположен в самом центре Белорусского Полесья – в междуречье рек Припяти, Ствиги и Уборти, в 250 км южнее г. Минска и 350 км восточнее г. Бреста и западной границы Беларуси. Территория парка в настоящее время вытянута с севера на юг на 27 км, с запада на восток – на 64 км и занимает площадь 83,7 тыс. га (1,4 % площади Белорусского Полесья).

Были отобраны образцы планктонных проб в следующих водотоках: в р. Припяти и ее притоках (правобережные реки – Ствига, Свиновод, Снядинка, Белянка, Уборть и левобережные реки – Скрипица, Науть, Утвуха), канализированных ручьях и каналах (правобережные каналы – Крушинный и Бычок, канал-собиратель польдерной системы Хлупинский – сбросный канал осушительной системы, левобережные каналы – Найдо-Белевский и канал-собиратель системы прудов у насосной станции возле р. Наути; ручьи – у родника № 3, Лучинец, у дороги Лельчицы – Туров и в заболоченном лесу возле канала Бычок), расположенных в пределах НП.

Припять – самая большая по величине и водности река НП «Припятский». Берет начало за пределами НП, протекает по северной его части с запада на восток и омывает северо-восточную границу. Правобережные притоки р. Припяти ограничены реками Ствигой (с запада) и Убортью (на востоке). Река Ствига протекает на расстоянии 0,1–3,0 км вдоль северо-западной границы НП на протяжении 48,5 км. Далее, с юга на север правобережную часть парка пересекают канал Бычок, ручей Крушинный (3,5 км), малые реки – Свиновод (22,5 км), Снядинка (4,5 км), Белянка (6,7 км), ручей Лучинец (1,7 км). Большинство из них частично или полностью канализированы. Река Уборть является восточной границей парка на протяжении 11,5 км.

Вдоль северо-западной границы НП протекают канализированные реки Науть (6,3 км) и Скрипица (4,5 км), вдоль восточной границы проложен Найдо-Белевский канал. В пределах лесного массива сохранилась сезонно-проточная р. Утвуха (8,1 км). Питание этих рек преимущественно снеговое со значимой ролью подземных вод.

Исследованные каналы в числе других 100 каналов различного порядка входят в мелиоративную сеть парка. В настоящее время большая часть сети не функционирует, но определенный водосброс с территории парка она осуществляет.

Исследования проводились в летнее время 2009, 2010 и 2015 гг. Сбор планктонных проб осуществляли стандартным сетным и осадочным методами [3] с некоторыми модификациями [4]. Сетные пробы (планктонной сетью из мельничного сита № 76) использовали впоследствии для учета видов, не попавших в счетные камеры при количественной обработке проб, в целях более полного выявления видового состава. Для количественного учета применяли полученные осадочным методом пробы фитопланктона, фиксированные по Утермелю с добавлением формалина. Мелких представителей подсчитывали в камере Фукса – Розенталя. Подсчет крупных организмов (*Ceratium*, *Asterionella*, *Melosira*, *Aulacoseira*, *Tabellaria*, *Fragilaria*, *Microcystis*, *Coelosphaerium*, *Anabaena* и др.) проводили в бороздках камеры Фукса – Розенталя на малом увеличении, а наиболее крупных из них, таких как *Gloeotrichia echinulata*, *Volvox*, считали в камере Богорова.

Оценку биомассы организмов проводили общепринятым счетно-объемным методом, или методом истинных объемов [4], приравнивая клетку или организм к той или иной геометрической фигуре.

Размеры клеток и организмов измеряли под микроскопом с помощью окуляр-микрометра. Удельный вес их принимали равным единице. Умножая массу каждого вида на его численность в пробе и суммируя биомассу отдельных представителей, получали общую биомассу фитопланктона.

Результаты исследований и их обсуждение

Всего в фитопланктоне рек обнаружено 218 таксонов рангом ниже рода, относящихся к 217 видам (табл. 1). Характерным для выявленных видов фитопланктона изученных рек можно считать наличие у них малого или полного отсутствия внутривидовых таксонов. Из них наибольшее таксономическое богатство отмечено в р. Припяти – 120 видов (121 таксон). На втором месте оказалась р. Скрипица – 64 вида, на третьем – р. Науть – 50 видов. Минимальное число представителей зафиксировано за время исследования в р. Утвухе – 5 видов, небольшое число отмечено и в р. Уборти – 11 видов. В остальных реках видовое богатство находилось в пределах 23–30 представителей. Наиболее космополитным видом оказался *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg (эвгленовые), отмеченный почти во всех реках, за исключением рек Свиновод и Утвуха. В шести реках из девяти встречены представители криптонад *Cryptomonas marssonii* Skuja, хлорококковых – *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová и *M. minutum* (Nägeli) Komárková-Legnerová, диатомовых – *Pinnularia* sp. Большинство же видов – 130 из 217 – обнаружены только в какой-нибудь одной реке. В реках обнаружены 22 новых для республики вида, не отмечавшихся нами ранее [5; 6].

Таблица 1

Количество таксонов в разных отделах водорослей, обнаруженных в обследованных водотоках НП «Припятский» (в скобках указаны новые для Беларуси виды)

Table 1

The number of taxons in different algae divisions detected in investigated watercourses of NP «Pripyatsky» (the new for Belarus species are indicated in brackets)

Систематические группы	Реки	Канализированные ручьи и каналы
Цианобактерии (синезеленые)	27 (1)*	6
Криптофитовые	9 (1)	6 (1)
Динофитовые	4	1
Золотистые	11 (3)	4 (2)
Диатомовые	54 (2)	20 (2)
Желтозеленые	5	2
Эвгленовые	17 (3)	17 (1)
Зеленые:	89 (11)	45 (6)
вольвоксовые	4**	3**
хлорококковые (протококковые)	77 (10)**	37 (6)**
улотриксковые	3**	1**
конъюгаты	5 (1)**	4**
Рафидофитовые	2 (1)	1 (1)
Неопределенный вид	0	0
Всего	218 (22)	102 (13)

*В скобках указано число новых для Беларуси видов. **Входит в число зеленых.

*The new for Belarus species are indicated in brackets. **Is included in the number of green algae.

По таксономическому богатству фитопланктон канализированных ручьев и каналов в сумме (см. табл. 1) оказался более чем в два раза беднее, чем в реках, – 102 таксона против 218 в реках. В фитопланктоне трех исследованных ручьев определены в целом лишь 14 представителей: в ручье Бычок – 6, в двух других – по 4. Из них только *Cyclotella meneghiniana* Kützinger отмечена в двух ручьях – Бычок и Лучинец. Остальные немногочисленные виды были фактически специфичны для каждого ручья.

Богатство видов (таксонов) в большинстве отделов, обнаруженных в фитопланктоне каналов, оказалось в несколько раз меньшим, чем в реках: динофитовых – в 4,0, а цианопрокариот – в 4,5 раза. Исключением являются только эвгленовые водоросли – их представительство оказалось одинаковым (по 17 видов) и в реках, и в каналах при полном отсутствии в ручьях.

Наибольшее видовое богатство было присуще собирательному каналу системы прудов у р. Наути, которое составляли 58 представителей, из них, как и в реках, самыми разнообразными были зеленые (хлорококковые) водоросли – 33 вида. Второе место по количеству, как и в реках, в этом канале занимали диатомовые. Отличием от рек являлось то, что эвгленовые (12 видов) и в этом канале находились на третьем месте, а в реках третье место занимали цианопрокариоты. В данном канале выявлены 9 новых для Беларуси видов, не указывавшихся в [1]: *Cryptomonas pyrenoidifera* Geitler, *Verrucodesmus verrucosus* (Y. V. Roll) E. Hegewald, *Diclostera acutatus* C.-C. Jao, Y. S. Wei & H. C. Hu, *Tetrademus lunatus* Korshikov, *Actinastrum hantzschii* var. *subtile* J. Wołoszynska, *Dactylosphaerium ellipsoideum* Behre, *Characium* sp., *Vacuolaria virescens* Cienkowski, *Phacus globosus* Pochmann.

В фитопланктоне Найд-Белевского канала зарегистрированы 42 представителя с преимуществом диатомовых (16) и количественным распределением между другими отделами в следующем порядке: зеленые – 11, эвгленовые и криптофитовые – по 5 и по 1 представителю из цианобактерий, динофитовых, золотистых, желтозеленых и рафидофитовых. Выявлены 4 новых вида: *Cryptomonas pyrenoidifera*, *Ulnaria delicatissima* (W. Smith) Aboal et Silva, *Melosira lineata* (Dillwyn) C. Agardh, *Verrucodesmus verrucosus*.

В каналах Крушинном и собирательном Хлупинском выявлено очень малое количество видов при полном отсутствии цианопрокариот, динофитовых, желтозеленых и рафидофитовых: 10 – в Крушинном и 9 – в Хлупинском. В Крушинном канале – 4 представителя зеленых, 3 – эвгленовых и по 1 – из других отделов, в Хлупинском – 4 вида эвгленовых, 3 – зеленых, по 1 представителю из диатомовых и криптоноад. Два вида – новые для республики: *Chromulina vestita* Schiller, *Ochromonas mutabilis* Klebs.

Подробные сведения о доминирующих комплексах видов в изученных водотоках приведены в [2], где указано, что составы доминирующих комплексов по численности организмов и биомассе сильно различаются не только в разные годы, но и в разные сроки исследования одного и того же года и даже в одном и том же водотоке.

Количественное развитие фитопланктона оценивают по величинам его численности и биомассы. Общепринятое выражение численности – общая численность клеток ($N_{\text{общ}}$, кл./л), куда входит число одноклеточных водорослей, число клеток в нитях и колониях, или организмов. Подсчет организмов осуществлять проще, так как наряду с одноклеточными организмами, легко поддающимися учету, за единицу учета – организм – принимают и многоклеточные колониальные, ценобиальные и нитевидные водоросли. Подсчет клеток при микроскопической обработке намного сложнее, поскольку считать их количество необходимо и в колониях (например, цианобактерии, зеленые, золотистые водоросли).

Наряду с определением общего числа клеток нами проведен также учет числа организмов (планктонных единиц), при этом колонии и нити считались отдельными организмами ($N_{\text{общ}}$, орг./л). Соотношение двух параметров численности отражает степень агрегированности, или «колониальности» (количество клеток, приходящихся на организм), фитопланктонного сообщества в целом [7], которая определяется сезонной и межгодовой сукцессией отдельных групп водорослей. Соотношение численности клеток и организмов с биомассой (B/N) характеризует среднюю массу клетки и организма соответственно [8].

В табл. 2 и 3 представлены полученные величины для трех показателей количественного развития всего фитопланктона ($N_{\text{кл}}$, $N_{\text{орг}}$ и $B_{\text{ф}}$) в реках (табл. 2), каналах и ручьях (табл. 3).

Таблица 2

Численность и биомасса фитопланктона рек

Table 2

The abundance and biomass of phytoplankton in rivers

Дата исследования	Численность организмов, млн/л	Численность клеток, млн/л	Биомасса, мг/л
р. Припять			
19.08.2009	3,30	22,33	2,66
19.08.2010	6,64	616,73	8,48
22.07.2015	22,59	243,29	8,74
Правобережные притоки			
р. Ствига			
21.08.2009	5,01	5,01	2,03
18.08.2010	0,59	30,68	1,21

Окончание табл. 2
Ending table 2

Дата исследования	Численность организмов, млн/л	Численность клеток, млн/л	Биомасса, мг/л
р. Свиновод			
17.08.2009	0,09	0,09	0,05
18.08.2010	0,28	0,71	0,46
р. Снядинка			
21.08.2009	0,14	0,14	0,09
19.08.2010	2,68	2,68	2,04
р. Беянка			
21.08.2009	24,68	24,70	3,13
19.08.2010	2,39	7,48	4,54
р. Уборть			
21.08.2009	2,00	2,07	0,30
Левобережные притоки			
р. Скрипица			
17.08.2010	8,19	91,78	9,01
р. Науть			
17.08.2010	5,24	82,07	5,58
р. Утвоха			
21.07.2015	0,14	0,14	1,24

Таблица 3

**Численность и биомасса фитопланктона
канализированных ручьев и каналов**

Table 3

**The abundance and biomass of phytoplankton
in streams and channelized streams**

Дата исследования	Численность организмов, млн/л	Численность клеток, млн/л	Биомасса, мг/л
Крушинный канал – магистральный			
20.08.2009	0,16	0,16	0,06
18.08.2010	1,41	1,41	1,00
Собирательный канал осушительной польдерной системы Хлупинский в квартале 43			
21.08.2009	2,03	2,03	0,14
19.08.2010	3,36	3,36	3,35
Найдо-Белевский канал			
17.08.2010	0,26	0,82	0,27
Собирательный канал системы прудов у р. Наути			
17.08.2010	7,00	19,74	11,36
Канал Бычок			
20.08.2009	0,00	0,00	0,00
18.08.2010	0,23	0,54	0,26
Ручей у родника № 3			
18.08.2010	0,84	0,84	0,24

Окончание табл. 3
Ending table 3

Дата исследования	Численность организмов, млн/л	Численность клеток, млн/л	Биомасса, мг/л
Ручей Лучинец			
18.08.2010	532,53	532,53	48,76
Ручей (канавы) в заболоченном лесу у дороги к царь-дубу возле канала Бычок			
18.08.2010	0,38	0,90	0,22

Наибольшие величины количественного развития фитопланктона по всем трем показателям, приведенным в табл. 3, отмечены в реках Припяти, Скрипице, Наути, Белянке, наиболее низкие – в реках Свиновод, Снядинке, Уборти, Утвое. Самые большие величины численности организмов зафиксированы в р. Белянке (24,7 млн/л) за счет хлорелловидных зеленых водорослей (98,8 %). Столько же они составили и по численности клеток, определив почти 55 % общей биомассы фитопланктона. На втором месте – р. Припять, в которой по организмам лидировали в 2009 г. зеленые (54 %) при общей численности организмов 3,3 млн/л, в 2015 г. – диатомовые (49,5 % общей численности, составляющей 22,6 млн/л), в 2010 г., когда общая численность организмов составляла 6,64 млн/л, цианобактерии, диатомовые и зеленые участвовали почти на паритетных началах (34,8; 33,1 и 24,6 %). В р. Скрипице зеленые и диатомовые, а в р. Наути цианобактерии и зеленые насчитывали около 45 % организмов от общей их численности (8,2 и 5,2 млн/л соответственно). Низкие величины численности организмов – около 0,1 млн/л – отмечены в реках Свиновод, Снядинке, Утвое.

По общей численности клеток, как и по общей численности организмов, более высокие показатели отмечены в реках Припяти, Скрипице, Наути, Белянке (расположены в порядке уменьшения численности), низкие – в реках Свиновод, Снядинке, Уборти, Утвое. Для первой группы рек общая численность клеток находилась в пределах 22,3–617,7 млн кл./л, для второй, как и для численности организмов, – на уровне 0,1 млн кл./л. Одинаковое количество численности организмов и клеток во второй группе рек свидетельствует о том, что в них развивались исключительно одноклеточные представители планктонных водорослей. Значимость отделов водорослей в определении общей численности клеток фитопланктона разных рек можно проследить по их относительному участию в общих величинах численности. В реках Припяти, Скрипице, Наути, Ствиге (в 2010 г.) цианобактерии составляли 73–98 % общей численности клеток. В реках Свиновод, Белянке, Уборти доминировали по численности клеток зеленые водоросли – от 28,8 до 98,7 %, в р. Снядинке – криптофитовые (около 80 % в 2009 г.) или диатомовые (свыше 98 % в 2010 г.).

Диапазон значений общей биомассы фитопланктона рек составлял от 0,05 мг/л (р. Свиновод) до 9,01 мг/л (р. Скрипица). Сходный уровень величин биомассы был присущ и р. Припяти – до 8,7 мг/л, для р. Наути зарегистрировано 6 мг/л фитопланктона. Невысокие биомассы (кроме р. Свиновод) отмечены еще в реках Уборти – 0,3, Снядинке – 0,09 (2009 г.), Утвое – 1,24 мг/л.

Среди канализированных ручьев и каналов чрезвычайно высокими величинами всех трех показателей развития – численности организмов (532,5 млн/л), численности клеток (такое же количество, поскольку в этом ручье имело место массовое развитие одноклеточного представителя зеленых (вольвоксовых) водорослей *Chloromonas infirma* (Gerloff) Silva), общей их биомассы (48,8 мг/л) – выделяется ручей Лучинец.

На фоне этого ручья различия в количестве организмов в других водотоках не очень высоки: минимальное (0,16 млн/л) – в Крушинном канале в 2009 г., максимальное (7,0 млн/л) – в собирательном канале системы прудов у р. Наути. Низкие величины общей численности организмов отмечены в Найд-Белевском канале (0,26 млн/л) и ручье Бычок (0,23 млн/л).

Такая же степень количественного развития фитопланктона прослеживается и по численности клеток с доминированием в Крушинном канале (33,3–98,7 %), в ручье у родника № 3 (78,0 %) – золотистых водорослей, в собирательном канале Хлупинском в квартале 43 – зеленых (76,2–100,0 %). Цианопрокариоты доминировали в каналах Найд-Белевском – 59 % – и собирательном системе прудов у р. Наути – 47,1 %, в канале Бычок и ручье в заболоченном лесу у дороги к царь-дубу возле канала Бычок – 76,4 и 60,5 % соответственно. В каналах (Крушинный, собирательный Хлупинский) и ручьях (у родников № 3 и Лучинец) цианобактерии не зафиксированы.

Наибольшими величинами общей биомассы фитопланктона, как указывалось выше, выделялся ручей Лучинец (48,8 мг/л) с абсолютным доминированием (99,8 %) зеленых (вольвоксовых). Биомасса

более чем в четыре раза меньшая (11,4 мг/л) отмечена в собирательном канале системы прудов у р. Наути с большим участием эвгленовых (31,4 %) и рафидофитовых (29,4 %) водорослей, долей криптононад, равной 16 %, и долей зеленых – 12,2 %. В остальных каналах и ручьях биомасса фитопланктона была сходной и составляла 0,2–0,3 мг/л с наибольшим относительным участием диатомовых (68 % – в Найдо-Белевском канале, 43,7 % – канале Бычок) и зеленых (от 41 до 100 % – в собирательном канале Хлупинском, канале Бычок и ручье Лучинец). В 2010 г. в собирательном канале Хлупинском наравне с зелеными 46,2 % биомассы определяли также эвгленовые, почти отсутствовавшие в 2009 г.

Как указано выше, о степени колониальности фитопланктонного сообщества хорошо говорит введенный нами показатель [9] $N_{\text{кл.}/\text{орг}}$ т. е. численность клеток, приходящаяся на один организм. Среди водотоков наибольшая степень колониальности была присуща организмам р. Припяти: максимальное значение в среднем – 93 кл./орг. в 2010 г. и минимальное – 6,8 кл./орг. в 2009 г. В р. Ствиге в 2010 г. организмы были 11–52-клеточными, а в 2009 и 2015 гг. вегетировали только одноклеточные особи. Развитие одноклеточных организмов в реках наблюдалось в 46,7 % случаев, в канализированных ручьях и каналах – в 54,5 % (табл. 4 и 5).

Таблица 4

Степень колониальности фитопланктонных сообществ в реках
и средняя масса (W) планктонной единицы

Table 4

The degree of phytoplankton community colonization in rivers
and average mass (W) of plankton unity

Дата исследования	$N_{\text{кл.}}/N_{\text{орг}}$	$W_{\text{орг}} \cdot 10^{-6}$ мг	$W_{\text{кл}} \cdot 10^{-6}$ мг	$N_{\text{орг}}/B$	$N_{\text{кл}}/B$
р. Припять					
19.08.2009	6,8	0,805	0,119	1,2	8,4
19.08.2010	92,9	1,277	0,014	0,8	72,7
22.07.2015	10,8	0,387	0,036	2,6	27,8
р. Свиновод					
17.08.2009	1,0	0,574	0,574	1,7	1,7
18.08.2010	2,5	1,624	0,643	0,6	1,6
р. Уборть					
21.08.2009	1,0	0,151	0,146	6,6	6,9
р. Беянка					
21.08.2009	1,0	0,127	0,127	7,9	7,9
19.08.2010	3,1	1,899	0,607	0,5	1,6
р. Снядинка					
21.08.2009	1,0	0,626	0,626	1,6	1,6
19.08.2010	1,0	0,761	0,761	1,3	1,3
р. Ствига					
21.08.2009	1,0	0,406	0,406	2,5	2,5
18.08.2010	52,4	2,075	0,040	0,5	25,3
р. Науть					
17.08.2010	15,7	1,064	0,068	0,9	14,7
р. Скрипица					
17.08.2010	11,2	1,101	0,098	0,9	10,2
р. Утвоха					
21.07.2015	1,0	9,137	9,137	0,1	0,1

Таблица 5

Степень колониальности фитопланктонных сообществ
канализированных каналов и ручьев и средняя масса планктонной единицы

Table 5

The degree of phytoplankton community colonization
in streams and channelized streams and average mass of plankton unity

Дата исследования	$N_{\text{кл}}/N_{\text{орг}}$	$W_{\text{орг}} \cdot 10^{-6}$ мг	$W_{\text{кл}} \cdot 10^{-6}$ мг	$N_{\text{орг}}/B$	$N_{\text{кл}}/B$
Крушинный канал					
20.08.2009	1,0	0,354	0,354	2,8	2,8
18.08.2010	1,0	0,708	0,708	1,4	1,4
Собираемый канал осушительной польдерной системы Хлупинский в квартале 43					
21.08.2009	1,0	0,070	0,070	14,3	14,3
19.08.2010	1,0	0,998	0,998	1,0	1,0
Собираемый канал системы прудов у р. Наути					
17.08.2010	2,8	1,623	0,575	0,6	1,7
Найдо-Белевский канал					
17.08.2010	3,2	1,054	0,328	0,9	3,0
Канал Бычок					
20.08.2009	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18.08.2010	2,3	1,122	0,479	0,9	2,1
Ручей у родника № 3					
18.08.2010	1,0	0,280	0,280	3,6	3,6
Ручей Лучинец					
18.08.2010	1,0	0,092	0,092	10,9	10,9
Ручей (канавы) в заболоченном лесу у дороги к царь-дубу возле канала Бычок					
18.08.2010	2,4	0,569	0,239	1,8	4,2

Параллельно с оценкой степени колониальности фитопланктонных сообществ изучавшихся водотоков НП «Припятский» определялась средняя масса планктонной единицы (организм и клетка) в каждом конкретном объекте. Естественно, средняя масса планктонной единицы (организм, $W_{\text{орг}}$ или клетка, $W_{\text{кл}}$) зависит от видового состава фитопланктонного сообщества. Наиболее «тяжелые» организмы (среди рек) оказались в р. Утвухе ($9,137 \cdot 10^{-6}$ мг). Организмы с минимальной массой обитали в ручье Лучинец ($0,092 \cdot 10^{-6}$ мг) и собираемом канале в квартале 43 в 2009 г. ($0,070 \cdot 10^{-6}$ мг). В последнем в 2010 г. средняя масса организма была намного выше ($0,998 \cdot 10^{-6}$ мг). Максимальные значения отношения $N_{\text{кл}}/B$ отмечены для фитопланктона р. Припяти, для которого они различались в этой реке от 8,4 до 72,7 млн/мг.

Ранее нами было показано достаточное постоянство отношения N/B общего фитопланктона для одного и того же водотока и водоема, не подверженных сильному антропогенному воздействию и эвтрофированию, с прямолинейной зависимостью между N и B и разбросом точек, укладывающимся в пределы трех сигм. При прогрессировании эвтрофирования линейная связь переходит в экспоненциальную или в более сложный тип зависимости, отражающий резкое нарастание численности (увеличение N мелкоклеточных организмов) фитопланктона при более замедленном росте его биомассы или даже относительном постоянстве. На этом основании нами было высказано предположение, что отношение N/B можно использовать как показатель эвтрофирования вод [9]. Результаты, полученные на водотоках НП «Припятский», оказались не столь убедительными, но они могут быть приняты во внимание при проведении дальнейших исследований.

Оценка уровня количественного развития фитопланктона водотоков НП «Припятский», как и особенностей их видового состава, показала, что среди них есть водотоки разной степени трофности – от ультраолиготрофных до гиперэвтрофных – и что им присуща чрезвычайно высокая степень специфичности. Это делает водные экосистемы НП особенно интересными и требующими большого внимания природоохранных организаций и ученых-исследователей.

Библиографические ссылки

1. Михеева Т. М. Альгофлора Беларуси. Таксономический каталог. Минск, 1999.
2. Михеева Т. М., Свирид А. А., Хурсевич Г. К., и др. Водоросли планктона водоемов и водотоков Национального парка «Припятский» / под ред. Т. М. Михеевой. Минск, 2016.
3. Михеева Т. М. Озерный фитопланктон и его продукционные возможности в озерах разного типа : дис. ... канд. биол. наук : 105 – Гидробиология. Минск, 1969.
4. Михеева Т. М. Методы количественного учета нанофитопланктона (обзор) // Гидробиол. журн. 1989. Т. 25, № 4. С. 3–22.
5. Михеева Т. М., Лукьянова Е. В. Инвазия чужеродных видов водорослей и новые для флоры Беларуси виды, обнаруженные в водоемах Национального парка «Припятский» // Современное состояние, тенденции развития, рациональное использование и сохранение биологического разнообразия растительного мира : материалы Междунар. науч. конф. (Минск – Нарочь, 23–26 сент. 2014 г.) / редкол.: А. В. Пугачевский (гл. ред.) [и др.]. Минск, 2014. С. 108–111.
6. Михеева Т. М., Лукьянова Е. В., Свирид А. А. Современное таксономическое разнообразие фитопланктона водоемов и водотоков Национального парка «Припятский» // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2015. № 2. С. 40–46.
7. Измest'ева Л. Р., Кожова О. М., Михеева Т. М. и др. Связь биомассы и численности фитопланктона // Мониторинг фитопланктона. Новосибирск, 1992. С. 41–55.
8. Михеева Т. М. Степень колониальности и размерно-весовые характеристики фитопланктонных сообществ водных экосистем Беларуси // Гидробиол. журн. 1998. Т. 34, № 2. С. 9–19.
9. Михеева Т. М. Отношение численности к биомассе фитопланктона как возможный показатель эвтрофирования вод // Антропогенное эвтрофирование природных вод : тез. докл. III Всесоюз. симпоз. (Москва, сент. 1983 г.). Черногловка, 1983. С. 69–72.

