



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

3

2019

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор	СИДОРОВ А. В. – доктор биологических наук, профессор; 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; декан 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), full professor; 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; dean 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.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 581.1

НЕГЕНОМНЫЕ ЭФФЕКТЫ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ: РОЛЬ ИОННЫХ КАНАЛОВ

**Д. Е. СТРЕЛЬЦОВА¹⁾, М. А. ЧЕРНЫШ¹⁾,
П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾**

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

В организме животных стероидные гормоны реализуют физиологическое действие при помощи геномного и негеномного механизмов. Стероидные гормоны растений – брассиностероиды – способны индуцировать экспрессию ряда генов, но для них практически не описаны негеномные пути запуска физиологических эффектов. В настоящей работе выдвигается и теоретически обосновывается теория, согласно которой брассиностероиды, как и стероидные гормоны животных, могут реализовывать свои эффекты через негеномный путь в результате модулирования активности ионных каналов и мембранных рецепторов.

Ключевые слова: стероидные гормоны; брассиностероиды; негеномные эффекты; геномные эффекты, ионные каналы.

Образец цитирования:

Стрельцова ДЕ, Черныш МА, Гриусевич ПВ, Демидчик ВВ. Негеномные эффекты стероидных гормонов: роль ионных каналов. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:3–12. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-3-12>

For citation:

Straltsova DY, Charnysh MA, Hryvusevich PV, Demidchik VV. Non-genomic effects of steroid hormones: role of ion channels. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:3–12. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-3-12>

Авторы:

Дарья Евгеньевна Стрельцова – ассистент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Мария Александровна Черныш – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Полина Вацлавовна Гриусевич – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета.

Authors:

Darya Y. Straltsova, assistant at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. straltsova@bsu.by

Maryia A. Charnysh, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. chernyshmaryia@gmail.com

Palina V. Hryvusevich, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. polinachikun@gmail.com

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; dean at the faculty of biology. dzemidchik@bsu.by

NON-GENOMIC EFFECTS OF STEROID HORMONES: ROLE OF ION CHANNELS

D. Y. STRALTSOVA^a, M. A. CHARNYSH^a,
P. V. HRYVUSEVICH^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: D. Y. Straltsova (straltsova@bsu.by)

In animals, steroid hormones can act using genomic and non-genomic mechanisms. Plant steroid hormones, brassinosteroids, are capable of inducing the expression of some gene ensembles, however their non-genomic pathways for triggering the physiological effects are still unclear. In this paper, we propose the hypothesis on existence of brassinosteroid non-genomic effects in plant cells. This non-genomic pathway could be due to modulation of ion channel activities and modification of membrane receptors.

Keywords: steroid hormones; brassinosteroids; non-genomic effects of hormones; genomic action of hormones; ion channels.

Введение

Важными регуляторными и сигнальными агентами у животных и растений являются стероидные гормоны [1; 2]. Диапазон их действующих концентраций весьма широк: 10^{-12} – 10^{-6} моль/л, при этом эффекты, вызываемые низкими уровнями, могут существенно отличаться от эффектов, индуцируемых высокими концентрациями [3; 4]. В этой связи в последние годы формируется мнение, согласно которому эффекты высоких и низких уровней стероидных гормонов индуцируются различными рецепторами и механизмами. Предполагается, что эффекты низких концентраций стероидов могут реализовываться так называемыми геномными механизмами, т. е. на уровне экспрессии генов (действие обнаруживается спустя часы, сутки), а влияние высоких концентраций подключает негеномные пути, опосредованные прямым воздействием на белковые системы (проявляются в течение нескольких минут) [5; 6].

Геномные механизмы обусловлены связыванием стероидных соединений со специфическими внутриклеточными рецепторами [7; 8]. Комплекс стероидного гормона и рецептора соединяется с ДНК и модулирует образование иРНК. В результате индуцируются стероидзависимые группы белков и происходит соответствующая перестройка метаболизма [7; 8]. В отличие от геномного пути негеномные эффекты не зависят от экспрессии генов, а реализуются в результате прямого влияния стероида на ферменты, белки-регуляторы, биомембраны и другие структурные элементы клетки [9; 10]. Предполагается, что некоторые процессы, традиционно рассматриваемые как «нецелевые» для стероидных гормонов, могут регулироваться данными веществами в результате негеномного действия [11]. Например, высокие уровни стероидных гормонов способны вызывать быструю вазодилатацию и повышать жизнеспособность нейронов [11].

Предложены три основных механизма