References

1. Mikheyeva T. M. Algal flora of Belarus. Taxonomic catalogue. Minsk, 1999 (in Russ.).
2. Mikheyeva T. M., Svirid A. A., Khursevich G. K., et al. Algae of plankton of water bodies and watercourses of the National Park «Pripyatsky». Minsk, 2016 (in Russ.).
3. Mikheeva T. M. Ozeriyi fitoplankton i ego produktsionnye vozmozhnosti v ozerakh raznogo tipa [Phytoplankton of the lakes and its productive possibilities in the lakes of different types] : diss. ... kandidata biol. nauk : 105 – Hydrobiology. Minsk, 1969 (in Russ.).
4. Mikheeva T. M. Metody kolichestvennogo ucheta nanofitoplanktona (obzor) [The methods of quantitative registration of nano-phytoplankton (review)]. *Hydrobiol. J.* 1989. Vol. 25, No. 4. P. 3–22 (in Russ.).
5. Mikheeva T. M., Lukyanova E. V. Invaziya chuzherodnykh vidov vodoroslei i novye dlya flory Belarusi vidy, obnaruzhennyye v vodoemakh Natsional'nogo parka «Pripyatskii» [Invasion of alien species of algae and the new for Belarus flora species which were revealed in water bodies of National Park «Pripyatsky»]. *Sovremennoye sostoyaniye, tendencii razvitiya, racional'noye ispolzovanie i sohraneniye biologicheskogo raznoobraziya rastitel'nogo mira* : materialy Mezhdunar. nauchn. konf. (Minsk – Naroch, 23–26 Sept., 2014). Minsk, 2014. P. 108–111 (in Russ.).
6. Mikheeva T. M., Lukanova E. V., Svirid A. A. Sovremennoye taksonomicheskoye raznoobrazie fitoplanktona vodoemov i vodotokov Natsional'nogo parka «Pripyatskii» [Current state of phytoplankton taxonomic diversity in water bodies and watercourses of National Park «Pripyatsky»]. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2015. No. 2. P. 40–46 (in Russ.).
7. Izmes't'yeva L. R., Kozhova O. M., Mikheeva T. M., et al. Svyaz' biomassy i chislennosti fitoplanktona [Connection of phytoplankton biomass and abundance]. *Monitoring of phytoplankton*. Novosibirsk, 1992. P. 41–55 (in Russ.).
8. Mikheeva T. M. Stepen' kolonial'nosti i razmerno-vesovyye kharakteristiki fitoplanktonnykh soobshchestv vodnykh ekosistem Belarusi [The degree of colonization and size-weight characteristics of phytoplankton communities of water ecosystems of Belarus]. *Hydrobiol. J.* 1998. Vol. 34, No. 2. P. 9–19 (in Russ.).
9. Mikheeva T. M. Otnosheniye chislennosti k biomasse fitoplanktona kak vozmozhnyy pokazatel' evtrofirovaniya vod [Ratio of abundance to biomass of phytoplankton as a possible indicator of water eutrophication]. *Antropogennoye evtrofirovaniye prirodnnykh vod* : tez. dokl. III Vses. simp. (Moscow, Sept., 1983). Chernoglovka, 1983. P. 69–72 (in Russ.).

Статья поступила в редакцию 09.01.2017.
Received by editorial board 09.01.2017.

СТРУКТУРА И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ РАЗВИТИЕ ФИТОПЛАНКТОНА ОЗЕРНЫХ ВОДОЕМОВ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА «ПРИПЯТСКИЙ»

Т. М. МИХЕЕВА¹⁾, Е. В. ЛУКЬЯНОВА¹⁾, А. А. СВИРИД²⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка,
ул. Советская, 18, 220050, г. Минск, Республика Беларусь

Приведены данные о таксономической структуре, летнем уровне биомассы фитопланктона, степени колонизации фитопланктонных сообществ, размере, массе клеток и организмов фитопланктона 19 старичных озер, в число которых вошли правобережные и левобережные пойменные озера р. Припяти, непроточные старичные озера в пределах высокой поймы или первой надпойменной террасы и два реликтовых озера карстового происхождения, расположенных в пределах Национального парка «Припятский» (Беларусь). Исследования проводились в летнее время 2009, 2010 и 2015 гг. В составе фитопланктона старичных озер пойм рек Свиновод и Припяти идентифицированы 217 видов (220 таксонов), в озерах надпойменной террасы – 100 (99), в двух реликтовых озерах карстового происхождения – только 8 видов. Указаны новые для Беларуси виды. Представлен состав доминирующих комплексов фитопланктона по численности (клеток и организмов) и биомассе и приведено долевое их участие в том и другом. Отмечена высокая степень специфичности как таксономического состава, так и количественного развития фитопланктона изученных озерных водоемов. Определены уровень количественного развития общего фитопланктона во всех группах озер-старич и степень участия в нем разных таксономических групп водорослей.

Ключевые слова: Беларусь; Национальный парк «Припятский»; озерные водоемы; старичные и карстовые озера; таксономическая структура фитопланктона; биомасса; степень колонизации; размер, масса клетки и организма.

STRUCTURE AND QUANTITATIVE PHYTOPLANKTON DEVELOPMENT IN LAKES WATER BODIES OF THE NATIONAL PARK «PRIPYATSKY»

T. M. MIKHEEVA^a, E. V. LUKYANOVA^a, A. A. SVIRID^b

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bBelarusian State Pedagogic University named after Maxim Tank,
Sovetskaya avenue, 18, 220050, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: mikheeva@tut.by

The data on taxonomic structure, on the level of summer phytoplankton biomass, and on the degree of phytoplankton community colonization, size, mass of phytoplankton cells and organisms in 19 oxbow lakes which included right-bank

Образец цитирования:

Михеева Т. М., Лукьянова Е. В., Свирид А. А. Структура и количественное развитие фитопланктона озерных водоемов Национального парка «Припятский» // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 86–97.

For citation:

Mikheeva T. M., Lukyanova E. V., Svirid A. A. Structure and quantitative phytoplankton development in lakes water bodies of the National Park «Prip'yatsky». *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 86–97 (in Russ.).

Авторы:

Тамара Михайловна Михеева – доктор биологических наук, доцент; главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета.

Елена Васильевна Лукьянова – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета.

Анна Анатольевна Свирид – кандидат биологических наук; доцент кафедры общей биологии и ботаники факультета естествознания.

Authors:

Tamara Mikheeva, doctor of science (biology), docent; chief researcher at the research laboratory of aquatic ecology, faculty of biology.

mikheeva@tut.by

Elena Lukyanova, researcher at the research laboratory of aquatic ecology, faculty of biology.

elena_lukyanova@tut.by

Anna Svirid, PhD (biology); associate professor at the department of general biology and botany, faculty of natural science.

sviridanna.61@mail.ru

and left-bank floodplain lakes of Pripjat' River, non-flowing oxbow lakes within a high flood or the first terrace above the floodplain and 2 relict lakes of karst origin located within National Park «Pripyatsky» (Belarus) are represented. The investigations were conducted in summer expeditions during 2009, 2010 and 2015 years. 217 species (220 taxons) in phytoplankton of oxbow lakes were revealed, in the lakes of floodplain terraces – 100 (99), in 2 relict lakes of karst origin – only 8 species. The new for Belarus species are given. The composition of dominant phytoplankton species complexes identified by cells and organisms abundance and by biomass is presented; the share of each of them is indicated in both. The level of quantitative development of total phytoplankton in all groups of water bodies is determined and the share of different taxonomic groups is calculated. The high specificity is constatated both for taxonomic composition and quantitative development of phytoplankton of the investigated lakes water bodies.

Key words: Belarus; National Park «Pripyatsky»; lakes water bodies; oxbow and karst lakes; phytoplankton taxonomic structure; biomass; degree of colonization; size and mass of cell and organism.

Изученность и постановка проблемы

Степень изученности альгофлоры всех водных экосистем Национального парка (НП) «Припятский» представлена в [1]. В настоящей работе приведены результаты, полученные только для озерных водоемов, к которым в полной мере относится все то, что сказано в целом о водоемах и водотоках НП в [1].

Объекты и методика исследований

Характеристика водных объектов, включая озерные водоемы, территории НП подробно изложена в [2–6].

В НП насчитывается 526 озер общей площадью 504 га. Преобладают малые по размерам (до 0,5 га) мелководные (максимальная глубина – 5 м) пойменные озера старичного типа р. Припяти. Они периодически заливаются водами реки в половодья и паводки.

В 2009–2015 гг. (в августе каждого указанного года) были отобраны образцы планктонных проб **в 19 старичных озерах**: одно расположено в пойме р. Свиновод (старица без названия), 12 – в пойме р. Припяти, 6 непроточных озер, не имеют гидрологической связи с р. Припятью и находятся на высокой пойме левобережья или первой надпойменной террасе правобережья. Исследованы также два реликтовых озера карстового происхождения.

Изученные старичные озера по месту их нахождения и типу гидрологического режима объединяются в три группы: 1) *правобережные пойменные старичные озера* р. Припяти, расположенные вниз по ее течению, – озера Старик Переровский, Погной, Плесо у д. Хлупин, старица во втором квартале Переровского лесничества, озера Старая Река и Луки; 2) *левобережные пойменные старичные озера* р. Припяти, также расположенные вниз по ее течению, – озера Плищин, Плесо (левобережное), Кривское, Старица, Старуха, Протока Ров; 3) *непроточные старичные озера в пределах высокой поймы и первой надпойменной террасы*: левобережные – озера Подшибенное и Теремшино (в пределах высокой поймы), правобережные (на первой надпойменной террасе) – озера Северское, Карасино, Любень, Панское Карасино.

Реликтовые озера карстового происхождения Пуповское и Межечевское расположены в пределах крупных болотных массивов Лельчицкой водно-ледниковой равнины. В настоящее время эти озера НП окружены переходными болотами с многочисленными западинами, заросшими водно-болотной растительностью.

Более подробная физико-географическая характеристика изученных озерных водоемов с указанием некоторых гидрохимических показателей воды представлена в [7].

Сбор планктонных проб осуществляли стандартным сетным и осадочным методами с некоторыми модификациями [8]. Методика учета фитопланктонных организмов, как их видового состава, так и количественной оценки, приведена в [1].

Результаты исследований и их обсуждение

Структурный таксономический состав фитопланктонных сообществ трех указанных выше групп озерных водоемов НП «Припятский» представлен в табл. 1.

В составе фитопланктона **старичных озер пойм рек Свиновод и Припяти** идентифицировано 217 видов (220 таксонов рангом ниже рода). Видовое богатство фитопланктона в старицах различалось: от 77 видов в оз. Плищин до 21 – в оз. Погной. При этом можно отметить, что более богатый видовой состав фитопланктона был в левобережных старицах и находился в пределах 77–28 видов, в то время как в правобережных интервал различий числа видов между старицами находился в пределах от 35 (старица без названия (б/н)) до 21 (оз. Погной).

Наиболее богатыми по числу видов были зеленые (хлорококковые) водоросли – 54 вида (68 таксонов), среди диатомовых в количественных пробах определено 46 таксонов. Эвгленовые были представлены 32 видами, золотистые и цианопрокариоты насчитывали по 23 вида. Из других отделов и групп отмечено 11 видов криптофитовых, 10 – динофитовых, 6 – конъюгат, по 4 представителя – желтозеленых, вольвоксовых, улотриковых и 2 вида – рафидофитовых. Самыми распространенными оказались представители криптофитовых *Rhodomonas pusilla* (H. Bachmann) Javornicky (не отмечен только в оз. Погной) и *Cryptomonas marssonii* Skuja (кроме левобережного оз. Плесо и правобережной старицы Старой Реки), эвгленовых – *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg (кроме оз. Кривского) и хлорококковых – *Monoraphidium minutum* (Nägeli) Komárková-Legnerová (кроме стариц Погной и б/н). Вид *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová встречался в фитопланктоне восьми из 13 озер-стариц, *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald et Hanagata – в 9 старичных озерах. Более чем в 50 % озер отмечены виды диатомовых *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen, *Cocconeis placentula* Ehrenberg var. *placentula*, *Hannaea arcus* (Ehrenberg) Patrick, *Cyclotella meneghiniana* Kützing. Около 20 видов зарегистрированы в четырех – семи озерах-старицах. Большинство же представителей видов водорослей встречены лишь в одном-двух озерах. Многие из них были столь же широко распространены, как и в реках [1]. Только в левобережных старицах отмечены *Anabaena planctonica* Brunnthaler и *Dolichospermum flosaquae* (Brébisson ex Bornet & Flahault) P. Wacklin, L. Hoffmann & J. Komárek.

В старичных озерах пойм рек Свиновод и Припяти выявлено наибольшее число (24) новых для альгофлоры Беларуси видов, не отмечавшихся нами ранее [9–10]. Из них – по шесть представителей золотистых и хлорококковых, по два – из цианобактерий, криптофитовых, динофитовых, диатомовых, эвгленовых и по одному представителю – из рафидофитовых, конъюгат, а также вид, таксономическое положение которого не удалось установить (см. табл. 1).

Таблица 1

Количество таксонов в разных отделах водорослей в старичных и карстовых озерах

Table 1

The number of taxons in different algae divisions in oxbow lakes and lakes of karst origin

Систематические группы	Старичные озера, расположенные в поймах рек Свиновод и Припяти	Старичные озера высокой поймы и первой надпойменной террасы	Карстовые озера
Цианобактерии (синезеленые)	23 (2)*	6 (1)	1
Криптофитовые	11 (2)	5 (1)	1
Динофитовые	10 (2)	5	0
Золотистые	23 (6)	9 (2)	1
Диатомовые	46 (2)	29	2
Желтозеленые	4	2	0
Эвгленовые	32 (2)	16 (1)	1
Зеленые:	68 (6)	26 (1)	1 (1)
вольвоксовые	4**	1**	0**
хлорококковые (протококковые)	54 (6)**	19 (0)**	1 (1)**
улотриковые	4**	1**	0**
конъюгаты	6 (1)**	5 (1)**	0**
Рафидофитовые	2 (1)	2 (1)	1
Неопределенный вид	1	0	0
Всего	220 (24)	100 (7)	8 (1)

*В скобках указано число новых для Беларуси видов. **Входит в число зеленых.

*The new for Belarus species are indicated in brackets. **Is included in the number of green algae.

Старичные озера **высокой поймы и первой надпойменной террасы** гидрологически, как уже указывалось выше, не имеют связи с р. Припятью и лишь во время разливов в редкие годы к ним доходят водные потоки. Два левобережных озера – Подшибенное и Теремшино – находятся на высокой пойме, четыре правобережных – на первой надпойменной террасе. При дальнейшем описании результатов для этой группы озер будет использовано единое название «озера надпойменной террасы».

В шести старичных озерах надпойменной террасы таксономический состав фитопланктона был представлен 100 (99) таксонами (видами), т. е. более чем в два раза меньшим количеством, чем в рассмотренных выше старицах, расположенных в поймах рек Свиновод и Припяти, что, возможно, связано и с меньшим числом изученных объектов (см. табл. 1). Число видов в фитопланктоне озер надпойменной террасы было в пределах 19–31, что сближает их с правобережными пойменными старичными озерами р. Припяти. По этому показателю старичные озера располагаются в следующем порядке: Теремшино (31 вид и внутривидовой таксон), Карасино (30), Северское (27), Любень (25), Подшибенное (23), Панское Карасино (19). В отличие от озер-стариц пойм рек Свиновод и Припяти в старичных озерах надпойменной террасы видовое богатство зеленых водорослей было меньшим, чем диатомовых (26 против 31 %). Доля эвгленовых была сходной, занимая третье место, они составляли около 15 % общего числа представителей в тех и других группах стариц. Практически не различались и доли криптофитовых (по 5,0 %) и динофитовых (5,0 и 4,5 %), мало отличалась представленность золотистых (9,0 против 10,5 %), а вот доля видов цианобактерий была ниже (6,0 против 10,5 %). Во всех шести озерах-старицах отмечен только *Cryptomonas marssonii*; *Rhodomonas pusilla* (криптофитовые) зарегистрирован в пяти (за исключением оз. Панское Карасино); *Trachelomonas hispida* (Perty) F. Stein (эвгленовые), *Cocconeis placentula*, *Navicula* sp. (диатомовые), *Monoraphidium minutum* (хлорококковые) – в четырех. Общими для 50 % старичных озер оказались 10 представителей фитопланктона: *Gymnodinium* sp. (динофитовые), *Dinobryon divergens* O. E. Imhof (золотистые), *Aulacoseira granulata* var. *angustissima* (O. F. Müller) Simonsen, *Melosira varians* C. Agardh, *Cyclotella* sp. (диатомовые), *Trachelomonas volvocina* (эвгленовые), *Centritractus belonophorus* (Schmidle) Lemmermann (желтозеленые), *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald & Hanagata, *Monoraphidium contortum*, *Mucidosphaerium pulchellum* (H. C. Wood) C. Bock, Proschold & Krienitz (хлорококковые). В озерах Карасино и Северском обнаружен широко распространяющийся в последнее время вид рафидофитовых водорослей – *Gonyostomum semen* (Ehrenberg) Diesing. Большинство же видов, как и в других типах водных объектов НП «Припятский», встречены только в каком-нибудь одном озере. В старичных озерах высокой поймы и первой надпойменной террасы выявлены семь новых для альгофлоры Беларуси видов: два представителя золотистых (*Chrysamoeba radians* Klebs, *Pseudokephyrion cylindricum* (Lackey) Bourrelly) и по одному представителю из криптоноад (*Cryptomonas pyrenoidifera* Geitler), цианобактерий (*Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Forti) Zapomelová, Jezberová, Hrouzek, Hisem, Reháková & Komárková), эвгленовых (*Euglena variabilis* Klebs), десмидиевых (*Gonatozygon kinahanii* (W. Archer) Rabenhorst) и рафидофитовых (*Vacuolaria virescens* Cienkowski) [7; 9; 10].

Для реликтовых озер карстового происхождения Межечевского и Пуповского характерен очень бедный в видовом отношении состав фитопланктона – в этих озерах отмечено всего восемь видов, из них пять – в оз. Межечевском и четыре – в оз. Пуповском (см. табл. 1). Общим для двух озер оказался только один вид – *Cr. marssonii*. Каждый отдел, за исключением диатомовых, был представлен фактически одним видом. Обнаружен один новый для флоры Беларуси вид зеленых (хлорококковые) водорослей – *Franceia ovalis* (Forti) Zapomelová, Jezberová, Hrouzek, Hisem, Reháková & Komárková, найденный в оз. Пуповском. В этом же озере отмечен и представитель рафидофитовых *G. semen*, который, как было отмечено выше, широко стал распространяться не только в южных водных экосистемах, но и в более высоких широтах.

К основным доминантам отнесены виды, составляющие ≥ 10 % суммарной численности и биомассы фитопланктонных организмов, к субдоминантам – виды, составляющие 5,0–9,9 %. Виды с таким представительством включали в доминирующий комплекс.

В доминирующих комплексах видов фитопланктона старичных озер поймы рек Свиновод и Припяти в трех старицах доминировали динофитовые водоросли. В планктоне оз. Луки *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans был определяющим доминантом в биомассе (76,4 %). В оз. Плесо этот же вид составил 35,6 % биомассы, а вместе с другим представителем из рода *Peridinium* они достигли суммарной биомассы 47,3 %. В планктоне старицы р. Свиновод около 50 % биомассы и 45 % численности организмов пришлось на долю еще одного представителя динофитовых – *Peridiniopsis penardiforme* (Lindemann) Bourrelly (20 × 20 мкм) и его цист. Из указанного количества на долю цист приходилось 10,4 и 30,9 % соответственно. В оз. Луки по численности лидировал представитель эвгленовых *Tr. volvocina* (33,5 %), который в биомассе имел только 5,8 %. В оз. Плесо в доминанты по биомассе вышли и три представителя цианобактерий. В качестве вида-доминанта по биомассе *C. furcoides* обозначился только еще в одном озере – старице р. Припяти во втором квартале Переровского лесничества с меньшей степенью доминирования (14,5 %). Две старицы из этой категории старичных озер – озера Плищин и Погной – выделяются интенсивным развитием двух представителей рафидофитовых водорослей: в оз. Плищин в 2010 г. – *V. virescens* (около 69 % в общей биомассе фитопланктона), в оз. Погной – *G. semen* (88 % биомассы). Только в оз. Плищин доминировала и *Skeletonema subsalsum* (Cleve-Euler) Bethge – диатомовая водоросль, впервые обнаруженная нами в НП «Припятский». Она составила не только

12,6 % биомассы, но и 25,2 % численности организмов. Интересно, что в 2015 г. ситуация в этом озере по составу доминирующего комплекса была совершенно иной. В оз. Старик Переровский доминировали исключительно криптофитовые водоросли и по биомассе, и по численности. Преимущественное число видов-доминантов в оз. Протока Ров также принадлежало криптофитовым. В оз. Старуха, единственной старице среди стариц пойм рек Свиновод и Припяти, из трех видов-доминантов по численности организмов и четырех по биомассе лидировали цианобактерии *An. planctonica*, *Aphanizomenon flosaquae* Ralfs ex Bornet & Flahault, *D. flosaquae*. В оз. Плесо у д. Хлупин состав доминирующего комплекса был достаточно выравненным – по численности организмов доминантами стали 11 видов (от 5,1 до 13,6 % доминирования), по биомассе – шесть (от 6,9 до 20,0 %) – и состоял из представителей разных отделов водорослей. То же можно сказать об оз. Старица: в биомассе доминировали восемь видов – от 5,1 до 13,0 %, по численности организмов пять видов – от 5,7 до 19,8 % (*Rh. pusilla*).

Старичные озера **высокой поймы и первой надпойменной террасы** изучались только в 2015 г., за исключением оз. Подшибенного. В оз. Северском, обследовавшемся 22 июля, в большом количестве вегетировал *G. semen* (рафидофитовые), создав благодаря своим большим размерам ($60\text{--}80 \times 40\text{--}57$ мкм) около 10 мг/л общей биомассы фитопланктона (92,3 %). По численности организмов (23,2 %) он фактически разделил первое место с мелкоклеточным представителем криптоноад – *Cr. marssonii* (23,8 %). Остальные 6 видов-доминантов (из криптофитовых, диатомовых, хлорококковых и эвгленовых) достигали относительной численности от 6,0 до 11,9 %. В пробах из этого старичного озера в осадке массово присутствовали цисты, вероятно, динофитовых – гимнодиниума или перидиниума. При наступлении благоприятных условий они могут получить интенсивное развитие и даже вызвать «цветение» воды.

В оз. Подшибенном доминирующий комплекс видов фитопланктона как по численности организмов, так и по биомассе состоял практически полностью из представителей диатомовых водорослей. В биомассе вид из рода *Eunotia* размером $100,0 \times 12,5$ мкм составил более 50 %, уступив по численности организмов (13,7 %) более мелкоразмерному (20×7 мкм) представителю из рода *Achnanthes* (29,5 %). На другие виды-доминанты приходилось от 5,0 до 8,4 % как по биомассе, так и по численности.

В состав доминирующего комплекса видов фитопланктона оз. Карасино по биомассе вошли только три представителя. Из них *G. semen* из рафидофитовых, столь же крупноразмерный, как и *V. virescens* ($58\text{--}67 \times 53\text{--}60$ мкм), дал в общую биомассу 71,1 % и составил, как и в оз. Северском, около 10 мг/л. Представитель золотистых *D. divergens* добавил в биомассу 12 % (1,6 мг/л), а третий доминант *Cr. marssonii* – наполовину меньше (6,1 %). По численности организмов лидировали два представителя рода *Monoraphidium* (в сумме 37,5 %), два – из криптофитовых (29,8 %) и один – из диатомовых (8,3 %).

В фитопланктоне оз. Любень по биомассе и численности доминировали три разных вида. В биомассе наибольший вес имели крупноклеточные *V. virescens* (67,5 %, или 11,3 мг/л), *Melosira varians* C. Agardh (10,2 %, или 1,7 мг/л) и *A. granulata* (5,4 %, или 0,9 мг/л). По численности наибольшее количество составляли мелкоклеточные золотистые *Chrysoidalis peritaphrena* J. Schiller (62,7 %), *Pseudokephyrion entzii* W. Conrad (6,4 %) и представитель хлорококковых *M. contortum* (6,4 %).

Фитопланктон оз. Панское Карасино характеризовался богатыми по составу и выравненными по уровню численности и биомассы доминирующими комплексами (11 видов-доминантов в численности организмов и 7 – в биомассе), что отличает его от других рассматриваемых старичных озер первой надпойменной террасы. Среди доминирующих по численности организмов – 5 видов диатомовых с наибольшим участием (14,3 %) *C. placentula*, три вида хлорококковых, два – криптофитовых и один – золотистых (*D. divergens*), все – с 7,1 % доминирования. Биомассу составляли организмы из пяти отделов водорослей с наибольшим участием *Peridinium cinctum* (O. F. Müller) Ehrenberg (из динофитовых) размером $42,5 \times 30,0$ мкм – 23,1 %, трех видов диатомовых (в сумме 36,3 %), одного представителя цианобактерий – *Aph. aphanizomenoides* (16,8 %) и одного – криптоноад (5,5 %). Отметим, что это единственное озеро-старица, в котором доминировал представитель цианобактерий.

Наконец, оз. Теремшино отличается от рассмотренных озер-стариц доминированием в биомассе фитопланктона (как и в пойменных озерах Луки и Плесо), динофитовых водорослей – крупных организмов с большой индивидуальной массой: *P. cinctum* (45×45 мкм при весе $477 \cdot 10^{-10}$ г) и *C. hirundinella* var. *furcoides* Levander ($2157 \cdot 10^{-10}$ г), определивших 94 % биомассы фитопланктона (за счет перидиниума – 51,5 мг/л и цератиума – 22,0 мг/л). По численности организмов доминировали четыре вида: *Cyclotella* sp., *P. cinctum*, *Rh. pusilla* и *Kephyrion sphaericum* (Hilliard) Starmach.

В двух обследовавшихся **карстовых озерах** почти абсолютное доминирование по численности организмов было у представителя криптофитовых – вида *Cr. marssonii*, который в оз. Межечевском достиг 1,3 млн/л, а в оз. Пуповском – 4,2 млн/л. При значительном различии величин общей биомассы фитопланктона в этих озерах – 2,23 мг/л в оз. Межечевском и 22,8 мг/л в оз. Пуповском – относительное участие *Cr. marssonii* в общей численности организмов было одинаковым – 93,3 и 93,8 % соответственно.

Это объясняется нахождением в оз. Пуповском в 2015 г. крупноклеточного представителя рафидофитовых *G. semen*, который при численности 0,2 млн/л определил 75,7 % биомассы, на долю же вида *Cr. marssonii* приходилось 23,9 %.

Уровень количественного развития общего фитопланктона **во всех группах озер-старич** по трем показателям – численности организмов, численности клеток и общей биомассе фитопланктона – представлен в табл. 2.

Таблица 2

**Численность организмов ($N_{орг}$), клеток ($N_{кл}$) и биомассы (B)
фитопланктона озерных водоемов НП «Припятский»**

Table 2

**The abundance of organisms (N_{org}), cells (N_{kl}) and biomass (B)
of phytoplankton in lakes water bodies of NP «Pripyatsky»**

Дата исследования	$N_{орг}$, млн/л	$N_{кл}$, млн/л	B , мг/л
Правобережные к р. Припяти пойменные старичные озера			
Старица р. Свиновод			
17.08.2009	0,94	1,49	1,45
Правобережные пойменные старичные озера р. Припяти вниз по ее течению			
оз. Старик Переровский			
22.07.2015	9,35	12,87	11,67
оз. Погной			
22.07.2015	1,33	3,74	14,65
оз. Плесо у д. Хлупин			
19.08.2009	23,84	23,97	2,09
19.08.2009	0,85	1,31	1,73
Старица р. Припяти во втором квартале Переровского лесничества			
19.08.2010	4,46	6,27	2,83
оз. Старая Река			
18.08.2009	3,37	4,23	1,26
оз. Луки			
18.08.2009	1,43	2,65	3,06
Левобережные пойменные старичные озера, расположенные вниз по течению р. Припяти			
оз. Плищин			
17.08.2010	2,65	7,29	7,89
21.07.2015	17,40	285,45	45,11
оз. Плесо			
21.07.2015	1,78	69,12	5,42
оз. Кривское			
21.07.2015	7,68	10,23	6,34
оз. Старица			
21.07.2015	3,10	8,27	4,51
оз. Старуха			
21.07.2015	16,10	313,26	42,23
оз. Протока Ров			
21.07.2015	17,87	20,67	17,54

Окончание табл. 2
Ending table 2

Дата исследования	$N_{\text{орг}}$, млн/л	$N_{\text{кл}}$, млн/л	B , мг/л
Старичные озера высокой поймы и первой надпойменной террасы			
оз. Северское			
22.07.2015	0,49	1,11	10,73
оз. Карасино			
22.07.2015	22,59	243,29	13,50
оз. Любень			
22.07.2015	7,99	11,03	16,67
оз. Панское Карасино			
22.07.2015	0,53	1,74	1,62
оз. Подшибенное			
17.08.2010	0,70	1,41	1,40
оз. Теремшино			
21.07.2015	5,50	102,05	78,33
Реликтовые карстовые озера			
оз. Межечевское			
20.08.2009	1,46	1,61	2,32
оз. Пуповское			
22.07.2015	4,42	4,42	22,79

Различия величин общей численности организмов в 13 старицах пойм рек Свиновод и Припяти уложились в диапазон, установленный для одной из них, а именно для старицы р. Припяти – оз. Плесо у д. Хлупин, – от 0,85 до 23,84 млн/л. Первая цифра получена для центральной части водоема, вторая – для прибрежной, в которой 97,9 % численности организмов определили хлорелловидные клетки размером 5 мкм. В пробе из центральной части старицы на долю зеленых пришлось гораздо меньше – 30,5 %, а доля других отделов была соответственно выше: криптофитовых – 27,1%, диатомовых – 23,7, золотистых – 13,6 %. Вероятно, эти существенные различия можно объяснить поступлением у берега каких-то дополнительных источников питания из локальных источников, определивших более интенсивное развитие зеленых водорослей.

Численность организмов на уровне 16–18 млн/л отмечена в трех других старичных озерах: в оз. Старуха – 16,1 млн/л (при 75,7 % доминирования цианобактерий из родов *Aphanizomenon* и *Anabaena*), оз. Плищин – 17,4 млн/л (58,2 % криптофитовых, 16,9 % цианобактерий), оз. Протока Ров – 17,4 млн/л (68,1 % криптоноад и 19 % зеленых водорослей). В оз. Старик Переровский из 9,4 млн орг./л около 80 % также принадлежали представителям криптоноад. В трех других озерах-старицах (старица р. Свиновод, озера Погной и Луки) доминировали водоросли, включенные в группу «прочие», в которую включались все другие представители, кроме цианобактерий, криптофитовых, золотистых, диатомовых и зеленых водорослей – наиболее частых обитателей озерных водоемов НП «Припятский». В старице р. Свиновод – это динофитовые с представителем *P. penardiforme* (44,7 %); в оз. Погной – эвгленовые, а именно представители рода *Phacus* (41 %), криптофитовые – *Cr. marssonii* (20 %) и рафидофитовые – *G. semen* (11,2 %); в оз. Луки – эвгленовые (виды родов *Trachelomonas*, *Euglena* – 36,7 %) в сопровождении хлорококковых (25 %), диатомовых (21,3 %), золотистых (9,8 %) и динофитовых (4,2 %). Следует отметить одну старицу (оз. Кривское), в которой доминирующее положение по численности организмов – 48,0 % общей численности, равной 7,7 млн/л, – имели золотистые водоросли, преимущественно из родов *Kephyrion*, *Pseudokephyrion*, *Dinobryon*. По численности клеток старицы, расположенные в пойме рек Свиновод и Припяти, различались гораздо существеннее, чем по численности организмов, – от 1,3 до 313,0 млн кл./л. Величины порядка 300 млн кл./л были установлены только для двух старичных озер – Плищин (285,5 кл./л) и Старуха (313,3 кл./л), и обусловлены они были развитием многоклеточных представителей цианобактерий из родов *Anabaena*, *Aphanizomenon*, а в оз. Плищин еще и колониальным видом *Aph. clathrata*, определившими в этих двух озерах 93,6 и 98,4 % общей численности клеток фитопланктона соответственно. Такое же абсолютное доминирование цианобактерий имело

место в левобережном старичном оз. Плесо (96,6 %) также за счет *Aph. clathrata* (86,8 %) и *An. flosaquae* при численности более чем в четыре раза меньшей (69,1 млн кл./л). В оз. Старик Переровский, старице р. Припяти – оз. Плесо у д. Хлупин, в озерах Старая Река и Луки цианобактерии не отмечены вовсе. В старице р. Свиновод при общей численности клеток 1,5 млн/л цианобактерии составляли 36,2 %, в оз. Погной – 47 % от 3,74 млн кл./л. Большую относительную значимость в численности клеток фитопланктона в озерах Протока Ров и Старик Переровский имели криптофитовые – около 60 % за счет нескольких видов рода *Cryptomonas*, а также *Rh. pusilla*. В том и другом старичных озерах около 30 % численности клеток составляли также зеленые водоросли. Золотистые не обнаружены в четырех старичных озерах: старице р. Свиновод, оз. Старуха, оз. Плесо у д. Хлупин, старице р. Припяти во втором квартале Переровского лесничества. В большинстве старичных озер золотистые составляли от 0,1 до 6,0 %, в оз. Старая Река – 18,4 % и только в оз. Кривском достигли относительной значимости (36,1 %) за счет четырех видов рода *Kephyrion*, двух видов рода *Dinobryon* и трех других малочисленных представителей. Относительная значимость диатомовых водорослей в общей численности клеток фитопланктона различалась от 0,3 % в оз. Старая Река до 37,4 % в оз. Плесо у д. Хлупин, в которой диатомовые оказались на первом месте – перед зелеными (33 %) и криптофитовыми (17,6 %) водорослями. В оз. Старая Река при минимальной значимости диатомовых отмечена относительная значимость зеленых – 34 %, криптофитовых – 33 % и золотистых – 18,4 %. Среди прочих можно отметить 32,2 % динофитовых в старице р. Свиновод (*P. penardiforme*), эвгленовых – в оз. Погной (14,5 % за счет видов родов *Phacus* и *Trachelomonas*, 4 % – рафидофитовых, 3,1 % – десмидиевых), в оз. Луки – 22,1 % эвгленовых за счет *E. acus* и видов рода *Trachelomonas*.

Величины общей биомассы фитопланктона старичных озер, расположенных в поймах рек Свиновод и Припяти, оказались в правобережных старицах ниже, чем в левобережных. Для семи правобережных стариц биомасса в среднем составляла 5,3 мг/л, а для шести левобережных – 17,1 мг/л. Среди левобережных наиболее высокими значениями выделялись озера Плищин (45,1 мг/л) и Старуха (42,2 мг/л), среди правобережных – озера Погной (14,7 мг/л) и Старик Переровский (11,7 мг/л). В остальных пяти правобережных старицах общая биомасса фитопланктона находилась в пределах 1,26–3,06 мг/л. Наиболее низкая биомасса среди левобережных стариц отмечена в оз. Старица – 4,5 мг/л. К ней близка и биомасса фитопланктона в оз. Плесо – 5,4 мг/л.

Заметной особенностью развития биомассы фитопланктона рассматриваемых **стариц пойм рек Свиновод и Припяти** являлась высокая степень относительного участия в ней водорослей, сведенных в группу «прочие». При характеристике этой группы необходимо отметить следующее: 1) в старице р. Свиновод с невысокой общей биомассой фитопланктона (1,45 мг/л) 48 % ее определял представитель динофитовых *P. penardiforme* (20 × 20 мкм); 2) в оз. Погной в биомассе 14,7 мг/л 88 % составлял представитель рафидофитовых *G. semen*, 4,7 % – эвгленовых и 3,6 % – десмидиевых; 3) в оз. Луки в биомассе около 3 мг/л 76,4 % приходилось на *C. hirundinella* var. *furcoides* (динофитовые) и 11 % – на эвгленовые; 4) в старице р. Припяти, во втором квартале, эвгленовые, в большинстве представители рода *Phacus*, определяли 40,5 % биомассы и 14,5 % вносил *C. hirundinella*; 5) в оз. Плищин в 2010 г. около 70 % биомассы создавалось представителем рафидофитовых *V. virescens*; 6) в оз. Плесо из 5,42 мг/л биомассы 49,1 % приходилось на долю цератииума.

Обращает на себя внимание высокое доленое участие криптофитовых водорослей в некоторых старичных озерах: Старик Переровский – 91,3 %, Протока Ров – 76,7, Старая Река – 59,2, оз. Плищин в 2015 г. – 46,6 %. Высокая степень доминирования в биомассе цианобактерий отмечена только в оз. Старуха – 78,3 %. Около 40 % биомассы фитопланктона диатомовые составляли только в двух старичных озерах – Кривском (39,4 %) и Старице (36,6 %).

По степени количественного развития фитопланктона **в старичных озерах надпойменной террасы** выделяется оз. Теремшино, в основном по численности клеток и биомассе. Только в этом озере из данной группы численность клеток фитопланктона превысила 100 млн кл./л благодаря многоклеточному колониальному представителю цианобактерий *Aph. clathrata* и видам рода *Anabaena*, которые и определили на 93,8 % относительное участие цианобактерий в общей численности клеток. В остальных старичных озерах численность клеток измерялась величинами от 1 до 11 млн кл./л при численности организмов от 0,5 до 8,0 млн/л. Можно отметить малую долю цианобактерий в общей численности организмов (от 0 до 4,3 %). Еще только в оз. Панское Карасино при невысокой общей численности клеток (1,74 млн/л) доля цианобактерий в ней составляла 62,4 % благодаря многоклеточному нитчатому представителю *Aph. aphanizomenoides*. Большим было относительное участие золотистых водорослей в общей численности клеток в озерах Карасино (44,1 %) и Любень (53,2 %), а в последнем – и в численности организмов (72,4 %), а также диатомовых в оз. Подшибенном (82,2 % численности клеток и 78,9 % численности организмов). В группе водорослей «прочие» более высокими величинами численности организмов выделялись озера Теремшино и Северское. В первом из них 28,4 и 21,5 %

организмов принадлежали крупноклеточным динофитовым *C. hirundinella* var. *furcoides* и *P. cinctum* соответственно, 6,7 % – эвгленовым. Во втором озере из 41,5 % организмов 23 % принадлежали представителю рафидофитовых *G. semen*, 17,8 % – эвгленовым за счет представителей родов *Phacus* и *Trachelomonas*. В оз. Северском при просмотре осадка на предметном стекле обнаружено также большое количество цист, вероятно, какого-то вида рода *Peridinium* или *Gymnodinium*, которые при дальнейшем развитии могут обусловить массовую их вегетацию даже до стадии «цветения». Общая биомасса фитопланктона, так же как и численность его клеток, самой высокой в этой группе стариц была в оз. Теремшино – 78,3 мг/л и определялась крупноклеточными организмами *C. hirundinella* var. *furcoides* – 28,1 % и *P. cinctum* – 65,8 %. В следующих трех старицах – озерах Северском, Карасино, Любень – отмечено интенсивное развитие двух представителей рафидофитовых водорослей: в первых двух – *G. semen*, в оз. Любень – *V. virescens*. Они определяют в оз. Северском 92,3 % общей биомассы его фитопланктона (10,8 мг/л), в оз. Карасино – 71,1 % (13,5 мг/л), в оз. Любень – 71,6 % (16,7 мг/л) соответственно. В озерах Панское Карасино и Подшибенном при смешанном составе фитопланктона с доминированием в биомассе крупноклеточных диатомовых (39,0 % в первом озере и 94,6 % – во втором) отмечена наиболее низкая для этой группы старичных озер биомасса фитопланктона: 1,62 мг/л – в оз. Панское Карасино и 1,4 мг/л – в оз. Подшибенном.

Два **реликтовых карстовых озера Межечевское и Пуповское** исследовались, к сожалению, впрочем, как и другие водоемы и водотоки НП «Припятский», в разные годы: оз. Межечевское – в 2009 г., оз. Пуповское – в 2015 г. Поэтому результаты сравнения их альгологического состава недостаточно сопоставимы из-за меняющихся в разные годы экологических и климатических условий, тем не менее они представляют научный интерес. Сходные или даже одинаковые, как в оз. Пуповском, величины (4,42 млн/л) численности клеток и организмов общего фитопланктона в этих озерах могут свидетельствовать о том, что в обоих озерах обитают в планктоне преимущественно одноклеточные представители (абсолютное доминирование – свыше 93 %) криптофитовых водорослей (в случае этих озер – это почти монокультура *Cr. marssonii*), поэтому можно заключить, что условия для их развития в этих озерах весьма благоприятны и в большей степени в оз. Пуповском, для которого отмечены более высокие величины. Указанное выше сходство между озерами значительно уменьшается при сравнении величин их общей биомассы и долевого участия в ней разных отделов водорослей. Если по величинам численности фитопланктона озера различаются примерно в три раза, то по биомассе – почти в 10 раз. Относительная величина в биомассе криптофитовых в оз. Межечевском была на таком же уровне, как численность (около 94 %), а в оз. Пуповском она составила меньшую долю (24 %). Эти различия в величинах биомассы обусловил, как уже указывалось выше, крупноклеточный представитель рафидофитовых водорослей *G. semen*, который обнаружен в оз. Пуповском в 2015 г., но не был еще отмечен в оз. Межечевском, исследовавшемся в 2009 г. Ввиду широко распространяющейся инвазии этого вида возможно его появление и в оз. Межечевском, и в других водных экосистемах НП. Несмотря на небольшую численность этого организма (115 тыс./л), он, благодаря своим большим размерам (63–82 × 40–57 мкм), внес значительный вклад в общую биомассу фитопланктона (75,5 %), уменьшив относительный вклад гораздо более многочисленных (4,15 млн/л) криптонад.

Как сообщается в [1], о степени колониальности фитопланктонного сообщества хорошо говорит введенный показатель [11] $N_{\text{кл./орг}}$ т. е. численность клеток, приходящихся на один организм. По величинам этого показателя в старицах р. Припяти – озерах Плищин, Старуха, Плесо, а также в старице надпойменной террасы – оз. Теремшино – преобладали колониальные организмы, состоящие в среднем из 16–39 клеток (табл. 3).

Таблица 3

Степень колониальности фитопланктонных сообществ
и средняя масса планктонной единицы озерных водоемов НП «Припятский»

Table 3

The degree of phytoplankton community colonization
and average mass of plankton unity in lakes water bodies of NP «Pripyatsky»

Дата исследования	Нкл/Норг	Wорг · 10–6 мг	Wкл · 10–6 мг	Норг/В	Нкл/В
Правобережные пойменные старичные озера р. Припяти					
Старица р. Свиновод					
17.08.2009	1,6	1,541	0,972	0,6	1,0

Продолжение табл. 3
Continuation table 3

Дата исследования	Нкл/Норг	Wорг · 10–6 мг	Wкл · 10–6 мг	Норг/В	Нкл/В
Правобережные пойменные старичные озера р. Припяти вниз по ее течению					
оз. Старик Переровский					
22.07.2015	1,4	1,248	0,907	0,8	1,1
оз. Погной					
22.07.2015	2,8	11,055	3,917	0,1	0,3
оз. Плесо у д. Хлупин					
19.08.2009	1,0	0,087	0,087	11,4	11,5
19.08.2009	1,5	2,039	1,322	0,5	0,8
Старица р. Припяти во втором квартале Переровского лесничества					
19.08.2010	1,4	0,282	0,201	3,5	5,0
оз. Старая Река					
18.08.2009	1,3	0,907	0,723	1,1	1,4
оз. Луки					
18.08.2009	1,9	1,973	1,066	0,5	0,9
Левобережные пойменные старичные озера, расположенные вниз по течению р. Припяти					
оз. Плищин					
17.08.2010	2,7	2,976	1,083	0,3	0,9
21.07.2015	16,4	2,593	0,158	0,4	6,3
оз. Плесо					
21.07.2015	38,8	3,044	0,078	0,3	12,7
оз. Кривское					
21.07.2015	1,3	0,825	0,620	1,2	1,6
оз. Старица					
21.07.2015	2,7	1,457	0,545	0,7	1,8
оз. Старуха					
21.07.2015	19,5	2,623	0,135	0,4	7,4
оз. Протока Ров					
21.07.2015	1,2	0,981	0,848	1,0	1,2
Старичные озера высокой поймы и первой надпойменной террасы					
оз. Северское					
22.07.2015	2,2	21,853	9,753	0,0	0,1
оз. Карасино					
22.07.2015	2,3	4,265	1,832	0,2	0,5
оз. Любень					
22.07.2015	1,4	2,085	1,511	0,5	0,7
оз. Панское Карасино					
22.07.2015	3,3	3,088	0,930	0,3	1,1
оз. Подшибенное					
17.08.2010	2,0	2,002	0,996	0,5	1,0
оз. Теремшино					
21.07.2015	18,5	14,236	0,768	0,1	1,3

Окончание табл. 3
Ending table 3

Дата исследования	Нкл/Норг	Wорг · 10–6 мг	Wкл · 10–6 мг	Норг/В	Нкл/В
Реликтовые озера карстового происхождения					
оз. Межечевское					
20.08.2009	1,1	1,590	1,436	0,6	0,7
20.08.2009	0,00	0,000	0,000	0,0	0,0
оз. Пуповское					
22.07.2015	1,0	5,152	5,152	0,2	0,2

Во многих водоемах НП «Припятский» их фитопланктонные сообщества были представлены только одноклеточными организмами: в карстовых озерах – 100 %; в старицах, расположенных в поймах рек Свиновод и Припяти, – от 20 до 30 %; в старицах надпойменной террасы одноклеточные организмы не вегетировали. Наиболее «тяжелые» организмы находились в старицах надпойменной террасы – озерах Северском ($W_{\text{орг}} = 21,853 \cdot 10^{-6}$ мг), Теремшино ($14,236 \cdot 10^{-6}$ мг), Погной ($11,055 \cdot 10^{-6}$ мг), расположенной в пойме р. Припяти. Верхняя величина массы определялась массой клетки (организма) рафидофитовых водорослей (*G. semen*, *V. virescens*), обильно вегетировавших в оз. Северском и указанных выше для данных организмов водоемах. Изменение массы клетки в разных группах водных источников практически адекватно изменениям массы организма, за исключением стариц надпойменной террасы и карстовых озер, в которых наибольшая масса клетки оказалась не в старицах надпойменной террасы, как в случае со средней массой организма, а в карстовых озерах.

Уровень и особенности количественного развития фитопланктона озерных водоемов НП «Припятский» и его видовой состав, как и в случае с водотоками [1], можно охарактеризовать чрезвычайно высокой степенью их специфичности, что делает водные экосистемы парка особенно интересными и требующими большого внимания природоохранных организаций и ученых-исследователей.

Библиографические ссылки

1. Михеева Т. М., Свирид А. А., Лукьянова Е. В. Структура и количественное развитие фитопланктона водотоков Национального парка «Припятский» // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 77–85.
2. Углянец А. В., Власов Б. П., Хмелевский В. И. и др. Водные ресурсы Национального парка «Припятский» и их влияние на состояние лесных экосистем. Минск, 2006.
3. Власов Б. П., Архипенко Т. В., Рудаковский И. А. и др. Водные ресурсы Национального парка «Припятский»: справочник. Минск, 2011.
4. Блакітны скарб Беларусі: Рэкі, азёры, вадасховішчы, турысцкі патэнцыял водных аб'ектаў: энцыклапедыя. Мінск, 2007.
5. Природа Беларуси: энциклопедия: в 3 т. Минск, 2010. Т. 2: Климат и вода.
6. Реки и озера Беларуси [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://antfish.com/ponds/> (дата обращения: 25.01.2015).
7. Михеева Т. М., Свирид А. А., Хурсевич Г. К. и др. Водоросли планктона водоемов и водотоков Национального парка «Припятский» / под ред. Т. М. Михеевой. Минск, 2016.
8. Михеева Т. М. Методы количественного учета нанофитопланктона (обзор) // Гидробиол. журн. 1989. Т. 25, № 4. С. 3–22.
9. Михеева Т. М., Лукьянова Е. В. Инвазия чужеродных видов водорослей и новые для флоры Беларуси виды, обнаруженные в водоемах Национального парка «Припятский» // Современное состояние, тенденции развития, рациональное использование и сохранение биологического разнообразия растительного мира: материалы Междунар. науч. конф. (Минск – Нарочь, 23–26 сент. 2014 г.) / редкол.: А. В. Пугачевский (гл. ред.) [и др.]. Минск, 2014. С. 108–111.
10. Михеева Т. М., Лукьянова Е. В., Свирид А. А. Современное таксономическое разнообразие фитопланктона водоемов и водотоков Национального парка «Припятский» // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2015. № 2. С. 40–46.
11. Михеева Т. М. Отношение численности к биомассе фитопланктона как возможный показатель эвтрофирования вод // Антропогенное эвтрофирование природных вод: тез. докл. III Всесоюз. симпози. (Москва, сентябрь 1983 г.). Черноголовка, 1983. С. 69–72.

References

1. Mikheeva T. M., Svirid A. A., Lukyanova E. V. Structure and quantitative phytoplankton development in watercourses of the National Park «Pripyatsky». *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 77–85 (in Russ.).
2. Uglyanets A. V., Vlasov B. P., Khmelevsky V. I., et al. Water Resources of the National Park «Pripyatsky» and their influence on the state of forest ecosystems. Minsk, 2006 (in Russ.).
3. Vlasov B. P., Arkhipenko T. V., Rudakovskiy I. A., et al. Water Resources of the National Park «Pripyatsky»: the handbook. Minsk, 2011 (in Russ.).
4. Blue treasure of Belarus: Rivers, lakes, reservoirs, tourism potential of water bodies: encyclopedia. Minsk, 2007 (in Belarus.).

5. Priroda Belarusi [The Nature of Belarus] : encyclopedia : in 3 vol. Minsk, 2010. Vol. 2 : Climate and Water (in Russ.).
6. Reki i ozera Belarusi [Rivers and Lakes of Belarus] [Electronic resource]. URL: <http://antfish.com/ponds/> (date of access: 25.01.2015) (in Russ.).
7. Mikheyeva T. M., Svirid A. A., Khursevich G. K., et al. Vodorosli planktona vodoemov i vodotokov Natsional'nogo parka «Pripyatskii» [Algae of plankton of water bodies and watercourses of the National Park «Pripyatskyi»]. Minsk, 2016 (in Russ.).
8. Mikheeva T. M. Metody kolichestvennogo ucheta nanofitoplanktona (obzor) [The methods of quantitative registration of nanophytoplankton (review)]. *Hydrobiol. J.* 1989. Vol. 25, No. 4. P. 3–22 (in Russ.).
9. Mikheeva T. M., Lukyanova E. V. Invaziya chuzherodnykh vidov vodoroslei i novye dlya flory Belarusi vidy, obnaruzhennyye v vodoemakh Natsional'nogo parka «Pripyatskii» [Invasion of alien species of algae and the new for Belarus flora species which were revealed in water bodies of National Park «Pripyatskyi»]. *Sovremennoye sostoyanie, tendentsii razvitiya, racional'noe ispolzovanie i sohraneniye biologicheskogo raznoobraziya rastitel'nogo mira* : materialy Mezhdunar. nauchn. konf. (Minsk – Naroch, 23–26 Sept., 2014). Minsk, 2014. P. 108–111 (in Russ.).
10. Mikheeva T. M., Lukyanova E. V., Svirid A. A. Sovremennoye taksonomicheskoye raznoobrazie fitoplanktona vodoemov i vodotokov Natsional'nogo parka «Pripyatskii» [Current state of phytoplankton taxonomic diversity in water bodies and watercourses of National Park «Pripyatskyi»]. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2015. No. 2. P. 40–46 (in Russ.).
11. Mikheeva T. M. Otnosheniye chislennosti k biomasse fitoplanktona kak vozmozhnyy pokazatel' evtrofirovaniya vod [Ratio of abundance to biomass of phytoplankton as a possible indicator of water eutrophication]. *Antropogennoye evtrofirovaniye prirodnokh vod* : tez. dokl. III Vses. simp. (Moscow, Sept., 1983). Chernogolovka, 1983. P. 69–72 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 09.01.2017.
Received by editorial board 09.01.2017.

СИСТЕМАТИКА

TAXONOMY

УДК 583.669.25(477)

СРАВНИТЕЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *DIANTHUS SUPERBUS* L. И *DIANTHUS STENOCALYX* JUZ. И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИХ ВО ФЛОРЕ БЕЛАРУСИ

Т. А. САУТКИНА¹⁾, А. И. ПАЦЕВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Отмечено, что до настоящего времени нет единого мнения о номенклатурном статусе *Dianthus superbis* L. и *Dianthus stenocalyx* Juz. Приведено морфологическое описание, краткие сведения о таксономии, экологии и фитоценологии видов. Уточнены морфологические особенности вегетативных органов *Dianthus superbis* L. и *Dianthus stenocalyx* Juz. Статистически показаны различия в строении чашечек цветков. Уточнена форма цельной части лепестков, указано, что этот признак является таксономически значимым. Впервые на основании гербарных материалов составлены точечные карты местонахождения этих видов на территории республики. Оба вида гвоздики в Беларуси нуждаются в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: *Dianthus superbis* L.; *Dianthus stenocalyx* Juz.; вегетативные органы; чашечка; лепесток; местонахождение; точечные карты.

Образец цитирования:

Сауткина Т. А., Пацевич А. И. Сравнительно-морфологическая характеристика *Dianthus superbis* L. и *Dianthus stenocalyx* Juz. и распространение их во флоре Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 98–105.

For citation:

Sautkina T. A., Patceovich A. I. Comparative morphological characteristic of *Dianthus superbis* L. and *Dianthus stenocalyx* Juz. and their expansion in the flora of Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 98–105 (in Russ.).

Авторы:

Тамара Александровна Сауткина – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.
Ангелина Игоревна Пацевич – студентка биологического факультета.

Authors:

Tamara Sautkina, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
tamara.sautkina.bsu@gmail.com
Angelina Patceovich, student at the faculty of biology.
angelina.pacevich@gmail.com

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC
OF *DIANTHUS SUPERBUS* L. AND *DIANTHUS STENOCLALYX* JUZ.
AND THEIR EXPANSION IN THE FLORA OF BELARUST. A. SAUTKINA^a, A. I. PATCEVICH^a^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: tamara.sautkina.bsu@gmail.com

Up to the present there were no consensus on the generic term of these *Dianthus superbis* L. and *Dianthus stenocalyx* Juz. Brief taxonomic account, morphological description, as well as data concerning the distribution, ecology and phytocoenology of this species are provided. Morphological traits of vegetative organs of *Dianthus superbis* L. and *Dianthus stenocalyx* Juz. were clarified. The differences in the organization of flower calyx were presented statistically. The form of the whole part of petals was corrected, and this characteristic was specified to be taxonomically significant. For the first time on the basis of the herbarium materials the dot maps of the locations of these species were made. Both of taxons carnation are regarded as taxonomically significant.

Key words: *Dianthus superbis* L.; *Dianthus stenocalyx* Juz.; vegetative organs; cup; petal; location; dot maps.

Введение

Среди видов секции Fimbriati (Boiss.) F. Williams подрода *Dianthus* рода *Dianthus* L. (семейство Caryophyllaceae) несомненного внимания заслуживают такие, как *Dianthus superbis* L. – гвоздика пышная и *Dianthus stenocalyx* Juz. – гвоздика узкокашечная.

Dianthus superbis L. был описан с территории Швеции К. Линнеем в 1755 г. [1, с. 294; 2]. Тип: Скандинавия и Северная Европа, лектотип: 581.21 – LINN (Jonsell, Jarvis, 1994, Nordic J. Bot. 14, 2: 157).

Dianthus stenocalyx Juz. законно обнародован С. В. Юзефчуком гораздо позже – в 1925 г. [3]. Вид описан по подлинным материалам Э. Р. Траутфеттера, собранным им в Черниговской, Орловской и Курской губерниях. В качестве типа указывается южная Россия.

В 1932 г. Ю. Д. Клеопов понизил ранг *Dianthus stenocalyx* Juz. до подвида, включив его в состав *Dianthus superbis* L. как *Dianthus superbis* L. subsp. *stenocalyx* (Juz.) Kleop. В [1, с. 294; 4; 5] эти два вида указывались как самостоятельные или приводился только один из них. Некоторые авторы вообще рассматривали *Dianthus stenocalyx* Juz. в качестве синонима *Dianthus superbis* L. [6; 7].

Таким образом, по литературным данным, до настоящего времени единого мнения о номенклатурном статусе этих таксонов нет. Если одни авторы указывают, что существует только один вид – *Dianthus superbis* L. [6; 8; 9], то другие наряду с ним приводят также и *Dianthus stenocalyx* Juz. [4; 5; 10].

В 2004 г. М. Л. Кузьмина лектотипифицировала *Dianthus stenocalyx* Juz. [1]. Лектотип выбран из hoc loco «Kiew. 19. VII. 1853. Trautvetter, № 13» и хранится в LE – Гербарии Ботанического института имени В. Л. Комарова Российской академии наук. Этот вид был также лектотипифицирован украинскими ботаниками [11].

Во всех научных работах Беларуси *Dianthus superbis* L. и *D. stenocalyx* Juz. приводятся как самостоятельные виды [12; 13; 14], однако признаки указываются нечеткие, что затрудняет идентификацию видов и часто приводит к путанице.

Материал и методы исследования

Кроме собственных сборов, в работе были использованы материалы Гербария Белорусского государственного университета (MSKU), Гербария Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (MSK), Гербария Гомельского государственного университета имени Франциска Скорины, а также личные сборы кандидата биологических наук доцента кафедры ботаники биологического факультета БГУ М. А. Джуса. Всего было критически обработано около 150 гербарных листов *D. superbis* L. и *D. stenocalyx* Juz.

Камеральная обработка материалов выполнялась на кафедре ботаники БГУ и в лаборатории флоры и гербария Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси. При критическом систематическом анализе материалов использовался стереоскопический микроскоп Stemi 2000 фирмы Zeiss (Германия). Идентификация материала проводилась по различным источникам [1; 12; 14; 16].

Поскольку признаки вегетативных частей растений *D. superbis* L. и *D. stenocalyx* Juz. сходны, при сравнительно-морфологическом изучении этих видов прежде всего обращалось внимание на ширину чашечек в основании и верхней части, длину и окраску чашечек, так как эти признаки указываются для

данных таксонов как таксономически значимые [1, с. 275; 12; 14; 16]. Для измерения использовались чашечки хорошо распустившихся цветков. Полученные нами данные были обработаны методом вариационных рядов [17, с. 9–10, 31–32]. Величина выборок во всех случаях варьировала в пределах 30–50 шт.

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологическая обработка гербарного материала, проведенная нами, показала, что *D. superbis* L. и *D. stenocalyx* Juz. действительно обладают некоторым морфологическим сходством. Это многолетние растения со шнуровидным корневищем, от которого отходят цветоносные прямостоячие или приподнимающиеся голые побеги [1, с. 275; 2; 3; 15]. Кроме цветоносных побегов, у *D. superbis* L. и *D. stenocalyx* Juz. имеются также укороченные бесплодные побеги (рис. 1, а, б), однако часто при сборе материала они обламываются или к моменту отцветания растений засыхают.

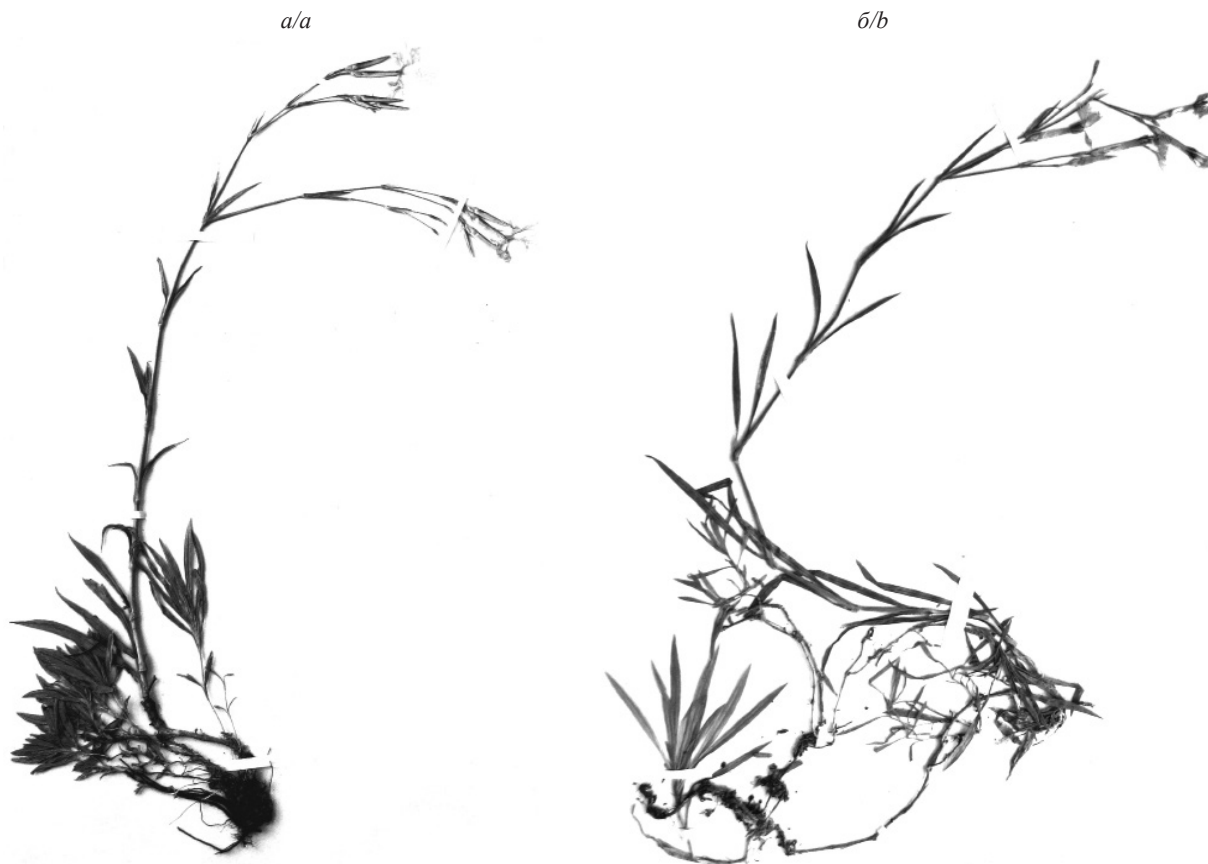


Рис. 1. Внешний вид *D. superbis* L. (а) и *D. stenocalyx* Juz. (б)
Fig. 1. The appearance of *D. superbis* L. (a) and *D. stenocalyx* Juz. (b)

Стебли обоих видов, как видно из рис. 1, хорошо облиственные, листовые пластинки линейные или линейно-ланцетные, однако длина и ширина их у гвоздики пышной и гвоздики узкочашечной различные.

Цветки на довольно длинных цветоножках. Лепестки розовые, розово-пурпурные или пурпурные, сильно рассеченные, на внутренней стороне с бородкой волосков.

Признаки, приведенные в научной литературе [15; 18] и сгруппированные нами в табл. 1 и 2, по которым можно отличить *D. stenocalyx* Juz. от *D. superbis* L., у обоих видов очень близки (длина и ширина листа, форма чашечки) или практически не отличаются (форма листовых пластинок, строение цветоносов). Метрические показатели статистически не обработаны, что вызывает сомнение в правомерности их использования в качестве таксономически значимых.

Нами был изучен ряд гербарных образцов в целях выявления достоверных различий между *D. superbis* L. и *D. stenocalyx* Juz. и проведена статистическая обработка материала. Поскольку существенным отличием *D. stenocalyx* от *D. superbis* является строение чашечки цветка, при обработке гербарного материала прежде всего обращалось внимание на длину чашечек, а также ширину их в верхней и нижней частях (табл. 3).

Таблица 1

Сравнительная характеристика *D. stenocalyx* Juz. и *D. superbus* L. (по данным [15])

Table 1

Comparative characteristic of *D. stenocalyx* Juz. and *D. superbus* L. (in the [15])

Признак	<i>D. superbus</i> L.	<i>D. stenocalyx</i> Juz.
Высота стебля, см	15–60	40–90
Особенности верхней части цветоносов	Немного ветвистые или простые	Ветвистые
Форма листовых пластинок	Линейно-ланцетовидные или линейные	Линейно-ланцетовидные
Длина листа, см	4,0–8,5	6–9
Ширина листа, мм	2,0–8,5	2–6
Количество цветков на стебле	1–9	6–10
Длина чашечки, мм	15–23	20–25
Ширина чашечки, мм	4–5	3
Форма чашечки	Цилиндрическая, к верхушке чуть суженная	Цилиндрическая, к верхушке заметно суженная
Окраска чашечки	Фиолетовая	Бледно-зеленая или слегка пурпурная
Окраска лепестков	Розовая, белая или пурпурная	Светло-розовая, часто почти белая

Таблица 2

Сравнительная характеристика *D. stenocalyx* Juz. и *D. superbus* L. (по данным [18])

Table 2

Comparative characteristic of *D. stenocalyx* Juz. and *D. superbus* L. (in the [18])

Признак	<i>D. stenocalyx</i> Juz.	<i>D. superbus</i> L.
Длина чашечки, мм	20–25	15–30
Ширина чашечки, мм	3	4–6
Окраска чашечки	Зеленая, иногда багряная	Пурпурная или фиолетовая
Длина отгиба лепестка, мм	30	20

Таблица 3

Морфометрическая характеристика чашечек у *D. stenocalyx* Juz. и *D. superbus* L.

Table 3

The morphological characteristic of the *D. stenocalyx* Juz. and *D. superbus* L. calyx

Вид	Величина выборки, экз.	Длина чашечки, мм, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Ширина чашечки в нижней части, мм, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Ширина чашечки в верхней части, мм, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
<i>D. superbus</i>	50	$26,16 \pm 0,338$	$3,58 \pm 0,058$	$3,51 \pm 0,045$
<i>D. stenocalyx</i>	50	$24,82 \pm 0,334$	$3,02 \pm 0,064$	$2,53 \pm 0,065$

D. superbus, по сравнению с *D. stenocalyx*, как видно из табл. 3, имеет более длинную чашечку. Такие различия указаны и в литературе, но метрические показатели, приводимые в разных источниках и полученные нами, существенно и достоверно различаются.

Ширина чашечки в основании у обоих видов практически одинаковая (см. табл. 3), однако в верхней части у *D. superbus* она практически такая, как в нижней. У *D. stenocalyx* чашечка к верхушке значительно сужается. Эти данные совпадают с теми, которые приводятся в литературе, но нами они доказаны статистически.

Согласно нашим наблюдениям резкой разницы в окраске чашечек нет, она не является устойчивым признаком и довольно сильно варьирует. Как среди *D. stenocalyx* Juz., так и среди *D. superbis* L. встречаются экземпляры и с зелеными, и с пурпурными чашечками. Мы полагаем, что интенсивность окраски чашечек может зависеть от степени освещенности мест произрастания обоих видов. Это предположение практически подтверждается данными гербарных материалов, на этикетках которых указаны конкретные местообитания *D. superbis* и *D. stenocalyx*. У особей, растущих на более открытых местах, чашечки окрашены интенсивнее, чем у особей, произрастающих на затененных участках.

Существенно различается у *D. superbis* и *D. stenocalyx* строение отгиба лепестков венчика (см. рис. 2, а, б). У обоих видов лепестки венчика расчленены на узкие нитевидные доли, причем расчленение не доходит до середины пластинки лепестка. Как показали наши наблюдения, цельные части пластинки лепестка у *D. superbis* и *D. stenocalyx* различаются по форме: у *D. superbis* цельная часть пластинки широкая, обратнойцевидная (в литературе указывается продолговатая) (см. рис. 2, а), а у *D. stenocalyx* – продолговато-эллиптическая (см. рис. 2, б). Мы считаем, что этот признак является таксономически значимым и может наряду с другими использоваться при идентификации данных видов.



Рис. 2. Лепестки цветков *D. superbis* L. (а) и *D. stenocalyx* Juz. (б)

Fig. 2. Carnation *D. superbis* L. (a) and *D. stenocalyx* Juz. (b) petals

Согласно литературным источникам *D. superbis* L. имеет обширный ареал и распространена в северной части Евразии, Скандинавских странах, Центральной Европе, Монголии. В отличие от *D. superbis* L. *D. stenocalyx* Juz. является эндемиком европейской части бывшего СССР [1, с. 294; 15; 16].

В пределах своего обширного ареала *D. superbis* L. произрастает в равнинных и горных тундрах субгольцового пояса, на горных лугах и в редколесьях, по галечникам вдоль рек, приморским дюнам, разреженным борам, редко – на лугах и в низинных болотах (чаще – в местах выходов известняков). *D. stenocalyx* Juz. встречается в разреженных борах и дубравах, на пойменных лугах и по травяным участкам вдоль рек, иногда в зарослях кустарников [1, с. 294; 12; 14; 19].

Для флоры Беларуси указывается, что оба вида распространены в южной и юго-западной частях республики, причем *D. superbis* L. также произрастает на западе, реже встречается в центральной и восточной областях, а кроме того, имеются литературные данные, что вид регистрировался в северных регионах республики [2; 12].

На основании гербарных материалов нами впервые были составлены точечные карты местонахождения этих видов на территории Беларуси, что позволяет судить об их хорологических особенностях (рис. 3 и 4).

D. superbis L., как видно из рис. 3, имеет достаточно обширный ареал. Вид встречается не только на юге, но и в центральной, и западной частях Беларуси. В Гербарии Ж. Э. Жилибера (KW) хранится экземпляр из окрестностей г. Гродно [20]. Граница ареала этого вида в Беларуси очень четко очерчена, что свидетельствует о том, что в республике он находится на северо-западном пределе распространения.

Согласно нашим картографическим данным (см. рис. 4) *D. stenocalyx* Juz. распространена преимущественно на юге республики, в Брестской и Гомельской областях, и только единичные образцы

известны из юго-западной части Гродненской и Минской областей. Таким образом, в Беларуси проходит северная граница распространения этого вида.

Фитоценотическая приуроченность видов на территории республики сходная. Они встречаются в широколиственных и смешанных лесах, по опушкам сосняков, на лесных полянах. *D. superbis* отмечена также на суходольных и пойменных лугах.



Рис. 3. Местонахождение *D. superbis* L. на территории Беларуси

Fig. 3. Location *D. superbis* L. (in the flora of Belarus)



Рис. 4. Местонахождение *D. stenocalyx* Juz. на территории Беларуси

Fig. 4. Location *D. stenocalyx* Juz. (in the flora of Belarus)

Заключение

Таким образом, документально подтвержденные гербарными материалами данные свидетельствуют о том, что *D. superbus* L. и *D. stenocalyx* Juz. следует рассматривать как достаточно редкие для флоры Беларуси виды, приуроченные к южным и юго-западным частям республики.

Библиографические ссылки

1. Кузьмина М. Л. Гвоздика – *Dianthus* L. // Флора Восточной Европы : в XI т. М. ; СПб., 2004. Т. XI. С. 273, 280–297.
2. Шишкин Б. К. Гвоздика – *Dianthus* L. // Флора БССР : в 5 т. Минск, 1949. Т. 2. С. 270–276.
3. Юзепчук С. В. К флоре Полесья // Зап. Белорус. гос. ин-та сельского и лесного хоз-ва. Минск, 1925. Вып. 4. С. 212.
4. Клоков М. В. Флора УРСР : в 5 т. Киев, 1952. Т. 4. С. 507–513.
5. Зиман С. Н. Гвоздика – *Dianthus* L. // Определитель высших растений Украины / под ред. Д. Н. Доброчаева [и др.]. Киев, 1987. С. 79–83.
6. Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С. и др. *Dianthus* L. – Гвоздика // Определитель сосудистых растений. М., 1995. С. 253–255.
7. Лукаш А. В., Андоненко Т. Л. Редкие и охраняемые растения Полесья (Польша, Беларусь, Украина, Россия). Киев, 2011. С. 67–68.
8. Федорончук М. М. Нові таксони в системі роду *Dianthus* L. (Caryophyllaceae) та критичний огляд деяких його видових комплексів // Укр. бот. журн. 1998. Т. 55, № 1. С. 21–25.
9. Tutin G., Walters M. *Dianthus* L. // Flora Europaea. Vol. 1. Psilotaceae to Plantaginaceae. Cambridge, 1996. P. 227–246.
10. Станков С. С., Талиев В. И. *Dianthus* L. – Гвоздика // Определитель высших растений европейской части СССР. М., 1957. С. 134–186.
11. Крицька Л. І., Федорончук М. М., Царенко О. М. и др. Типіфікація видів судинних рослин, описаних з України: родина *Caryophyllaceae* Juss. (підродина *Silenoideae* A. Br.). // Укр. бот. журн. 1999. Т. 56, № 4. С. 402–410.
12. Млынчик М. П. *Dianthus* L. – Гвоздика // Определитель высших растений Беларуси. Минск, 1999. С. 79–80.
13. Парфенов В. И. Флора Белорусского Полесья (современное состояние и тенденции развития). Минск, 1983. С. 250.
14. Протасевич Р. Т. *Dianthus* L. – Гвоздика // Определитель растений Беларуси. Минск, 1967. С. 263–266.
15. Шишкин Б. К. Гвоздика – *Dianthus* L. // Флора СССР : в XXX т. М. ; Л., 1936. Т. VI. С. 803–861.
16. Федорончук М. М. Рід *Dianthus* L. (Caryophyllaceae) флори України: підрід *Dianthus*, секція *Dianthus*, секція *Fimbriatum* F. Williams // Укр. бот. журн. 1998. Т. 55, № 5. С. 519–523.
17. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973.
18. Tutin G., Walters M. *Dianthus* L. // Flora Europaea. Vol. 1. Psilotaceae to Plantaginaceae. Cambridge, 1996. P. 227–246.
19. Князев М. С. *Dianthus* L. – Гвоздика // Конспект флоры Восточной Европы. М. ; СПб., 2012. Т. 1. С. 255–265.
20. Шумилова А. В., Федорончук Н. С. Гербарий И. К. Бойко. Киев, 2013. С. 62.

References

1. Kuzmina M. L. Gvozdika – *Dianthus* L. *Flora Vostochnoy Evropy* : in XI vol. Moscow ; Saint Petersburg, 2004. Vol. XI. P. 273, 280–297 (in Russ.).
2. Shishkin B. K. Gvozdika – *Dianthus* L. *Flora BSSR* : in 5 vol. Minsk, 1949. Vol. 2. P. 270–276 (in Russ.).
3. Yuzepchuk S. V. K flore Polessya. *Zap. Beloruss. gos. inst. selsk. i lesn. hoz.* Minsk, 1995. Issue 4. P. 212 (in Russ.).
4. Klovov M. V. Flora URSR : in 5 vol. Kiev, 1952. Vol. 4. P. 507–513 (in Russ.).
5. Ziman S. N. Gvozdika – *Dianthus* L. *Opredelitel' vysshih rasteniy Ukrainy*. Kiev, 1987. P. 79–83 (in Russ.).
6. Gubanov I. A., Kiseleva K. V., Novikov V. S., et al. *Dianthus* L. – Gvozdika. *Opredelitel' sosudistyh rasteniy*. Moscow, 1995. P. 253–255 (in Russ.).
7. Lukash A. V., Andonenko T. L. Redkiye i ohranyayemyye rasteniya Polessya (Polsha, Belarus, Ukraina, Rossiya). Kiev, 2011. P. 67–68 (in Russ.).
8. Fedoronchuk M. M. Novi taksoni v sistemi rodu *Dianthus* L. (Caryophyllaceae) ta kritichnyi oglyad deyakikh yogo vidovih kompleksiv. *Ukrainian Bot. J.* 1998. Vol. 55, No. 1. P. 21–25 (in Ukrainian).
9. Tutin G., Walters M. *Dianthus* L. *Flora Europaea*. Vol. 1. Psilotaceae to Plantaginaceae. Cambridge, 1996. P. 227–246.
10. Stankov S. S., Taliyev V. I. *Dianthus* L. – Gvozdika. *Opredelitel' vysshih rasteniy evropeyskoy chasti SSSR*. Moscow, 1957. P. 134–186 (in Russ.).
11. Kritska L. I., Fedoronchuk M. M., Tsarenko O. M., et al. Tipifikatsiya vidiv sudinnykh roslin, opisanikh z Ukraini: rodina *Caryophyllaceae* Juss. (pidrodina *Silenoideae* A. Br.). *Ukrainian Bot. J.* 1999. Vol. 56, No. 4. P. 402–410 (in Ukrainian).
12. Mlynarchik M. P. *Dianthus* L. – Gvozdika. *Opredelitel' vysshih rasteniy Belarusi*. Minsk, 1999. P. 79–80 (in Russ.).
13. Parfenov V. I. Flora Belorusskogo Polessya (sovremennoye sostoyaniye i tendentsii razvitiya). Minsk, 1983. P. 250 (in Russ.).
14. Protasevich R. T. *Dianthus* L. – Gvozdika. *Opredelitel' rasteniy Belarusi*. Minsk, 1967. P. 263–266 (in Russ.).
15. Shishkin B. K. Gvozdika – *Dianthus* L. *Flora SSSR* : in XXX vol. Moscow ; Leningrad, 1936. Vol. VI. P. 803–861 (in Russ.).
16. Fedoronchuk M. M. Rїd *Dianthus* L. (Caryophyllaceae) flori Ukraini: pidrid *Dianthus*, sektsiya *Dianthus*, sektsiya *Fimbriatum* F. Williams. *Ukrainian Bot. J.* 1998. Vol. 55, No. 5. P. 519–523 (in Ukrainian).
17. Rokitskiy P. F. Biologicheskaya statistika. Minsk, 1973 (in Russ.).
18. Tutin G., Walters M. *Dianthus* L. *Flora Europaea*. Vol. 1. Psilotaceae to Plantaginaceae. Cambridge, 1996. P. 227–246 (in Russ.).
19. Knyazev M. S. *Dianthus* L. – Gvozdika. *Konspekt flory Vostochnoy Yevropy*. Moscow ; Saint Petersburg, 2012. Vol. 1. P. 255–265 (in Russ.).
20. Shumilova A. V., Fedoronchuk N. S. Gerbariy I. K. Boyko. Kiev, 2013. P. 62 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 29.12.2016.
Received by editorial board 29.12.2016.

УДК 582.661.21(476)

**ТЕЛОКСИС ОСТИСТАЯ (*TELOXYS ARISTATA* (L.) MOQ.,
AMARANTHACEAE JUSS.) – НОВЫЕ АДВЕНТИВНЫЕ
РОД И ВИД ДЛЯ ФЛОРЫ БЕЛАРУСИ****М. А. ДЖУС¹⁾**¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Приведена краткая характеристика нового для флоры Беларуси чужеродного вида – *Teloxys aristata* (L.) Moq. (Amaranthaceae). *Teloxys aristata* – однолетник центральноазиатского происхождения, спорадически встречающийся в качестве заносного растения в странах Европы, Восточной Азии и Северной Америки, где его ареал постепенно расширяется. Данные род и вид впервые указаны для флоры Беларуси. В результате исследования гербарных материалов установлено, что в единственном в республике локалитете этот заносный вид-эфемерофит был собран в 2001 г. на железнодорожном полотне вблизи станции Лида (Гродненская область, северо-западная часть Беларуси). Новое местонахождение уточняет характер распространения вида в Европе и дополняет таксономический список семейства Amaranthaceae во флоре Беларуси.

Ключевые слова: Amaranthaceae; *Teloxys aristata*; *Chenopodium aristatum*; *Dysphania aristata*; новое местонахождение; распространение; Беларусь.

**WORMSEED (*TELOXYS ARISTATA* (L.) MOQ., AMARANTHACEAE JUSS.) –
NEW ALIEN GENUS AND SPECIES FOR BELARUSIAN FLORA****М. А. DZHUS^a**^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

New alien species for the Belarusian flora – *Teloxys aristata* (L.) Moq. (Amaranthaceae) is briefly characterized in the article. *Teloxys aristata* – is an annual species of Central Asian origin, occurring sporadically as alien weed in Europe, East Asia and North America and continuously increasing in distribution. This genus and species are reported for the first time from Belarus. Revision of herbarium specimens revealed that it was first collected in 2001 as casual immigrant on the tracks near the railway station Lida (Grodno District, NW Belarus). The new locality corrects the total range of this species in Europe and completes taxonomical list of Amaranthaceae family in Belarusian flora.

Key words: Amaranthaceae; *Teloxys aristata*; *Chenopodium aristatum*; *Dysphania aristata*; new locality; distribution; Belarus.

В ходе научной обработки гербарного материала рода *Chenopodium* L. s. l. нами был обнаружен новый для флоры Беларуси адвентивный вид – Телоксис остистая (*Teloxys aristata* (L.) Moq.). Представители указанного рода для флоры республики ранее не отмечались.

Образец цитирования:

Джус М. А. Телоксис остистая (*Teloxys aristata* (L.) Moq., Amaranthaceae Juss.) – новые адвентивные род и вид для флоры Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 105–110.

For citation:

Dzhus M. A. Wormseed (*Teloxys aristata* (L.) Moq., Amaranthaceae Juss.) – new alien genus and species for Belarusian flora. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 105–110 (in Russ.).

Автор:

Максим Анатольевич Джус – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Author:

Maxim Dzhus, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
dzhus_maxim@mail.ru

Материалы и методы исследований

Полевые флористические исследования проводились маршрутным методом в августе 2001 г. Собранный материал определялся с помощью диагностических ключей и рисунков, имеющихся в литературе, посвященной систематическому изучению рода *Chenopodium* L. s. l. [1; 2]. Полученный гербарный материал хранится в Гербарии кафедры ботаники БГУ (MSKU).

Результаты исследований и их обсуждение

В настоящее время объем рода Марь (*Chenopodium* L. s. l.), насчитывающего, по разным оценкам, от 150 до 250 видов, коренным образом пересматривается. Согласно полученным молекулярно-генетическим данным из состава рода выделены несколько родов, отдельные из которых (*Blitum* L., *Chenopodiastrum* S. Fuentes, *Uotila* et Borsch, *Dysphania* R. Br., *Lipandra* Moq., *Oxybasis* Kar. et Kir.) встречаются также и во флоре Беларуси. Собственно к роду *Chenopodium* L. s. str. из видов, отмеченных в республике, относятся большинство представителей типовой секции (*C. album* L., *C. acerifolium* Andrzej., *C. suecicum* J. Murr., *C. vulvaria* L., *C. pratericola* Rydb., *C. strictum* Roth, *C. striatiforme* Murr., *C. opulifolium* Schrad. ex DC, *C. pedunculare* Bertol. и др.), за исключением *Chenopodiastrum murale* (L.) S. Fuentes, *Uotila* et Borsch (= *Chenopodium murale* L.), *Chenopodiastrum hybridum* (L.) S. Fuentes, *Uotila* et Borsch (= *Chenopodium hybridum* L.) и *Lipandra polysperma* (L.) S. Fuentes, *Uotila* et Borsch (= *Chenopodium polyspermum* L.). Из рода *Blitum* L. (Жминда) в Беларуси отмечены *B. capitatum* L. (= *Chenopodium capitatum* (L.) Ambrosi), *B. bonus-henricus* (L.) C. A. Mey. (= *Chenopodium bonus-henricus* L.), *B. rubrum* (L.) Rchb. (= *Chenopodium rubrum* L.), *B. urbicum* (L.) Mosyakin (= *Chenopodium urbicum* L.), *B. virgatum* L. (= *Chenopodium foliosum* Asch.). Некоторые виды из состава рода *Blitum* сравнительно недавно были отнесены к роду *Oxybasis* Kar. et Kir. (например, *Oxybasis glauca* (L.) S. Fuentes, *Uotila* et Borsch, *O. rubra* (L.) S. Fuentes, *Uotila* et Borsch и *O. urbica* (L.) S. Fuentes, *Uotila* et Borsch) [3–9].

В Беларуси большинство указанных видов (как и сравнительно недавно обнаруженная нами *Dysphania pumilio* (R. Br.) Mosyakin et Clemants) являются непреднамеренно занесенными растениями (ксенофитами). Преимущественно в 1940-х и 1970-х гг. в экспериментальных посадках Ботанического сада БГУ и Центрального ботанического сада НАН Беларуси выращивались некоторые хозяйственно полезные виды марей – *Dysphania multifida* (L.) Mosyakin et Clemants, *D. schraderiana* (Schult.) Mosyakin et Clemants, *D. ambrosioides* (L.) Mosyakin et Clemants и *Chenopodium quinoa* Willd. (с 1935 г.), *Dysphania botrys* (L.) Mosyakin et Clemants (с 1938 г.), *Chenopodium giganteum* D. Don (с 1953 г.), *Dysphania anthelmintica* (L.) Mosyakin et Clemants (с 1961 г.), *Chenopodium suecicum* и *Blitum capitatum* (с 1975 г.). Некоторые из них (*Chenopodium suecicum*, *Dysphania botrys*, *Blitum capitatum*, особенно *Dysphania schraderiana*) способны к дичанию и встречаются как сорные растения вблизи мест их культивирования, а также в различных рудеральных местообитаниях (прежде всего вблизи дорог, на полигонах твердых бытовых отходов и несанкционированных свалках мусора). Таким образом, по нашим данным, на территории Беларуси отмечено произрастание 30 видов (без учета межвидовых гибридов), относящихся к шести родам. В [10] приведены 16 видов марей (все – в составе рода *Chenopodium*), информация о многих указанных выше видах автором обработки учтена не была.

Поскольку представители рода *Teloxys* ранее не указывались для флоры Беларуси, здесь приведено краткое морфологическое описание, основные диагностические признаки и синонимика данных таксонов:

Teloxys Moq. 1834, Ann. Sci. Nat. Bot., sér. 2, 1: 289. – *Chenopodium* L. sect. *Teloxys* (Moq.) Beck, 1908, Icon. Fl. Germ. Helv., 24: 116. – *Chenopodium* L. sect. *Botryoides* C. A. Mey. subsect. *Teloxys* (Moq.) Aell. et Pjin, 1936, Флора СССР, 6: 47. – *Dysphania* R. Br. sect. *Botryoides* (C. A. Mey.) Mosyakin et Clemants subsect. *Teloxys* (Moq.) Mosyakin et Clemants, 2002, Укр. бот. журн., 59, 4: 383. Тип: *Teloxys aristata* (L.) Moq.

Род включает однолетние, почти голые, травянистые, сильно ветвящиеся растения, лишенные запаха, листья линейные или продолговато-линейные, цельные и часто цельнокрайные, цветки обычно собраны в дихазальное соцветие, боковые ветви которого преобразованы в остевидные колючки. Цветки обычно обоеполые, 5-членные, листочки околоцветника сросшиеся лишь у основания, при плодах часто отогнутые и краснеющие. Тычинок – 5, рылец – 2. Семена линзовидные или округлые, по краю с выступающей оторочкой. Зародыш семени обычно горизонтально расположенный. Близкими в систематическом отношении к роду *Teloxys* являются представители монотипных североамериканских родов *Cycloloma* Moq. и *Suckleya* A. Gray., однако наибольшее сходство *Teloxys* имеет с видами рода *Dysphania* R. Br. Для многих из них предложены номенклатурные комбинации как в составе одного, так и другого рода [1; 5; 8; 11; 12]. Целесообразность выделения указанных родов подтверждена в последнее время и молекулярными исследованиями [3].

Род *Teloxys* является, вероятно, монотипным и включает один полиморфный, преимущественно центральноазиатский, вид *Teloxys aristata* (L.) Moq., в пределах которого иногда выделяют несколько

видов и внутривидовых таксонов, отличающихся по степени выраженности колючек, опушения и размерам [1; 12]. Их таксономический статус требует дальнейшего изучения. Так, оказалось, что *Chenopodium tibeticum* A. J. Li, нередко рассматриваемый как синоним *Teloxys aristata*, является «хорошим» видом, который по комплексу признаков, однако, целесообразно рассматривать в составе рода *Dysphania*. Для него сравнительно недавно была предложена соответствующая комбинация – *Dysphania tibetica* (A. J. Li) Uotila [9]:

Teloxys aristata (L.) Moq. 1834, Ann. Sci. Nat. Bot., sér. 2, 1: 289. – *Chenopodium aristatum* L. 1753, Sp. Pl., 1: 221. – *Atriplex aristata* (L.) Crantz, 1766, Inst. Rei Herb. 1: 208. – *Lecanocarpus aristatus* (L.) Zucc., 1829, Hort. Monac.: 56. – *Dysphania aristata* (L.) Mosyakin et Clemants, 2002, Укр. бот. журн., 59, 4: 383. – Телоксис остистая.

Описан с территории Сибири (по протологу *Habitat in Sibiria*). Лектотип «21, aristatum» (LINN, фото (<http://linnean-online.org/3149>), лист № 313.24, выбран в 2012 г. D. Iamónico, C. E. Jarvis [13]). В Беларуси отмечена типовая разновидность.

Teloxys aristata – однолетнее травянистое растение высотой от 5 до 40 (50) см, с тонким простым или ветвящимся стержневым корнем. Стебель обычно сильноветвистый, нередко в конце вегетации с красноватой окраской, образующий форму растения перекаати-поле. Стебель голый или в нижней и средней частях имеет короткие железистые волоски. Листья очередные, простые, цельные, зеленые или слегка желтоватые, голые, линейные или продолговато-линейные, от 0,8 до 3,5 (6,0) см длиной и от 1 до 3 (8) мм шириной, на верхушке острые или притупленные, сидячие или в основании клиновидно суженные в черешок до 0,4 мм длиной, цельнокрайные или неясно мелкозубчатые. Соцветие верхушечное, сильноразветвленное, дихазального типа. Цветки сидячие или на коротких цветоножках, обоеполые (иногда в верхней части соцветия – пестичные), расположены в развилках ветвей соцветия. Боковые веточки соцветия преобразованы в небольшие остевидные колючки, которые редко могут отсутствовать (возможно при произрастании в более увлажненных местообитаниях). Околоцветник простой, чашечковидный, 5-членный. Листочки околоцветника 0,5–0,7 мм длиной и 0,3–0,4 мм шириной, голые, сросшиеся почти до основания, узкоэллиптические, слегка мясистые, на верхушке тупые или заостренные, по краю пленчатые, при плодах отогнутые. Тычинок – 5. Пыльники около 0,2 мм длиной. Рылец – 2 (3). Плоды односемянные, сжатые, линзовидные или округлые. Околоплодник тонкий, пленчатый, прилегающий к семеню. Семена горизонтальные, сжатые, 0,5–0,8 мм в диаметре, буровато-черные, по краю – с ребром или выступающей оторочкой (рис. 1, а, б).

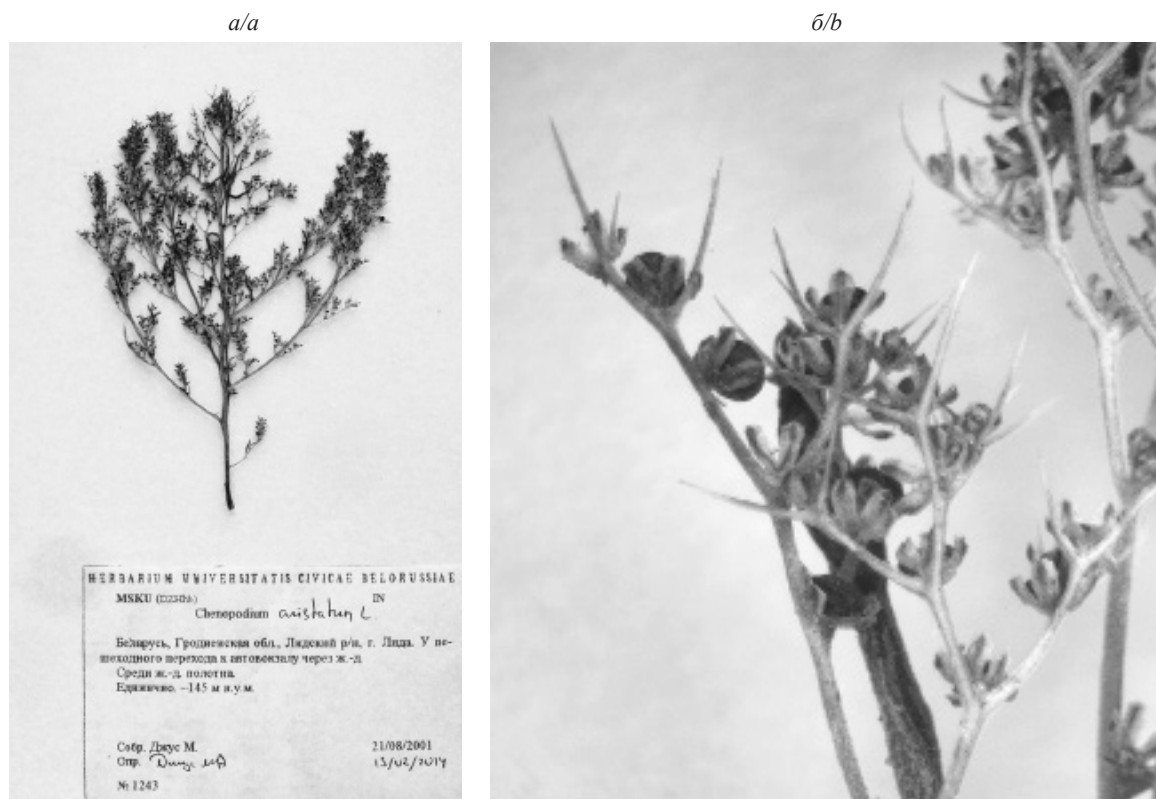


Рис. 1. Внешний вид гербарного образца (а) и фрагмент соцветия (б) *Teloxys aristata* с территории Беларуси
Fig. 1. Herbarium specimen (a) and the part of inflorescence (b) of *Teloxys aristata* from Belarus

Общее распространение вида охватывает страны Северной Европы (Швеция, Финляндия, Дания – заносное, очень редко), Атлантической Европы (Великобритания, Бельгия, Голландия – заносное, очень редко), Центральной Европы (Германия, Австрия, Венгрия, Польша – заносное, редко), Восточной Европы (Литва, Латвия, Эстония, Украина – заносное, Россия) и Южной Европы (Италия, Греция – заносное, редко), Центральной Азии (Казахстан, Кыргызстан, Монголия, Китай), Восточной Азии (Корея, Япония – заносное) и Южной Азии (Непал(?)) и Северной Америки (северо-восточные и северо-западные регионы США – заносное, редко) [1; 2; 11; 14–18].

В сопредельных с Беларусью регионах *Teloxys aristata* естественно встречается лишь в России, где произрастает преимущественно на юге Сибири, а также в Амурской области и на юге Уссурийского края. Как заносное растение встречается в европейской части России (Республика Карелия, Мордовия, Коми, Татарстан, Чувашия, Мурманская, Ленинградская, Московская, Тамбовская, Самарская, Ивановская, Калужская, Ульяновская области). На Украине отмечен только как заносный вид в Луганской и Харьковской областях [1; 11]. В Польше *Teloxys aristata* также редкое заносное растение (вероятно, эфемерофит), известен с 1941 г. и отмечен лишь в нескольких населенных пунктах в центральной и северо-западной частях страны, преимущественно вблизи железных дорог (Опочно, Томашув-Мазовецкий, Щецин и др.) [14; 17]. В Латвии впервые обнаружен в 1963 г. в Риге на свалке мусора. В Литве вид известен с 1948 г., отмечен в южной (Друскининкай) и юго-восточной (Вильнюс, Стасилос) частях страны, предполагается занос с зерном [15; 16]. Два последних локалитета расположены на железнодорожной линии Вильнюс – Лида, а станция Стасилос является пограничной и расположена примерно в 10 км от территории Беларуси. Данный вектор – наиболее вероятный источник заноса диаспор вида на территорию Беларуси.

Биология и фитоценология. Яровой однолетник. Семена прорастают весной. В пределах ареала произрастает по железнодорожным насыпям, пустырям, остепненным склонам, как сеgetальный сорняк засоряет зерновые и пропашные культуры. В некоторых европейских странах выращивается для изготовления сухих букетов [18]. Цветет с конца июля до сентября, плодоносит в августе – октябре. В пределах вторичного ареала в Европе произрастает в широком спектре рудеральных сообществ, относящихся преимущественно к классу *Chenopodietea*. В Беларуси, судя по краткому флористическому описанию, произрастал совместно с *Eragrostis minor* Host, *Digitaria ischaemum* (Schreb.) Muhl., *Chenopodium album* L. s. l., *Microrhinum minus* (L.) Fourt., *Rorippa palustris* (L.) Besser, *Atriplex tatarica* L. s. l., *Bassia scoparia* (L.) A. J. Scott, *Geranium sibiricum* L., *Hieracium umbellatum* L. Вид константный в цитологическом



Рис. 2. Распространение *Teloxys aristata* (●) на территории Беларуси
Fig. 2. Distribution of *Teloxys aristata* (●) in Belarus

отношении. Для него в различных частях ареала указывается $2n = 18$. Это число хромосом установлено для растений из России (Сибирь, Дальний Восток), Китая, Германии и Польши [19]. Семена, имеющиеся в гербарии, собранном на территории Беларуси, нам прорастить, к сожалению, не удалось.

Исследованный материал: Гродненская обл., Лидский р-н, г. Лида. У пешеходного перехода к автовокзалу через железную дорогу (N 53° 52' 57,88", E 25° 17' 39,58", WGS-84). Среди железнодорожного полотна. 145 м н. у. м. 21.08.2001. М. А. Джус. № 1243. MSKU (рис. 2).

Таким образом, *Teloxys aristata* впервые приводится для территории Беларуси и является единственным представителем рода во флоре республики. Местообитание и видовой состав заселяемого растительного сообщества указывают на заносный характер данного местонахождения. В Беларуси, как и во многих странах Европы, вид является эфемерофитом. Полученные данные дополняют сведения о таксономическом составе рода *Chenopodium* s. l. на территории страны, а также уточняют общее распространение выявленного вида в Европе. Всего в Беларуси, с учетом новых данных, отмечено произрастание около 30 видов марей, относящихся к 6 родам.

Библиографические ссылки

1. Мосякин С. Л. *Chenopodium* L. Флора Восточной Европы : в 11 т. / под ред. Н. Н. Цвелева. СПб., 1996. Т. 9.
2. Brenan P. M., Akeroyd J. R. *Chenopodium* L. Flora Europaea : in 5 vol. / ed. by T. G. Tutin [et al.]. 2nd ed. London ; New York ; Cambridge, 1993. Vol. 1 : Psilotaceae to Platanaceae.
3. Fuentes-Bazan S., Uotila P., Borsch T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae) // Willdenowia. 2012. Vol. 42. P. 5–24.
4. Kadereit G., Mavrodiev E. V., Zacharias E. H., et al. Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 photosynthesis // Am. J. Bot. 2010. Vol. 97. P. 1664–1687.
5. Mosyakin S. L., Clemants S. E. New nomenclatural combinations in *Dysphania* R. Br. (Chenopodiaceae): taxa occurring in North America // Укр. бот. журн. 2002. Vol. 59, № 4. P. 380–385.
6. Mosyakin S. L., Clemants S. E. New infrageneric taxa and combination in *Chenopodium* L. (Chenopodiaceae) // Novon. 1996. Vol. 6. P. 398–403.
7. Mosyakin S. L. New nomenclatural combinations in *Blitum*, *Oxybasis*, *Chenopodiastrum*, and *Lipandra* (Chenopodiaceae) // Phytoneuron. 2013. Vol. 56. P. 1–8.
8. Sukhorukov A., Zhang M. Fruit and seed anatomy of *Chenopodium* and related genera (Chenopodioideae, Chenopodiaceae/ Amaranthaceae): implications for evolution and taxonomy // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, № 4. P. 1–18.
9. Uotila P. *Dysphania* sect. Botryoides (Amaranthaceae s. lat.) in Asia // Willdenowia. 2013. Vol. 43, № 1. P. 65–80.
10. Третьяков Д. И. *Chenopodium* L. Определитель высших растений Беларуси / под ред. В. И. Парфенова. Минск, 1998.
11. Мосякин С. Л. *Teloxys* Moq., *Dysphania* R. Br., *Blitum* L., *Chenopodium* L. Конспект флоры Восточной Европы / под ред. Н. Н. Цвелева, Д. В. Гельтмана. СПб. ; М., 2012. Т. 1.
12. Weber W. A. The Genus *Teloxys* (Chenopodiaceae). Phytologia. 1985. Vol. 58, № 7. P. 477–478.
13. Iamónico D., Jarvis C. Lectotypification of two Linnaean names in *Chenopodium* L. (Chenopodiaceae) // Taxon. 2012. Vol. 61, № 4. P. 864–865.
14. Głazek T., Mirek Z., Połowska A. *Chenopodium aristatum* L. – rzadki w Polsce gatunek synantropijny // Fragn. Flor. Geobot. 1983. Ann. 29, Pars 1. P. 9–14.
15. Gudžinskas Z. Conspectus of alien plant species of Lithuania. 13. Chenopodiaceae // Botanica Lithuanica. 2000. Vol. 6, № 1. P. 3–16.
16. Lekavičius L., Puusepp V., Rasiņš A., et al. Chenopodiaceae Vent. Flora of the Baltic Countries, Compendium of Vascular Plants : in 3 vol. 1993. Vol. 1 : Tartu.
17. Trojecka-Brzezińska A. Nowe stanowisko *Chenopodium aristatum* (Chenopodiaceae) na terenie kolejowym we wschodniej części Wzgórz Opoczyńskich // Fragmenta Floristica et Geobotanica. Ser.: Polonica. 2010. Vol. 17, № 1. P. 191–203.
18. Verloove F. *Teloxys aristata*. Manual of the Alien Plants of Belgium [Electronic resource]. 2016. URL: <http://www.alienplants-belgium.be> (date of access: 14.12.2016).
19. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden [Electronic resource]. URL: <http://www.tropicos.org> (date of access: 14.12.2016).

References

1. Mosyakin S. L. *Chenopodium* L. Flora Vostochnoi Evropy [Flora of Eastern Europe] : in 11 vol. Saint Petersburg, 1996. Vol. 9 (in Russ.).
2. Brenan P. M., Akeroyd J. R. *Chenopodium* L. Flora Europaea : in 5 vol. 2nd ed. London ; New York ; Cambridge, 1993. Vol. 1 : Psilotaceae to Platanaceae.
3. Fuentes-Bazan S., Uotila P., Borsch T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae). *Willdenowia*. 2012. Vol. 42. P. 5–24.
4. Kadereit G., Mavrodiev E. V., Zacharias E. H., et al. Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 photosynthesis. *Am. J. Bot.* 2010. Vol. 97. P. 1664–1687.
5. Mosyakin S. L., Clemants S. E. New nomenclatural combinations in *Dysphania* R. Br. (Chenopodiaceae): taxa occurring in North America. *Ukrainian. Bot. J.* 2002. Vol. 59, No. 4. P. 380–385.

6. Mosyakin S. L., Clemants S. E. New infrageneric taxa and combination in *Chenopodium* L. (Chenopodiaceae). *Novon*. 1996. Vol. 6. P. 398–403.
7. Mosyakin S. L. New nomenclatural combinations in *Blitum*, *Oxybasis*, *Chenopodiastrum*, and *Lipandra* (Chenopodiaceae). *Phytoneuron*. 2013. Vol. 56. P. 1–8.
8. Sukhorukov A., Zhang M. Fruit and seed anatomy of *Chenopodium* and related genera (Chenopodioideae, Chenopodiaceae/ Amaranthaceae): implications for evolution and taxonomy. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, No. 4. P. 1–18.
9. Uotila P. *Dysphania* sect. *Botryoides* (Amaranthaceae s. lat.) in Asia. *Willdenowia*. 2013. Vol. 43, No. 1. P. 65–80.
10. Tretjakov D. I. *Chenopodium* L. *Opredelitel' vysshikh rastenii Belarusi* [Manual of Vascular Plants of Belarus]. Minsk, 1998 (in Russ.).
11. Mosyakin S. L. *Teloxys* Moq., *Dysphania* R. Br., *Blitum* L., *Chenopodium* L. *Konspekt flory Vostochnoi Evropy* [Conspectus Florae Europae Orientalis]. Saint Petersburg ; Moscow, 2012. Vol. 1 (in Russ.).
12. Weber W. A. The Genus *Teloxys* (Chenopodiaceae). *Phytologia*. 1985. Vol. 58, No. 7. P. 477–478.
13. Iamónico D., Jarvis C. Lectotypification of two Linnaean names in *Chenopodium* L. (Chenopodiaceae). *Taxon*. 2012. Vol. 61, No. 4. P. 864–865.
14. Głazek T., Mirek Z., Połowska A. *Chenopodium aristatum* L. – rzadki w Polsce gatunek synantropijny. *Fragm. Flor. Geobot.* 1983. Ann. 29, Pars 1. P. 9–14 (in Pol.).
15. Gudžinskas Z. Conspectus of alien plant species of Lithuania. 13. Chenopodiaceae. *Botanica Lithuanica*. 2000. Vol. 6, No. 1. P. 3–16.
16. Lekavičius L., Puusepp V., Rasiņš A., et al. Chenopodiaceae Vent. Flora of the Baltic Countries, Compendium of Vascular Plants : in 3 vol. 1993. Vol. 1 : Tartu.
17. Trojecka-Brzezińska A. Nowe stanowisko *Chenopodium aristatum* (Chenopodiaceae) na terenie kolejowym we wschodniej części Wzgórz Opoczyńskich. *Fragmenta Floristica et Geobotanica. Ser.: Polonica*. 2010. Vol. 17, No. 1. P. 191–203 (in Pol.).
18. Verloove F. *Teloxys aristata*. Manual of the Alien Plants of Belgium [Electronic resource]. 2016. URL: <http://www.alienplants-belgium.be> (date of access: 14.12.2016).
19. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden [Electronic resource]. URL: <http://www.tropicos.org> (date of access: 14.12.2016).

Статья поступила в редколлегию 12.12.2016.
Received by editorial board 12.12.2016.

УДК 582.282.112(476)

ERYSIPHE MACLEAYAE R. Y. ZHENG ET G. Q. CHEN (ПОРЯДОК ERYSIPHALES) – НОВЫЙ ИНВАЗИВНЫЙ ВИД В БЕЛАРУСИ

И. С. ГИРИЛОВИЧ¹⁾, Н. А. ЛЕМЕЗА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Приведены данные о появлении в Республике Беларусь нового инвазивного вида мучнисторосяного гриба *Erysiphe macleayae* R. Y. Zheng et G. Q. Chen (порядок Erysiphales), паразитирующего на чистотеле большом (*Chelidonium majus* L., семейство Papaveraceae). Представлена морфометрическая характеристика указанного вида и его местонахождение.

Ключевые слова: инвазия; мучнисторосяные грибы; анаморфа; телеоморфа; *Oidium*; *Pseudoidium*; *Macleaya*; *Chelidonium*; Papaveraceae.

ERYSIPHE MACLEAYAE R. Y. ZHENG ET G. Q. CHEN (ORDER ERYSIPHALES) – A NEW INVASIVE SPECIES IN BELARUS

I. S. HIRILOVICH^a, N. A. LEMEZA^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: lemeza_na@mail.ru

A new invasive species of *Erysiphe* parasitizing *Chelidonium majus* recorded in Belarus. The morphometric characteristic and location of *Erysiphe macleayae* R. Y. Zheng et G. Q. Chen (order Erysiphales) are given.

Key words: invasion; powdery; mildews; anamorphic; teleomorphic; *Oidium*; *Pseudoidium*; *Macleaya*; *Chelidonium*; Papaveraceae.

Введение

Инвазивные чужеродные виды растений и грибов, внедряясь в новые экологические ниши, оказывают существенное влияние на биологическое разнообразие и экологическое равновесие конкретного фитоценоза. Наряду с другими негативными факторами (зоогенные, антропогенные), воздействующими на окружающую среду, чужеродные грибы, попадая в новые условия, часто приносят огромный ущерб народному хозяйству. Речь идет о многочисленных видах грибов-паразитов, вызывающих опасные заболевания не только возделываемых культур, но и многих дикорастущих растений (*Phytophthora infestans* de Bary, *Podosphaera mors-uvae* (Schwein.) U. Braun et S. Takam., *Erysiphe necator* Schwein. и многие другие).

Образец цитирования:

Гирилович И. С., Лемеза Н. А. *Erysiphe macleayae* R. Y. Zheng et G. Q. Chen (порядок Erysiphales) – новый инвазивный вид в Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 111–115.

For citation:

Hirilovich I. S., Lemeza N. A. *Erysiphe macleayae* R. Y. Zheng et G. Q. Chen (order Erysiphales) – a new invasive species in Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 111–115 (in Russ.).

Авторы:

Иван Сергеевич Гирилович – кандидат биологических наук, инженер-дендролог Ботанического сада БГУ.

Николай Алексеевич Лемеза – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Authors:

Ivan Hirilovich, PhD (biology); engineer dendrologist, Botanical garden of BSU.

Nikolai Lemeza, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
lemeza_na@mail.ru

Чужеродные виды фитопатогенных грибов, как правило, обладают высокой репродуктивной способностью, жизнеспособностью инфекционного начала и вирулентностью, поэтому в короткие сроки они способны захватить новые территории, в которых ранее не отмечались. Так, за последние десятилетия видовой состав мучнисторосяных грибов на территории Западной Европы и соседних государств, в том числе и Беларуси, значительно расширился (пополнился) за счет североамериканских видов, таких как *Erysiphe azalea* (U. Braun) U. Braun et S. Takam., *E. elevata* (Baurrill) U. Braun et S. Takam., *E. flexuosa* (Peck) U. Braun et S. Takam., *Podosphaera amelantheris* Maurizio, а также восточно-азиатских – *E. arcuata* U. Braun, Heluta et S. Takam., *E. syringae-japonicae* (U. Braun) U. Braun et S. Takam. [1–27]. Попад в новые для них условия, эти виды натурализовались и стали обычными среди аборигенных видов мучнисторосяных грибов. Часто они наносят значительный ущерб сельскохозяйственному производству и зеленому строительству.

В настоящее время процесс увеличения видового состава эризифальных грибов на территории Республики Беларусь продолжается, что подтверждается найденным нами новым инвазивным видом *Erysiphe macleayae* R. Y. Zheng et G. Q. Chen на *Chelidonium majus* L. (семейство Papaveraceae).

Объект и методика исследований

Гербарные образцы чистотела большого (*Chelidonium majus* L., сем. Papaveraceae), пораженные мучнисторосяным грибом, были собраны нами в 2002–2016 гг. Места сбора гербаризированного материала приводятся ниже. Свежесобранный материал микроскопировался по общепринятой методике. Под микроскопом изучались морфометрические особенности гиф, анаморфы и телеоморфы. В каждом конкретном случае выполнялось не менее 30 измерений. Собранный материал хранится в Гербарии Белорусского государственного университета (MSKU) и Национальном гербарии Института ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины (KW).

Чистотел большой – широко распространенный вид в странах с умеренным климатом. Встречается в Европе, в том числе и в Беларуси, Азии, Сибири, Северной Америке, а также на других континентах. Произрастает повсеместно: в лесах, садах, парках, возле жилья, на пустырях, по тенистым рудеральным местам, иногда образует большие заросли.

Поражение *Chelidonium majus* L. мучнистой росой приводилось ранее под названием *Oidium* sp. для Испании, Италии, Франции [27; 28], Литвы [29], Венгрии [30]. Позднее заболевание отмечалось под названием *Pseudoidium* sp. в Польше [31], Германии [32], Словакии и Чехии [33] и под названием *Erysiphe cruciferarum* Opiz ex L. Junell – на Дальнем Востоке [34], в Корее [35], Швейцарии [36]. Затем под названием *Erysiphe macleayae* отмечалось на маклеи и чистотеле в Германии [32; 37], Украине [24], Китае [38] и др.

Описание данного вида мучнисторосяного гриба, поражающего чистотел, под разными названиями объясняется тем, что в течение многих лет возбудитель болезни развивался только в конидиальной стадии. Именно поэтому его таксономическое положение долгое время было неизвестно [39]. Лишь в последние годы в развитии гриба на чистотеле стали образовываться плодовые тела, что позволило определить его точное место среди известных мучнисторосяных грибов.

Впервые гриб *Erysiphe macleayae* был описан R. Y. Zheng et G. Q. Chen [40] на *Macleya cordata* (Willd.) R. Br. и *Papaver nudicaule* L. (Papaveraceae) в Китае, а в 2015 г. обнаружено поражение чистотела с образованием и телеоморфной стадии [38]. Проведенные молекулярные исследования подтвердили принадлежность гриба к *Erysiphe macleayae*.

Результаты исследований и их обсуждение

В условиях Беларуси поражение чистотела отмечалось нами в 1988–1989 гг. [41]. Развитие гриба было зарегистрировано в конидиальной стадии. В течение ряда лет возбудитель был весьма редок. С 2002 г. развитие гриба на чистотеле встречалось чаще, но, как и ранее, оно наблюдалось только с образованием анаморфной стадии, и лишь в 2015 г. нами были собраны образцы пораженных грибом растений с образованием на них телеоморфы. Изучение морфологических особенностей анаморфы и телеоморфы позволило нам идентифицировать мучнисторосяной гриб, развивающийся на чистотеле, как *Erysiphe macleayae* R. Y. Zheng et G. Q. Chen. Далее, приводится описание нового для Беларуси инвазивного вида гриба, а также его местонахождение.

Erysiphe macleayae R. Y. Zheng et G. Q. Chen, Sydowia 34: 290, 1981.

Мицелий поверхностный, тонкий, появляется во второй половине лета (июль) на верхней стороне листа в виде слабовыраженного, тонкого паутинистого белого налета или неправильной формы пятен, сохраняющийся. При благоприятных условиях для развития гриба его проявление становится хорошо выраженным, а налет – мучнистым, сероватым, пятна сливаются, часто покрывают всю поверхность

листа. Гифы слабоветвистые, тонкостенные, 4–10 мкм в ширину, бесцветные. Аппрессории хорошо развитые, одиночные или в противоположных парах, сосковидные, лопастные или многолопастные. Анаморфа относится к роду *Pseudoidium*. Конидиеносцы прямые, 60–140 × 7–10 мкм длиной. Базальная клетка конидиеносца прямая или у основания изогнутая, 25–70 × 8–10 мкм, за которой следуют 2–3 короткие клетки, 30–48 × 7–10 мкм, или почти равные базальной клетке, образующие одиночную конидию. Конидии удлинненно-эллипсоидальные, цилиндрические, 30–50 × 12–18 мкм. Отношение длины к ширине – 2,2 : 3,4. Ростковые трубки образуются на вершине конидии (апикальные), короткие или умеренно длинные, заканчиваются лопастным аппрессорием. Хазмотеции разбросаны, полушаровидные, 70–95 мкм в диаметре. Клетки перидия невыраженные, неправильно-многоугольные, 8–25 мкм в диаметре. Придатки базальные, мицелиевидные, простые, различной длины, коричневые по всей длине или к вершине бесцветные. Сумки (2–5) эллипсоидальные, овальные, сидячие или с короткой ножкой, 42–64 × 26–48 мкм, 3–5-споровые. Аскоспоры удлинненно-эллипсоидальные, яйцевидные, изогнутые, 20–34 × 10–18 мкм, с зернистым содержимым.

Местонахождение исследованных образцов чистотела: Гомельская обл., Жлобинский р-н, г. Жлобин, в старом парке, 22.07.2011; д. Черная Вирня, закустаренный участок на территории бывшей школы, 20.08.2010; Минская обл., Воложинский р-н, на территории геостанции «Западная Березина», 28.07.2009, 26.07.2013; Дзержинский р-н, г. Дзержинск, у хозпостроек, 04.09.2010; Минский р-н, г. Минск, в лесопарковой зоне тракторного завода, 12.10.2015, в Лошицком парке, 22.08.2014, в жилой изгороди по ул. Кульман, 20.09.2015, РУП «Щомыслица», дендрарий, 18.08.2002, у хозпостроек, 10.08.2015, окрестности д. Цнянка, 28.08.2016, окрестности ст. Волчковичи, в обсадках, 16.09.2013.

Заключение

Проведенные исследования показали, что процесс пополнения мучнисторосяных грибов новыми чужеродными видами продолжается. Многие из них в новых условиях становятся широко распространенными и весьма вредоносными. Среди них следует отметить такие виды, как *Erysiphe flexuosa* (Peck) U. Braun et S. Takam., *E. Palczewskii* Jacz., *Podosphaera amelantheris* Maurizio и др. В связи с этим следует ожидать заноса новых инвазивных видов, а также расширения ареала и вредоносности уже известных. С появлением на территории Беларуси нового инвазивного вида *Erysiphe macleayae* следует ожидать его развития и на других декоративных растениях, выращиваемых в нашей республике, например на видах рода *Macleaya*, *Glaucium corniculatum* (L.) Rudolph и др.

Библиографические ссылки

1. Braun U. A monograph of the Erysiphales (powdery mildews) // Beihefte zur Nova Hedwigia. 1987. Vol. 89. P. 1–700.
2. Braun U. Neufunde Echter Mehltaupilze (Erysiphales) aus der BR Deutschland // Schlechtendalia. 1998. Vol. 1. P. 31–40.
3. Braun U. *Erysiphe miurae* and *E. syringae-japonicae* – new records from Russia // Micologija and fitopatologija. 2002. Vol. 36, № 2. P. 15–16.
4. Ale-Agha N., Braun U., Feige B., et al. A new powdery mildew disease on *Aesculus* sp. introduced in Europe // Cryptogamie Mycologie. 2000. Vol. 21, № 2. P. 89–92.
5. Ale-Agha N., Bolay A., Braun U., et al. *Erysiphe catalpae* and *Erysiphe elevata* in Europe // Mycological Progress. 2004. Vol. 3, № 4. P. 291–296.
6. Bolay A. L'oidium des marronniers envahit la Suisse // Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture. 2000. Vol. 32, № 6. P. 311–313.
7. Ing B. *Microsphaera azaleae*, the perfect state of the *Rhododendron* mildew in England // Mycologist. 2000. Vol. 14, issue 4. P. 165.
8. Ing B., Spooner B. The horse chestnut powdery mildew *Uncinula flexuosa* in Europe // Mycologist. 2002. Vol. 16. P. 112–113.
9. Inman A. J., Cook R. T. A., Beales P. A. A contribution to the identity of rhododendron powdery mildew in Europe // J. Phytopathol. 2000. Vol. 148, № 1. P. 17–27.
10. Zimmermannová-Pastirčáková K., Adamska I., Blaszkowski J., et al. Epidemic spread of *Erysiphe flexuosa* (North American powdery mildew of horse-chestnut) in Europe // Schlechtendalia. 2000. Vol. 8. P. 39–45.
11. Zimmermannová-Pastirčáková K., Pastirčák M. *Erysiphe flexuosa* – a new species of powdery mildew for Slovakia // Biologia (Bratislava). 2002. Vol. 57, № 4. P. 437–440.
12. Cook R. T. A., Henricot B., Kiss L. First record of *Erysiphe elevata* on *Catalpa bignonioides* in the UK // Plant Pathology. 2004. Vol. 53, № 6. P. 807.
13. Cook R. T. A., Henricot B., Henrici A., et al. Morphological and phylogenetic comparisons amongst powdery mildews on *Catalpa* in the UK // Mycological Research. 2006. Vol. 110, № 6. P. 672–685.
14. Piątek M. *Erysiphe flexuosa*, a new for Poland powdery mildew causing disease of *Aesculus hippocastanum* // Phytopathol. Pol. 2002. Vol. 24. P. 67–71.
15. Piątek M. *Erysiphe azaleae* and *Erysiphe syringae-japonicae* introduced in Poland // Mycotaxon. 2003. Vol. 87. P. 121–126.
16. Vajna L., Fischl G., Kiss L. *Erysiphe elevata* (syn. *Microsphaera elevata*), a new North American powdery mildew fungus in Europe infecting *Catalpa bignonioides* trees // Plant Pathol. 2004. Vol. 53, № 2. P. 244.

17. Pastirčáková K., Pastirčák M., Juhasova G. The *Catalpa* powdery mildew *Erysiphe elevata* in Slovakia // Cryptogamie, Mycologie. 2006. Vol. 27, № 1. P. 31–34.
18. Pastirčáková K., Takamatsu S., Shiroya Y., et al. European hornbeam powdery mildew *Erysiphe arcuata* in Slovakia // J. Phytopathol. 2009. Vol. 156, № 10. P. 597–601.
19. Stoykov D. Y. *Erysiphe elevata* (Erysiphales) in Bulgaria // Mycologia Balcanica. 2008. Vol. 5. P. 95–96.
20. Stoykov D. Y., Denchev C. M. *Erysiphe flexuosa* (Erysiphales) in Bulgaria // Mycologia Balcanica. 2008. Vol. 5. P. 94–95.
21. Braun U., Cook R. T. A. Taxonomic manual of the *Erysiphales* (powdery mildews) // CBS Biodiversity. Ser. 11. 2012. P. 1–707.
22. Гелюта В. П., Войтюк С. О. *Uncinula flexuosa* Peck – новый для Украины вид инвазийного борошнесторосяного гриба (Erysiphales) // Укр. бот. журн. 2004. Т. 61, № 5. С. 17–25.
23. Гелюта В. П., Войтюк С. О., Чумак П. Я. *Microsphaera azaleae* U. Braun – новый для Украины вид борошнесторосяного гриба (Erysiphales) // Укр. бот. журн. 2004. Т. 61, № 2. С. 27–33.
24. Гелюта В. П., Кравчук Е. А. Первые находки в Украине нового инвазионного гриба *Erysiphe macleayae* (Erysiphales) // Укр. бот. журн. 2015. Т. 72, № 1. С. 39–45.
25. Русанов В. А., Булгаков Т. С. Мучнисторосяные грибы Ростовской области // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42, вып. 4. С. 314–322.
26. Гурилович И. С., Лемеза Н. А. Грибы порядка Erysiphales на территории Минской возвышенности // Современная микология в России : тез. докл. II съезда микологов России (Москва, 16–18 апр. 2008 г.) : в 2 т. М., 2008. Т. 2. С. 58–59.
27. Blumer S. *Echte Mehltaupilze (Erysiphaceae)*. Ein Bestimmungsbuch für die in Europa vorkommenden Arten. Jena, 1967.
28. Amano K. Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi. Tokyo, 1986.
29. Grigaliūnaitė B. Lietuvos grybai. Vol. 3 : in 2 books. Vilnius, 1997. Book 1 : Milteniečiai (Erysiphales).
30. Jankovics T. First report of powdery mildew (*Oidium* sp.) on greater celandine (*Chelidonium majus*) // Plant Pathology. 2007. Vol. 56, № 2. P. 353.
31. Dynowska M., Fiedorowicz G., Kubiak D. Contribution to the distribution of Erysiphales in Poland // Acta Mycologica. 1999. Vol. 34. P. 79–88.
32. Schmidt A., Scholler M. Studies in *Erysiphales* anamorphs (4): species on *Hydrangeaceae* and *Papaveraceae* // Mycotaxon. 2011. Vol. 115. P. 287–301.
33. Pastirčáková K., Pastirčák M. A powdery mildew (*Pseudoidium* sp.) found on *Chelidonium majus* in the Czech Republic and Slovakia // Czech Mycology. 2013. Vol. 65, № 1. P. 125–132.
34. Бункина И. А. Порядок Erysiphales Gwinne-Vaughan // Низшие растения, грибы и мохообразные советского Дальнего Востока. Грибы : в 2 т. Л., 1991. Т. 2 : Аскомицеты. Эризифальные, клавиципитальные, гелоциальные. С. 11–142.
35. Shin H.-D. *Erysiphaceae* of Korea. Suwon, 2000.
36. Ale-Agha N., Boyle H., Braun U., et al. Taxonomy, host range and distribution of some powdery mildew fungi (Erysiphales) // Schlechtendalia. 2008. Vol. 17. P. 39–54.
37. Jiang W., Liu S., An B., et al. *Chasmotecia* of *Erysiphe macleayae* on *Chelidonium majus* confirm species identification. *Mycoscience*. 2015. Vol. 56, № 2. P. 132–135.
38. Braun U. The powdery mildews (Erysiphales) of Europe. Jena ; Stuttgart ; New York, 1995.
39. Zheng R., Chen G. The genus *Erysiphe* in China // Sydowia. 1981. Vol. 34. P. 214–327.
40. Гурилович И. С., Лемеза Н. А., Шуканов А. С. Видовой состав мучнисторосяных грибов (сем. Erysiphaceae) Белоруссии. Деп. в ВИНТИ 03.08.89, № 5237-B89.

References

1. Braun U. A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Beihefte zur Nova Hedwigia*. 1987. Vol. 89. P. 1–700 (in Ger.).
2. Braun U. Neufunde Echter Mehltaupilze (Erysiphales) aus der BR Deutschland. *Schlechtendalia*. 1998. Vol. 1. P. 31–40 (in Ger.).
3. Braun U. *Erysiphe miurae* and *E. syringae-japonicae* – new records from Russia. *Micologija and fitopatologija*. 2002. Vol. 36, No. 2. P. 15–16 (in Ger.).
4. Ale-Agha N., Braun U., Feige B., et al. A new powdery mildew disease on *Aesculus* sp. introduced in Europe. *Cryptogamie Mycologie*. 2000. Vol. 21, No. 2. P. 89–92 (in Ger.).
5. Ale-Agha N., Bolay A., Braun U., et al. *Erysiphe catalpae* and *Erysiphe elevata* in Europe. *Mycological Progress*. 2004. Vol. 3, No. 4. P. 291–296 (in Ger.).
6. Bolay A. L'oidium des marronniers envahit la Suisse. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*. 2000. Vol. 32, No. 6. P. 311–313.
7. Ing B. *Microsphaera azaleae*, the perfect state of the *Rhododendron* mildew in England. *Mycologist*. 2000. Vol. 14, issue 4. P. 165. DOI: 10.1016/S0269-915X(00)80033-6.
8. Ing B., Spooner B. The horse chestnut powdery mildew *Uncinula flexuosa* in Europe. *Mycologist*. 2002. Vol. 16. P. 112–113 (in Ger.).
9. Inman A. J., Cook R. T. A., Beales P. A. A contribution to the identity of rhododendron powdery mildew in Europe. *J. Phytopathol.* 2000. Vol. 148, No. 1. P. 17–27 (in Ger.).
10. Zimmermannová-Pastirčáková K., Adamska I., Blaszkowski J., et al. Epidemic spread of *Erysiphe flexuosa* (North American powdery mildew of horse-chestnut) in Europe. *Schlechtendalia*. 2000. Vol. 8. P. 39–45 (in Slovakia).
11. Zimmermannová-Pastirčáková K., Pastirčák M. *Erysiphe flexuosa* – a new species of powdery mildew for Slovakia. *Biologia (Bratislava)*. 2002. Vol. 57, No. 4. P. 437–440 (in Slovakia).
12. Cook R. T. A., Henricot B., Kiss L. First record of *Erysiphe elevata* on *Catalpa bignonioides* in the UK. *Plant Pathology*. 2004. Vol. 53, No. 6. P. 807.
13. Cook R. T. A., Henricot B., Henrici A., et al. Morphological and phylogenetic comparisons amongst powdery mildews on *Catalpa* in the UK. *Mycological Research*. 2006. Vol. 110, No. 6. P. 672–685.
14. Piątek M. *Erysiphe flexuosa*, a new for Poland powdery mildew causing disease of *Aesculus hippocastanum*. *Phytopathol. Pol.* 2002. Vol. 24. P. 67–71 (in Pol.).

15. Piątek M. *Erysiphe azaleae* and *Erysiphe syringae-japonicae* introduced in Poland. *Mycotaxon*. 2003. Vol. 87. P. 121–126 (in Pol.).
16. Vajna L., Fischl G., Kiss L. *Erysiphe elevata* (syn. *Microsphaera elevata*), a new North American powdery mildew fungus in Europe infecting *Catalpa bignonioides* trees. *Plant Pathol.* 2004. Vol. 53, No. 2. P. 244 (in Hungaria).
17. Pastirčáková K., Pastirčák M., Juhasova G. The *Catalpa* powdery mildew *Erysiphe elevata* in Slovakia. *Cryptogamie, Mycologie*. 2006. Vol. 27, No. 1. P. 31–34 (in Slovakia).
18. Pastirčáková K., Takamatsu S., Shiroya Y., et al. European hornbeam powdery mildew *Erysiphe arcuata* in Slovakia. *J. Phytopathol.* 2009. Vol. 156, No. 10. P. 597–601 (in Slovakia).
19. Stoykov D. Y. *Erysiphe elevata* (Erysiphales) in Bulgaria. *Mycologia Balcanica*. 2008. Vol. 5. P. 95–96 (in Bulg.).
20. Stoykov D. Y., Denchev C. M. *Erysiphe flexuosa* (Erysiphales) in Bulgaria. *Mycologia Balcanica*. 2008. Vol. 5. P. 94–95 (in Bulg.).
21. Braun U., Cook R. T. A. Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildews). *CBS Biodiversity. Ser. 11*. 2012. P. 1–707 (in Ger.).
22. Heluta V. P., Voytyuk S. O. *Uncinula flexuosa* Peck – novyi dlja Ukraini vid invasionnogo muchnistorosjanogo griba [*Uncinula flexuosa* Peck – a new invasive species of powdery mildew from Ukraine (Erysiphales)]. *Ukrainian Bot. J.* 2004. Vol. 61, No. 5. P. 17–25 (in Ukrainian).
23. Heluta V. P., Voytyuk S. O., Chumak P. Ya. *Microsphaera azaleae* U. Braun – novyi dlja Ukraini vid muchnistorosjanogo griba (Erysiphales) [*Microsphaera azaleae* U. Braun – a new species of powdery mildew from Ukraine (Erysiphales)]. *Ukrainian Bot. J.* 2004. Vol. 61, No. 2. P. 27–33 (in Ukrainian).
24. Heluta V. P., Kravchuk E. A. Pervye nachodki v Ukraine invasionnogo griba *Erysiphe macleayae* (Erysiphales) [First records of a new invasive fungus, *Erysiphe macleayae* (Erysiphales)]. *Ukrainian Bot. J.* 2015. Vol. 72, No. 1. P. 39–45 (in Russ.).
25. Rusanov V. A., Bulgakov T. S. Muchnistorosjanye griby Rostovskoi oblasti [The powdery mildew fungi of Rostov region]. *Mikol. i fitopatol.* 2008. Vol. 42, issue. 4. P. 314–322 (in Russ.).
26. Hirylovich I. S., Lemeza N. A. Griby porjadka Erysiphales na territorii Minskoj vozvysennosti [The fungi of the order Erysiphales of Minsk upland]. *Sovremennaya mikologiya v Rossii : tez. dokl. II syezda mikologov Rossii* (Moscow, 16–18 April, 2008) : in 2 vol. Moscow, 2008. Vol. 2. P. 58–59 (in Russ.).
27. Blumer S. Echte Mehltupilze (*Erysiphaceae*). Ein Bestimmungsbuch für die in Europa vorkommenden Arten. Jena, 1967 (in Ger.).
28. Amano K. Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi. Tokyo, 1986 (in Jpn.).
29. Grigaliūnaitė B. Lietuvos grybai. Vol. 3 : in 2 books. Vilnius, 1997. Book 1 : Milteniečiai (Erysiphales) (in Lith.).
30. Jankovics T. First report of powdery mildew (*Oidium* sp.) on greater celandine (*Chelidonium majus*). *Plant Pathology*. 2007. Vol. 56, No. 2. P. 353 (in Hungary).
31. Dynowska M., Fiedorowicz G., Kubiak D. Contributions to the distribution of Erysiphales in Poland. *Acta Mycologica*. 1999. Vol. 34. P. 79–88 (in Pol.).
32. Schmidt A., Scholler M. Studies in Erysiphales anamorphs (4): species on *Hydrangeaceae* and *Papaveraceae*. *Mycotaxon*. 2011. Vol. 115. P. 287–301 (in Ger.).
33. Pastirčáková K., Pastirčák M. A powdery mildew (*Pseudoidium* sp.) found on *Chelidonium majus* in the Czech Republic and Slovakia. *Czech Mycology*. 2013. Vol. 65, No. 1. P. 125–132 (in Czech).
34. Bunkina I. A. Porjadok Erysiphales Gwinne-Vaughan. *Nizshie rastenija, griby i mohoobraznye Sovetskogo Dalnego Vostoka. Griby* : in 2 vol. Leningrad, 1991. Vol. 2 : Askomicety, Erizifalnye, Klavicipitalnye, Gelocialnye. P. 11–142 (in Russ.).
35. Shin H.-D. *Erysiphaceae* of Korea. Suwon, 2000 (in Korea).
36. Ale-Agha N., Boyle H., Braun U., et al. Taxonomy, host range and distribution of some powdery mildew fungi (Erysiphales). *Schlechtendalia*. 2008. Vol. 17. P. 39–54 (in Ger.).
37. Jiang W., Liu S., An B., et al. Chasmothecia of *Erysiphe macleayae* on *Chelidonium majus* confirm species identification. *Mycoscience*. 2015. Vol. 56, No. 2. P. 132–135 (in China).
38. Braun U. The powdery mildews (Erysiphales) of Europe. Jena ; Stuttgart ; New York, 1995 (in Ger.).
39. Cheng R., Chen G. The genus *Erysiphe* in China. *Sydowia*. 1981. Vol. 34. P. 214–327 (in China).
40. Hirylovich I. S., Lemeza N. A., Shukanov A. S. Vidovoy sostav muchnistorosjanyh gribov (sem. Erysiphaceae) v Belorussii [The species composition of powdery mildew fungi (fam. Erysiphaceae) in Belarus]. The manuscript is deposited in VINITI 03.08.89, № 5237-B89 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 12.12.2016.
Received by editorial board 12.12.2016.

ПЕРВЫЕ НАХОДКИ МИКРОМИЦЕТА *PERONOSPORA VIOLACEA* BERK. В БЕЛАРУСИ

А. К. ХРАМЦОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Приведены данные о первых находках в Беларуси микромицета *Peronospora violacea* Berk. (Peronosporaceae, Peronosporales, Oomycetes, Oomycota, Chromista), который является облигатным паразитическим грибоподобным организмом и поражает цветки растений из семейства Dipsacaceae Juss., вызывая ложную мучнистую росу (пероноспороз). Изложены сведения о распространении этого микромицета в Европе, его хорологических особенностях, круге растений-хозяев и признаках пероноспороза на цветках. Микромицет *P. violacea* обнаружен на цветках *Knautia arvensis* (L.) Coult. в двух локалитетах Беларуси. В итоге исследования гербарных образцов представлена краткая морфологическая характеристика выявленного патогена. Указан гербарный материал, послуживший основанием для исследований и хранящийся в Гербарии Белорусского государственного университета (MSKU). Полученные результаты исследования грибоподобного организма *P. violacea* дополняют данные о его распространении, морфометрических характеристиках и могут быть учтены при инвентаризации микобиоты Беларуси. Сведения о возможном круге хозяев *P. violacea* в Беларуси будут полезными для выявления больных растений и разработки мероприятий по защите культивируемых ворсянковых от пероноспороза цветков.

Ключевые слова: микромицет *Peronospora violacea*; грибоподобный организм; пероноспороз; цветки; *Knautia arvensis*; растения-хозяева семейства Dipsacaceae; микобиота; Беларусь.

Благодарность. Автор выражает благодарность доцентам кафедры ботаники БГУ М. А. Джусу и Вал. Н. Тихомирову за ценные консультации по вопросу разнообразия растений семейства Dipsacaceae в Беларуси.

FIRST RECORDS OF MICROMYCETES *PERONOSPORA VIOLACEA* BERK. IN BELARUS

А. К. KHRAMTSOV^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

The data concerning the first findings of the micromycetes *Peronospora violacea* Berk. (Peronosporaceae, Peronosporales, Oomycetes, Oomycota, Chromista) within Belarus is presented. This species is an obligate parasitic pseudofungus and affects the flowers of family Dipsacaceae Juss. causing downy mildew. We supply data about distribution of this micromycetes in Europe, its chorologic features, host-plants and symptoms of downy mildew on flowers. Micromycetes *P. violacea* is found on the flowers of *Knautia arvensis* (L.) Coult. in two Belarusian locations. We provide a brief morphological description of this pathogen based on the assessing of collected samples. The herbarium samples that are referred to in our work and serve as the grounds for this article are retained in Belarusian State University Herbarium (MSKU). The results of this research work extend our knowledge of morphometric characteristics and distribution of pseudofungus *P. violacea* and might be taken into consideration when compiling the inventory of Belarusian mycobiota. The information about possible host-plants *P. violacea* in Belarus is valuable for the detection of diseased plants and development of measures for protection cultivated Dipsacaceae plants from downy mildew of flowers.

Образец цитирования:

Храмцов А. К. Первые находки микромицета *Peronospora violacea* Berk. в Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 116–121.

For citation:

Khrantsov A. K. First records of micromycetes *Peronospora violacea* Berk. in Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 116–121 (in Russ.).

Автор:

Александр Константинович Храмцов – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Author:

Alexander Khrantsov, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
alexkhrantsov@mail.ru

Key words: micromycetes *Peronospora violacea*; pseudofungus; downy mildew; flowers; *Knautia arvensis*; host-plants family Dipsacaceae; mycobiota; Belarus.

Acknowledgements. The author expresses his gratitude to the associated professors of the Department of Botany of the Belarusian State University M. A. Dzhus and Val. N. Tikhomirov for valuable consultations on the diversity of plants of the Dipsacaceae family in Belarus.

Микромицет *Peronospora violacea* Berk. (Peronosporaceae, Peronosporales, Oomycetes, Oomycota, Chromista) – облигатный паразитический грибоподобный организм, который поражает цветки растений из семейства Dipsacaceae Juss., вызывая ложную мучнистую росу (пероноспороз).

P. violacea был описан в 1860 г. М. J. Berkeley по собственным сборам 30 июня 1859 г. на цветках *Knautia arvensis* (L.) Coult. с территории Великобритании [1]. Данный микромицет был найден также во многих странах Европы (Австрия, Болгария, Германия, Дания, Испания, Нидерланды, Норвегия, Румыния, Словакия, Финляндия, Франция, Чехия, Швейцария, Швеция, Эстония и др.) [2–5]. По хронологическим особенностям *P. violacea* характеризуется как европейский океанический вид и относится к температурно-субмеридиональной хронологической группе видов [5]. Из числа государств, сопредельных с Республикой Беларусь, данный грибоподобный организм отмечен в Латвии, Польше, России, Украине и является провизорным для Литвы [3–12]. До настоящего времени он не указывался в составе микобиоты Беларуси [13].

Известно, что кроме *Knautia arvensis* микромицет *P. violacea* паразитирует на цветках других представителей ворсянковых: *K. kitaibelii* (Schult.) Borbás, *K. drymeia* Heuff., *K. dipsacifolia* Kreutzer, *K. sara-jevensis* (Beck) Szabó, *Scabiosa columbaria* L., *S. ochroleuca* L., *Succisa pratensis* Moench, *Dipsacus pilosus* L. [4; 6]. В соцветиях растений-хозяев поражаются цветки (лепестки, тычинки, пестики), которые недоразвиваются, становятся тусклыми, выделяются серо-фиолетовой окраской. В пораженных пыльниках недоразвивается пыльца. Цветки постепенно буреют, покрываются нежным пушистым серовато-фиолетовым налетом спороношения паразита [3–8; 12; 14].

В августе 2016 г. на территории Беларуси в пределах геоботанической подзоны дубово-темнохвойных лесов в двух местонахождениях с территории Оршанско-Могилёвского и Ошмянско-Минского геоботанических округов, Оршанско-Приднепровского и Минско-Борисовского геоботанических районов нами впервые отмечен *P. violacea* на *Knautia arvensis* [15]. Следует подчеркнуть, что выявленные местонахождения *P. violacea* находятся согласно агроклиматическому районированию Беларуси в разных агроклиматических областях (северной умеренно теплой, влажной и центральной теплой, умеренно влажной), а также в разных агроклиматических подобластях (восточной и западной), что указывает на широкую экологическую амплитуду паразита [15].

Встречаемость *P. violacea* в обоих местонахождениях оценена по шкале Гааса в 1 балл (единично) [16]. Поражение охватывало все соцветие *Knautia arvensis*, которое выглядело грязноватым от серо-фиолетового налета спороношения паразита на фоне побуревших, деформированных, хаотично торчащих цветков и резко отличалось от компактных непораженных соцветий (рис. 1). Пораженные цветки

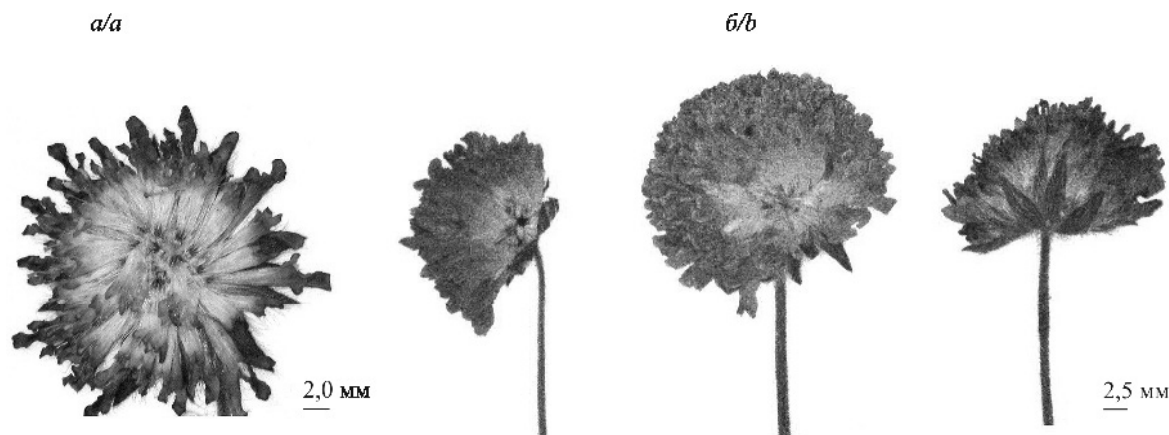


Рис. 1. Внешний вид соцветий *Knautia arvensis*:

а – с непораженными цветками; б – с цветками, пораженными микромицетом *Peronospora violacea*

Fig. 1. The appearance of inflorescences of *Knautia arvensis*:

а – with unaffected flowers; б – with flowers affected by micromycetes *Peronospora violacea*

по размерам были меньше нормальных. В пораженных пыльниках отмечены немногочисленные пыльцевые зерна. На цветках изученных экземпляров короставника полевого совместно с возбудителем пероноспороза были обнаружены грибы из рода *Alternaria*.

Ниже приводим краткую морфологическую характеристику выявленного микромицета.

Peronospora violacea Berk., Outl. Brit. Fung. (London): 349 (1860).

Мицелий эндофитный, в тканях цветков (лепестки, тычинки, пестики), несептированный, разветвленный. На наружной и внутренней поверхностях лепестков венчика, на тычинках, пестике – нежный рассеянный сероватый налет спороношения.

Конидиеносцы (95,2–) 141,5 (–246,4) × (9,8–) 11,0 (–11,2) мкм (по А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому, Наумову, Станявичене: 150–350 × 10 мкм [5; 7; 8]; по Новотельновой и Пыстиной: 150–350 × 10–13 мкм [3]; по Kochman and Majewski: 140–320 × 7–13 мкм [6]; по Horáková and Skalický: 145–320 мкм длиной [4]), одиночные или в пучках, вздутые у основания, дихотомически разветвленные под острым углом, бесцветные, с конечными ветвями длиной (8,4–) 11,3 (–14) мкм, толщиной (2,8–) 3,1 (–4,2) мкм (по А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому, Наумову, Станявичене, Новотельновой и Пыстиной: 9–13 мкм длиной [3; 5; 7; 8]; по Kochman and Majewski: 13 × 2,0–2,5 мкм [6]), прямыми (реже – слабоискривленными), заостренными, раздвоенными под острым углом (рис. 2).

Конидии одноклеточные, яйцевидные, на вершине с сосочком, светло-коричневые со слабым фиолетовым оттенком, (30,8–) 34,5 (–37,8) × (16,8–) 18,4 (–22,4) мкм (среднее отношение длины к ширине 1,9) (по М. В. Ellis and P. J. Ellis: 30–39 × 17–19 мкм [14]; по А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому, Наумову,

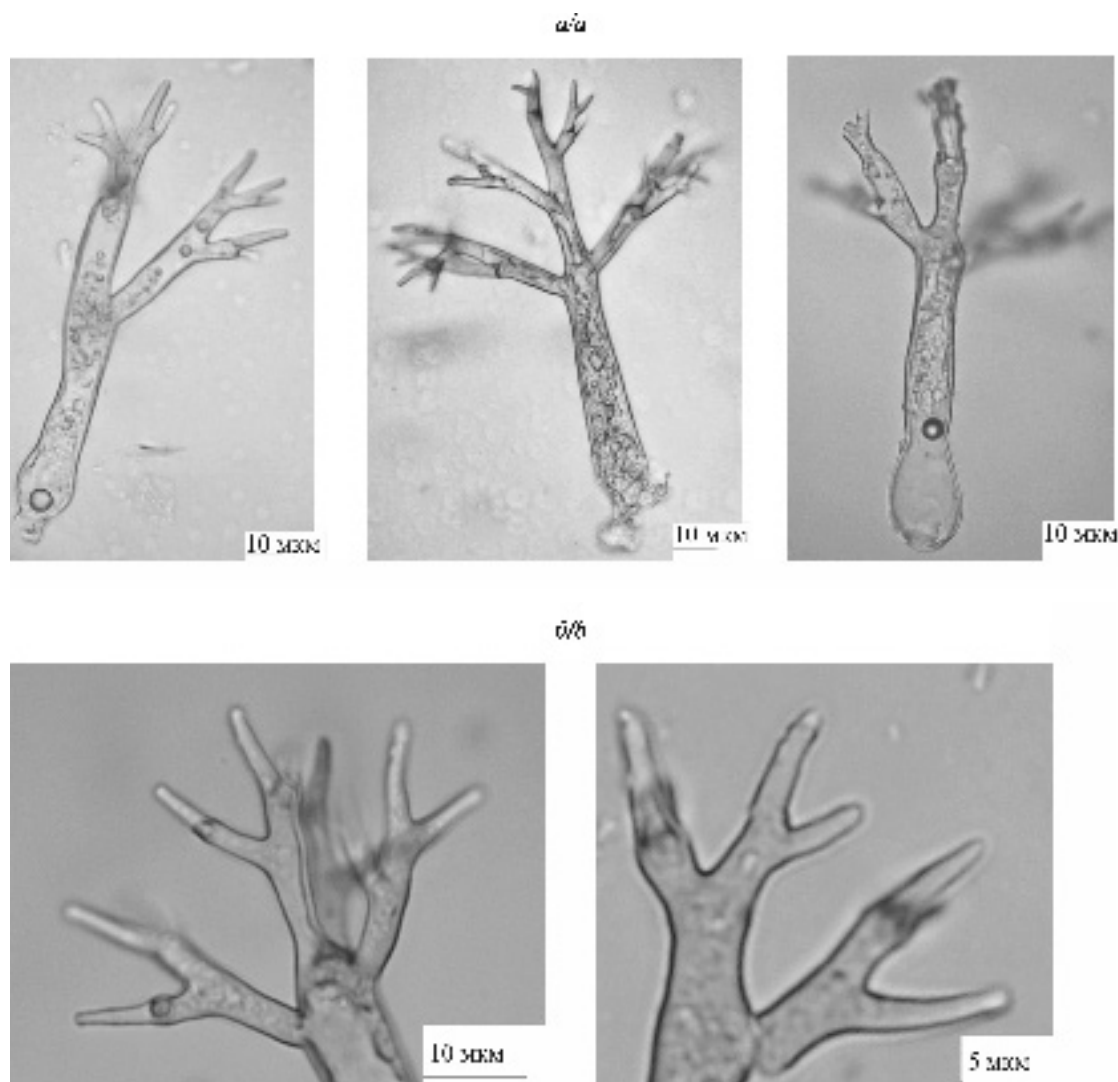


Рис. 2. Конидиеносцы *Peronospora violacea*:
а – общий вид; б – фрагменты с конечными ветвями

Fig. 2. Conidiophores of *Peronospora violacea*:
а – general view; б – fragments with the terminal branches

Новотельновой и Пыстиной: $30\text{--}45 \times 17\text{--}25$ мкм [3, 7, 8]; по Станявичене: $32,4\text{--}43,2 \times 18,9\text{--}24,3$ мкм [5]; по Kochman and Majewski: $28\text{--}40 \times 17\text{--}23$ мкм [6]; по Horáková and Skalický: $23\text{--}35 \times 17\text{--}21$ мкм и $25\text{--}38 \times 16\text{--}22$ мкм [4]) (рис. 3).

Оогонии округлые, желтовато-коричневые, $(36,4\text{--}) 41,0\text{--}(47,6)$ мкм в диаметре (по А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому, Наумову, Новотельновой и Пыстиной: 50 мкм в диаметре [3; 7; 8]). Ооспоры в тканях лепестков, тычинок, пестиков многочисленные, шаровидные, неясно сетчатые, с каштановой оболочкой, $(28,0\text{--}) 29,6\text{--}(33,6)$ мкм в диаметре (по М. В. Ellis and P. J. Ellis: 22–24 мкм в диаметре [14]; по А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому, Наумову, Станявичене, Новотельновой и Пыстиной: 30 мкм в диаметре [3; 5; 7; 8]; по Kochman and Majewski: 32–42 мкм в диаметре [6]) (рис. 4). Интересно заметить,

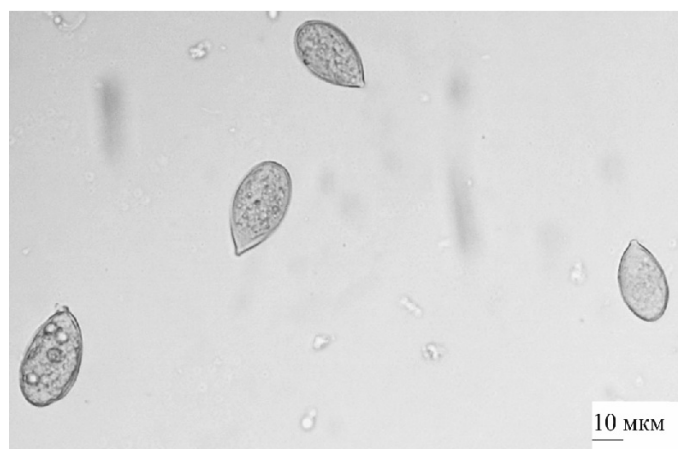


Рис. 3. Конидии *Peronospora violacea*

Fig. 3. Conidia of *Peronospora violacea*

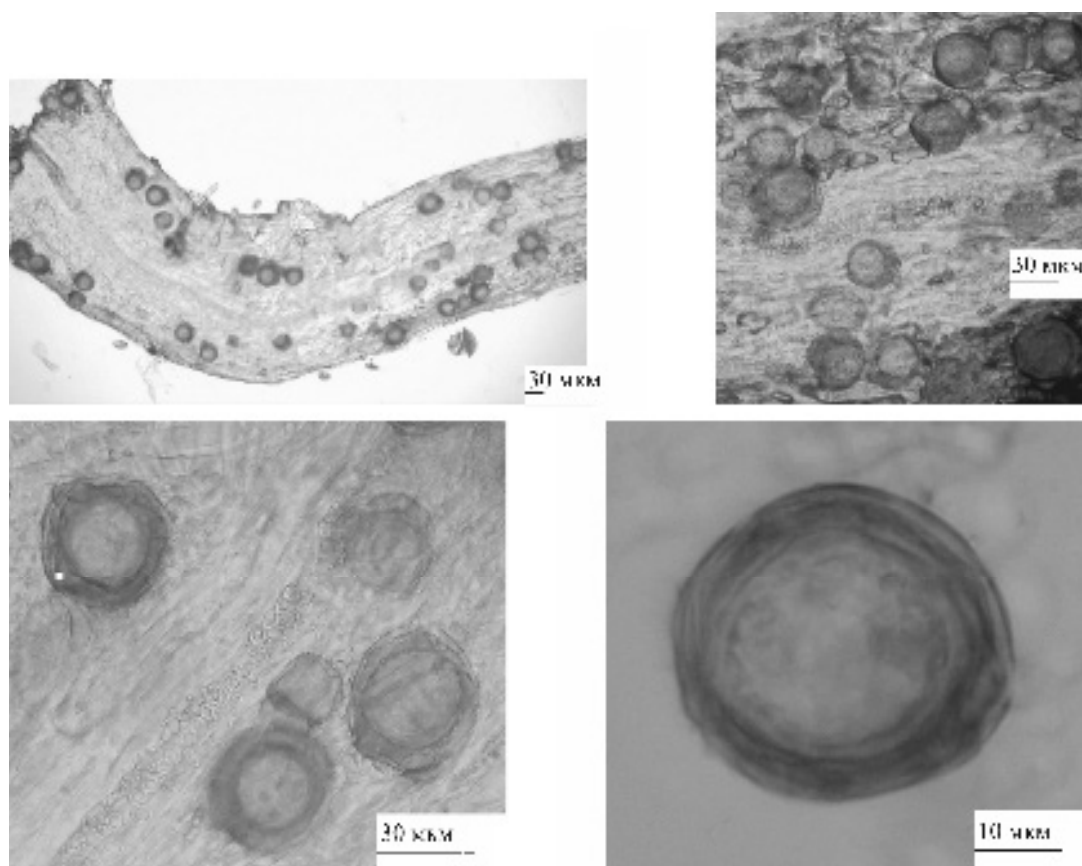


Рис. 4. Ооспоры *Peronospora violacea*

Fig. 4. Oospores of *Peronospora violacea*

что многие исследователи отмечают образование ооспор *P. violacea* преимущественно или только в тычинках [3; 5; 7; 8], в то время как на исследованных нами образцах многочисленные ооспоры наблюдались в различных частях пораженных цветков (лепестки, тычинки, пестики).

Местонахождение изученных образцов: Беларусь, Могилёвская обл., Шкловский р-н, г. Шклов, обочина дороги у Шкловской центральной районной больницы. 13.08.2016. А. К. Храмцов. Гербарий БГУ (MSKU).

Беларусь, Минская обл., Молодечненский р-н, г. п. Радошковичи, обочина на стыке улиц Полоцкой и Лесной. 22.08.2016. А. К. Храмцов. Гербарий БГУ (MSKU) (рис. 5).



Рис. 5. Местонахождение микромицета *Peronospora violacea* на территории Беларуси (на карте отмечены ●)

Fig. 5. Locations of micromycetes *Peronospora violacea* in Belarus (on the map ●)

Учитывая приуроченность *P. violacea* к цветкам растений из семейства Dipsacaceae, его обнаружение в Беларуси возможно, кроме *Knautia arvensis*, на других дикорастущих представителях ворсянковых (*Scabiosa columbaria* L., *S. ochroleuca* L., *Succisa pratensis* Moench, *Succisella inflexa* (Kluk) Beck [17]), а также на видах, которые встречаются в агрофитоценозах нашей республики в качестве декоративных или сорных (например, представители родов *Cephalaria* Schrad., *Dipsacus* L., *Knautia* L., *Scabiosa* L.).

Из числа других представителей рода *Peronospora*, образующих спороношение только на цветках растений-хозяев, можно назвать *P. radii* de Bary (на видах родов *Tripleurospermum*, *Matricaria*, *Chamomilla*, *Leucanthemum*), *P. tranzscheliana* Bakhtin (на *Melampyrum pratense* L.), *P. corollae* Tranzschel (на растениях из рода *Campanula* L.), *P. scutellariae* Gäum. (на *Scutellaria galericulata* L.), *P. stigmaticola* Raunk. (на *Mentha aquatica* L., *M. arvensis* L.) [3–8; 12; 13], *Peronospora jagei* Thines & Kummer (на *Stachys palustris* L.) [18]. Микромицет *P. violacea* является в Беларуси третьим представителем рода *Peronospora*, развивающим спороношение только на цветках хозяев (ранее в нашей республике из этого рода назывались *P. radii* на *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. Bip. [13] и *P. corollae* на *Campanula rotundifolia* L. [19]).

Приведенные сведения о грибоподобном организме *P. violacea* дополняют данные о его распространении, морфометрических характеристиках и могут быть учтены при инвентаризации микобиоты Беларуси. Данные о возможном круге хозяев *P. violacea* в Беларуси будут полезными для выявления больных растений и разработки мероприятий по защите культивируемых ворсянковых от пероноспороза цветков.

Библиографические ссылки

1. Constantinescu O. An annotated list of *Peronospora* names // *Thunbergia*. 1991. № 15. P. 95.
2. Global Biodiversity Information Facility database [Electronic resource]. URL: www.discoverlife.org (date of access: 15.10.2016).
3. Новотельнова Н. С., Пыстина К. А. Флора споровых растений СССР. Л., 1985. Т. XI : Грибы, вып. 3 : Порядок Peronosporales (сем. Pythiaceae, Phytophthoraceae, Peronosporaceae, Cystopaceae). С. 258.
4. Horáková J., Skalický V. Contribution to the ecology of *Peronospora violacea* Berk. // *Česká Mykologie*. 1989. Vol. 43, № 1. P. 13–29.
5. Станявичене С. Пероноспоры грибы Прибалтики. Вильнюс, 1984.
6. Kochman J., Majewski T. Grzyby (Mycota). Warszawa, 1970. T. IV : Glonowce (Phycomycetes), Wroślikowe (Peronosporales). P. 266–267.
7. Ячевский А. А., Ячевский П. А. Определитель грибов. Совершенные грибы (Диплоидные стадии). М. ; Л., 1931. Т. 1 : Фикомицеты. С. 144.
8. Наумов Н. А. Флора грибов Ленинградской области. Архимиды и фикомицеты. М. ; Л., 1954. Вып. 1. С. 110–111.
9. Биоразнообразие Ленинградской области (Водоросли. Грибы. Лишайники. Мохообразные. Беспозвоночные животные. Рыбы и рыбообразные) / под ред. Н. Б. Балашовой, А. А. Заварзина. СПб., 1999. С. 178.
10. Попов Е. С., Коваленко А. Е., Гапиенко О. С. и др. Микобиота Белорусско-Валдайского Поозерья / отв. ред. А. Е. Коваленко. М. ; СПб., 2012. С. 335.
11. Андрианова Т. В., Гаевая В. П., Гелюта В. П. и др. Грибы Украины [Электронный ресурс]. 2006. URL: www.cybertruffle.org.uk/ukrafung/rus (дата доступа: 20.11.2016).
12. Mazelaitis J., Stanevičienė S. Lietuvos grybai. Vilnius, 1995. T. I : Gleivūnai (Myxomycota), Peronosporiečiai (Peronosporales). P. 231.
13. Гурилович И. С. Грибоподобные организмы (порядок Peronosporales) Беларуси. Минск, 2013.
14. Ellis Martin B., Ellis Pamela J. Microfungi on land plants: an Identification Handbook. London ; Sydney, 1985. P. 375.
15. Растительный покров Белоруссии (с картой м. 1 : 1 000 000). Минск, 1969. С. 17–26.
16. Великанов Л. Л., Сидорова И. И., Успенская Г. Д. Полевая практика по экологии грибов и лишайников. М., 1980. С. 46.
17. Определитель высших растений Беларуси / под ред. В. И. Парфенова. Минск, 1999. С. 217.
18. Thines M., Kummer V. Diversity and species boundaries in floricolous downy mildews // *Mycological Progress*. 2013. Vol. 12, issue 2. P. 321–329.
19. Храмов А. К., Тихомиров Вал. Н. *Peronospora corollae* Tranzschel – новый вид грибоподобных организмов в микобиоте Беларуси // Биология, систематика и экология грибов и лишайников в природных экосистемах и агрофитоценозах : материалы II Междунар. науч. конф. (г. Минск – д. Каменюки, 20–23 сент. 2016 г.). Минск, 2016. С. 249–252.

References

1. Constantinescu O. An annotated list of *Peronospora* names. *Thunbergia*. 1991. No. 15. P. 95.
2. Global Biodiversity Information Facility database [Electronic resource]. URL: www.discoverlife.org (date of access: 15.10.2016).
3. Novotel'nova N. S., Pystina K. A. Flora of the cryptogamic plants of the USSR. Leningrad, 1985. Vol. XI : Fungi, issue 3: Order Peronosporales (fam. Pythiaceae, Phytophthoraceae, Peronosporaceae, Cystopaceae). P. 258 (in Russ.).
4. Horáková J., Skalický V. Contribution to the ecology of *Peronospora violacea* Berk. *Česká Mykologie*. 1989. Vol. 43, No. 1. P. 13–29.
5. Stanyavichene S. Downy mildews of Baltic States. Vilnius, 1984 (in Russ.).
6. Kochman J., Majewski T. Grzyby (Mycota). Warszawa, 1970. T. IV : Glonowce (Phycomycetes), Wroślikowe (Peronosporales). P. 266–267 (in Pol.).
7. Yachevskij A. A., Yachevskij P. A. Manual of fungi. Perfect fungi (Diploid stages). Moscow ; Leningrad, 1931. Vol. 1 : Phycomycetes. P. 144 (in Russ.).
8. Naumov N. A. Flora of fungi of Leningrad region. Archimycetes and Phycomycetes. Moscow ; Leningrad, 1954. Issue 1. P. 110–111 (in Russ.).
9. Biodiversity of Leningrad region (Algae. Fungi. Lichens. Bryophytes. Invertebrate animals. Fishes and fishlike organisms) / ed. by N. B. Balashova, A. A. Zavarzin. Saint Petersburg, 1999. P. 178 (in Russ.).
10. Popov E. S., Kovalenko A. E., Gapiyenko O. S., et al. Mycobiota of Belarusian-Valdai Lakeland. Moscow ; Saint Petersburg, 2012. P. 335 (in Russ.).
11. Andrianova T. V., Hayova V. P., Heluta V. P., et al. Fungi of Ukraine [Electronic resource]. 2006. URL: www.cybertruffle.org.uk/ukrafung/rus (date of access: 20.11.2016) (in Russ.).
12. Mazelaitis J., Stanevičienė S. Lietuvos grybai. Vilnius, 1995. T. I : Gleivūnai (Myxomycota), Peronosporiečiai (Peronosporales). P. 231 (in Lith.).
13. Hirylovich I. S. Pseudofungi (order Peronosporales) of Belarus. Minsk, 2013 (in Russ.).
14. Ellis Martin B., Ellis Pamela J. Microfungi on land plants: an Identification Handbook. London ; Sydney, 1985. P. 375.
15. Vegetation cover of Belarus (map s. 1 : 1 000 000). Minsk, 1969. P. 17–26 (in Russ.).
16. Velikanov L. L., Sidorova I. I., Uspenskaya G. D. Field practice on ecology of fungus and lichens. Moscow, 1980. P. 46 (in Russ.).
17. Manual of higher plants of Belarus. Minsk, 1999. P. 217 (in Russ.).
18. Thines M., Kummer V. Diversity and species boundaries in floricolous downy mildews. *Mycological Progress*. 2013. Vol. 12, issue 2. P. 321–329.
19. Khramtsov A. K., Tikhomirov Val. N. *Peronospora corollae* Tranzschel – new species of pseudofungi in Belarusian mycobiota. *Biology, Systematics and Ecology of Fungi and Lichen in Natural and Agricultural Ecosystems* : materialy of the II Mezhdunar. nauchn. konf. (Minsk – Kamenyuki, 20–23 Sept., 2016). Minsk, 2016. P. 249–252 (in Russ.).

**ЗНАЧИТЕЛЬНОЕ СОБЫТИЕ В ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ НАУКЕ:
V МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ОЗЕРНЫЕ ЭКОСИСТЕМЫ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ,
АНТРОПОГЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, КАЧЕСТВО ВОДЫ»**

**SIGNIFICANT EVENT IN HYDROBIOLOGICAL SCIENCE:
V INTERNATIONAL CONFERENCE
«LAKES ECOSYSTEMS: BIOLOGICAL PROCESSES,
ANTROPOGENIC TRANSFORMATION, WATER QUALITY»**

На базе учебно-научного центра «Нарочанская биологическая станция имени Г. Г. Винберга» Белорусского государственного университета с 12 по 17 сентября 2016 г. проходила V Международная научная конференция «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды», организованная научно-исследовательской лабораторией гидроэкологии биологического факультета БГУ, учебно-научным центром «Нарочанская биологическая станция имени Г. Г. Винберга» БГУ и Национальным парком «Нарочанский» при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований. Конференция проводится каждые четыре года, ее тематика охватывает широкий круг вопросов гидробиологии, гидроэкологии, охраны окружающей среды.

Особенность конференции заключалась в том, что она была посвящена памяти известного гидробиолога, член-корреспондента НАН Беларуси, доктора биологических наук, профессора А. П. Остапени (1939–2012). По его инициативе, под его руководством и при его активном участии проходили все предыдущие конференции. Проведение конференции совпало также с 50-летием научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета БГУ, которую А. П. Остапеня возглавлял многие годы, а также с 70-летием со дня организации Нарочанской биологической станции имени Г. Г. Винберга, где под его руководством выполнялись

фундаментальные исследования сотрудниками лаборатории и станции, а также многочисленными специалистами из учреждений стран СНГ. Содержательный доклад о научном творчестве и личности А. П. Остапени был сделан доктором биологических наук главным научным сотрудником научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета БГУ Т. М. Михеевой.

Представленные на конференцию научные доклады были сгруппированы по следующим основным направлениям изучения водных экосистем.

1. Реакция озерных экосистем на изменение природных и антропогенных факторов среды.
2. Структура и продуктивность озерных экосистем.
3. Качество вод и механизмы его формирования.
4. Природные ресурсы озер и проблемы их рационального использования.
5. Чужеродные виды и их роль в водных экосистемах.

В состав международного научного комитета конференции входили 19 видных ученых из 6 стран (Беларусь, Польша, Россия, Украина, Турция, США). К началу мероприятия были опубликованы материалы V Международной научной конференции «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды». С программой

и материалами можно ознакомиться по ссылке: www.research.bsu.by.

Всего в сборнике представлено 196 докладов, подготовленных 413 авторами. Из их числа участие в работе конференции приняли 148 ученых из 17 стран: из России (253), Беларуси (75), Украины (18), Литвы (15), Молдовы (13), Латвии (12), Польши (7), Турции (6), Канады (3), Франции (2), Израиля (2), Китая (2), Армении (1), Абхазии (1), Австралии (1), Финляндии (1), Эфиопии (1). При этом 8 докладов были представлены в соавторстве с учеными бывшего СССР, 10 – в соавторстве с учеными стран дальнего зарубежья. Из них 28 докладов заслушаны на пленарных заседаниях, 73 – на секционных, часть докладов представлены в виде постеров, остальные – с заочным участием. О географической широте охвата изучавшихся озерных экосистем свидетельствуют представленные участниками конференции организации (115) и города (более 60): с востока на запад – от Петропавловска-Камчатского и Южно-Сахалинска (Россия) до Новой Шотландии (Канада), с севера на юг – от Апатитов и Архангельска (Россия) до Муглы (Турция), Хайфы (Израиль), Бахр-Дара (Эфиопия), Мельбурна (Австралия).

Ряд пленарных докладов был посвящен истории гидробиологии, в том числе истории и значению биологических станций, в частности биостанции на оз. Глубоком, имеющей 125-летнюю историю, Нарочанской биологической станции, начавшей свое существование 70 лет назад.

На конференции были представлены и обсуждены доклады по фундаментальным проблемам гидробиологии и экологии: по продукционной гидробиологии (А. Ф. Алимов), долговременным экологическим исследованиям (Л. В. Полищук, Е. А. Мнацаканова, А. Б. Медвинский, Б. В. Адамович, А. А. Протасов и др.). Что касается последней проблемы, то в докладах подчеркивалась выдающаяся роль Нарочанской биологической станции имени Г. Г. Винберга и тех исследований, которые в течение многих лет проводились коллективом под руководством А. П. Остапени.

Большое внимание было уделено проблеме климатических изменений и значению этого явления в жизни водных экосистем (Я. Лукашевич, А. С. Литвинов, А. В. Законнова, В. И. Лазарева и др.).

Выступавшие отмечали, что V Международная научная конференция «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная транс-

формация, качество воды» стала значительным событием в гидробиологической науке. В определенном смысле она представляет собой продолжение некогда весьма плодотворных съездов Всесоюзного гидробиологического общества.

На конференции была принята резолюция, отдельные положения которой приведены ниже.

- Ученые 17 стран, участники V Международной научной конференции «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды», чрезвычайно озабочены сложившейся ситуацией на оз. Байкал, до недавнего времени одном из самых чистых озер планеты, признанном ЮНЕСКО объектом Всемирного наследия. В 2013 г. во многих местах литоральной зоны водоема в результате поступления неочищенных сточных вод сложилась чрезвычайная экологическая ситуация: на дне озера до глубины 5–7 м стали массово развиваться нитчатые макроводоросли. Зарегистрирована также массовая гибель губок и «цветение» воды, вызванное цианобактериями. Необходимо принятие неотложных мер по охране озера, проведению дополнительных исследований с привлечением специалистов различного профиля.

- Конференция отмечает большую значимость многолетних исследований озерных экосистем и необходимость математического анализа долговременных рядов данных с применением новых методов моделирования и надежной предсказуемости возможных изменений.

- В рамках системного подхода к изучению озер необходимо активизировать трофологические исследования как направление, которое носит междисциплинарный характер и отражает функционально-энергетический аспект существования экосистем.

- В рамках глобальной проблемы биоинвазий следует активизировать исследования, связанные с проникновением чужеродных видов, сменой стенотермных фаунистических и флористических комплексов на фоне эвтрофирования водоемов и изменений климата.

- Актуальным является формирование методологии мониторинговых исследований, в частности выявление аддитивных и синергетических эффектов, каскадного характера их взаимодействия.

- Необходимо обратить более пристальное внимание на историко-научные исследования. В год 150-летия экологии об этом говорить особенно важно.

Т. М. Михеева,
доктор биологических наук, доцент

А. А. Протасов,
доктор биологических наук, профессор

НАШИ ЮБИЛЯРЫ

OUR JUBILEE

Галина Трофимовна
МАСЛОВА

Galina Trofimovna
MASLOVA



В минувшем, 2016-м, году 12 ноября отметила юбилей заслуженный работник БГУ, кандидат биологических наук доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета БГУ Галина Трофимовна Маслова.

Г. Т. Маслова родилась в семье военнослужащего в г. Гарделегене (Германия). Окончила среднюю школу № 63 г. Минска. Одновременно с учебой на биологическом факультете БГУ, вечернее отделение которого она успешно окончила в 1972 г., Г. Т. Маслова начинает трудовую деятельность в экспериментальной научно-исследовательской лаборатории Белорусского научно-исследовательского института неврологии, нейрохирургии и физиотерапии сначала лаборантом, а затем младшим научным сотрудником. В 1975 г. она защитила кандидатскую диссертацию на тему «Влияние производных о-бензохинона на окислительно-восстановительный и энергетический обмен митохондрий головного мозга *in vivo* и *in vitro*».

С 1975 г. Галина Трофимовна работает в БГУ сначала в должности старшего, а затем ведущего научного сотрудника в научно-исследовательской лаборатории биоэнергетики (ныне – научно-исследовательская лаборатория физиологии)

при кафедре физиологии человека и животных биологического факультета. В 1978 г. ВАК СССР ей присвоено ученое звание «старший научный сотрудник». В эти годы Галина Трофимовна вместе с другими сотрудниками лаборатории, возглавляемой профессором Е. Ф. Лунцом, участвует в выполнении многочисленных плановых тем, направленных на выявление механизмов ишемических повреждений сердца и мозга, вскрытие основ свободнорадикальных процессов и состояния антиокислительной защитной системы, поиск новых лекарственных средств.

Об успешной работе коллектива свидетельствуют десятки полученных авторских свидетельств и патентов на изобретение, в 16 из которых Г. Т. Маслова выступает в качестве соавтора.

С 2000 г. Галина Трофимовна переходит на должность доцента кафедры физиологии человека и животных. С этого момента она все большее внимание уделяет преподавательской деятельности. Разрабатывает и читает курсы лекций по ряду общих и специальных дисциплин, в том числе «Биология индивидуального развития», «Физико-химические и физиологические основы гомеостаза», ведет лабораторные занятия, руководит многочисленными курсовыми и дипломными

проектами. Работы студентов, выполненные под ее научным руководством, были неоднократно отмечены дипломами республиканского конкурса студенческих научных работ. Единолично и в соавторстве с коллегами кафедры Г. Т. Маслова участвует в подготовке учебно-методических изданий, учебных пособий, курсов лекций, практикумов, методических указаний и статей, число которых превышает 20. Пять из них опубликованы с грифом Министерства образования Республики Беларусь, в том числе учебное пособие «Основы биологии развития» (2013), вышедшее в серии «Классическое университетское издание».

В 2007 г. ВАК Республики Беларусь присваивает Г. Т. Масловой ученое звание «доцент» по специальности «Биология».

Интенсивную преподавательскую деятельность Галина Трофимовна продолжает сочетать с активной научной работой. В частности, ее интерес привлекают механизмы действия низкоинтенсивного лазерного облучения на организм и состояние его биоэлементного гомеостаза в норме и при патологии различного генеза. К 2017 г. ею лично и в соавторстве опубликовано свыше 200 научных работ, включая многочисленные статьи в отечественных и зарубежных научных периодических изданиях.

Г. Т. Маслова более 30 лет занимает должность ученого секретаря совета биологического

факультета, является членом ревизионной комиссии Белорусского общества физиологов.

Научно-педагогическая деятельность Галины Трофимовны отмечена всевозможными наградами БГУ (благодарность, грамоты, почетные грамоты, благодарность ректора), грамотами Белорусского общества физиологов. В 2014 г. одновременно с присвоением звания «Заслуженный работник БГУ» она становится лауреатом премии имени А. Н. Севченко за разработку учебно-методического комплекса «Основы клеточных, молекулярных и генетических механизмов организации и развития живых систем».

Галина Трофимовна пользуется искренним уважением и поддержкой коллектива кафедры физиологии человека и животных, всего биологического факультета за свою открытость, стремление помочь, трудолюбие и оптимизм. Эти качества, а также высокий профессионализм снижали ей заслуженный авторитет среди коллег и студентов.

Коллектив кафедры физиологии человека и животных, деканат, преподаватели и сотрудники биологического факультета, редколлегия издания «Журнал Белорусского государственного университета. Биология» поздравляют Галину Трофимовну со знаменательной датой и желают ей крепкого здоровья, счастья и дальнейших профессиональных успехов.

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Албухайдар А., Потапович А. И., Костюк В. А. Количественная оценка эффективности природных полифенольных соединений как химических фильтров УФ-излучения.....	3
Глушакова Д. Ю., Логвина А. О., Юрин В. М. Закономерности влияния экзогенных сахаридов на морфофизиологические и биохимические показатели гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого...	13
Кирисюк Ю. В., Демидчик В. В. Влияние наночастиц меди на рост каллусной культуры, полученной из незрелых зародышей <i>Triticum aestivum</i> L.....	23
Бондаренко В. Ю., Соколик А. И., Ветошкин А. А., Жабинский В. Н., Хрипач В. А., Демидчик В. В. Анализ воздействия брассиностероидов на рост корней пшеницы с использованием феномных подходов.....	31
Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Скакун Т. Л., Феклстова И. Н., Максимова Н. П. Индукция устойчивости у растений рапса к засолению элиситорами – производными бактерий родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Bacillus</i>	38
Шахрани М., Сидоров А. В. Легочное дыхание и мышечная локомоция <i>Lymnaea stagnalis</i> в условиях хронического закисления среды обитания	44

ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Романчук И. Ю., Анохина В. С., Саук И. Б., Дуксина В. В. Использование алкалоидных и белковых комплексов в качестве маркерных признаков генетической характеристики образцов разных видов люпина.....	49
Веремеенко Е. Г., Шилова Ю. А., Максимова Н. П. Оптимизация методики проведения сайт-направленного мутагенеза с использованием плазмиды pK18mob для бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	56
Совгир Н. В., Голенченко С. Г., Прокулевич В. А. Особенности экспрессии химерного гена антимикробного пептида лягушки и эндолизина бактериофага К в бактериях <i>Escherichia coli</i>	62

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

Куликов Я. К. Агроэкологические особенности земледелия на дерново-подзолистых песчаных почвах Беларуси	71
Михеева Т. М., Свирид А. А., Лукьянова Е. В. Структура и количественное развитие фитопланктона водотоков Национального парка «Припятский»	77
Михеева Т. М., Лукьянова Е. В., Свирид А. А. Структура и количественное развитие фитопланктона озерных водоемов Национального парка «Припятский»	86

СИСТЕМАТИКА

Сауткина Т. А., Пацевич А. И. Сравнительно-морфологическая характеристика <i>Dianthus superbus</i> L. и <i>Dianthus stenocalyx</i> Juz. и распространение их во флоре Беларуси.....	98
Джус М. А. Телоксис остистая (<i>Teloxys aristata</i> (L.) Moq., <i>Amaranthaceae</i> Juss.) – новые адвентивные род и вид для флоры Беларуси.....	105
Гирилович И. С., Лемеза Н. А. <i>Erysiphe macleayae</i> R. Y. Zheng et G. Q. Chen (порядок Erysiphales) – новый инвазивный вид в Беларуси	111
Храмцов А. К. Первые находки микромицета <i>Peronospora violacea</i> Berk. в Беларуси	116

ХРОНИКА, ИНФОРМАЦИЯ

Михеева Т. М., Протасов А. А. Значительное событие в гидробиологической науке: V Международная научная конференция «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды»	122
---	-----

НАШИ ЮБИЛЯРЫ

Галина Трофимовна Маслова.....	124
--------------------------------	-----

CONTENTS

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

<i>Albuhaydar A., Potapovich A. I., Kostyuk V. A.</i> Quantity estimation of effectiveness of natural polyphenolic compounds as chemical UV-sunscreens	3
<i>Hlushakova D. Y., Lohvina H. O., Yurin V. M.</i> The regularity of influence of exogenous saccharide on the morphophysiological and biochemical indices of heterotrophic callus culture of fenugreek	13
<i>Kirysiuk Y. V., Demidchik V. V.</i> Effect of copper nanoparticles on growth of calluses culture from immature embryos of <i>Triticum aestivum</i> L.	23
<i>Bondarenko V. Y., Sokolik A. I., Vetoshkin A. A., Zhabinsky V. N., Khripach V. A., Demidchik V. V.</i> The analysis of brassinosteroid effects on wheat root growth using phenotyping techniques.....	31
<i>Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., Maslak D. V., Sadovskaya L. E., Skakun T. L., Feklistova I. N., Maksimova N. P.</i> Induction of resistance to salinization in rape plants under the influence of elicitors derived from <i>Pseudomonas</i> and <i>Bacillus</i> bacteria	38
<i>Shahrani M., Sidorov A. V.</i> Lung respiration and muscular locomotion of <i>Lymnaea stagnalis</i> at chronic acidification of environment	44

GENETICS, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Ramanchuk I. Y., Anokhina V. S., Sauk I. B., Duksina V. V.</i> Use alkaloid and protein complexes as a marker genetic characteristics of samples of different species of lupine.....	49
<i>Veremeenko E. G., Shilova Y. A., Maximova N. P.</i> Optimization of methods of site-specific mutagenesis for <i>Pseudomonas</i> bacteria genus using pK18mob plasmid vector	56
<i>Sovgir N. V., Golenchenko S. G., Prakulevich U. A.</i> Expression features of hybrid gene of frog antimicrobial peptide and staphylococcal bacteriophage K endolysin in bacteria <i>Escherichia coli</i>	62

ECOLOGY AND CONSERVANCY

<i>Kulikov Ya. K.</i> Agroecological specificities agriculture of sandy soddy-podzolic soils Belarus	71
<i>Mikheeva T. M., Svirid A. A., Lukyanova E. V.</i> Structure and quantitative phytoplankton development of water-courses of the National Park «Pripyatsky».....	77
<i>Mikheeva T. M., Lukyanova E. V., Svirid A. A.</i> Structure and quantitative phytoplankton development in lakes water bodies of the National Park «Pripyatsky»	86

TAXONOMY

<i>Sautkina T. A., Patcevich A. I.</i> Comparative morphological characteristic of <i>Dianthus superbus</i> L. and <i>Dianthus stenocalyx</i> Juz. and their expansion in the flora of Belarus.....	98
<i>Dzhus M. A.</i> Wormseed (<i>Teloxys aristata</i> (L.) Moq., Amaranthaceae Juss.) – new alien genus and species for Belarusian flora	105
<i>Hirilovich I. S., Lemeza N. A.</i> <i>Erysiphe macleayae</i> R. Y. Zheng et G. Q. Chen (order Erysiphales) – a new invasive species in Belarus	111
<i>Khramtsov A. K.</i> First records of micromycetes <i>Peronospora violacea</i> Berk. in Belarus	116

CHRONICLE, INFORMATION

<i>Mikheeva T. M., Protasov A. A.</i> Significant event in hydrobiological science: V International conference «Lakes ecosystems: biological processes, antropogenic transformation, water quality».....	122
--	-----

OUR JUBILEE

Galina Trofimovna Maslova	124
---------------------------------	-----

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

**Журнал Белорусского
государственного университета. Биология.
№ 1. 2017**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4,
220030, Минск.

Почтовый адрес: ул. Кальварийская, 9, каб. 636, 637,
220004, Минск.

Тел. 259-70-74, 259-70-75.

E-mail: vestnikbsu@mail.ru
vestnikbsu@bsu.by

«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология» издается с января 1969 г.
До 2017 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»
(ISSN 2308-9164).

Редактор *Е. В. Павлова*
Технический редактор *Т. А. Караневич*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 29.04.2017.
Тираж 125 экз. Заказ 244.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского
государственного университета».
ЛП № 02330/117 от 14.04.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.

© БГУ, 2017

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 1. 2017**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: Nezavisimosti ave., 4, 220030, Minsk.

Correspondence address: Kal'variiskaya str., 9, office 636, 637,
220004, Minsk.

Tel. 259-70-74, 259-70-75.

E-mail: vestnikbsu@mail.ru
vestnikbsu@bsu.by

«Journal of the Belarusian State University. Biology»
published since January, 1969.
Until 2017 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»
(ISSN 2308-9164).

Editor *E. V. Pavlova*
Technical editor *T. A. Karanevich*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 29.04.2017.
Edition 125 copies. Order number 244.

Publishing Center of BSU.
License for publishing No. 02330/117, 14 April, 2014.
Krasnoarmeiskaya str., 6, 220030, Minsk.

© BSU, 2017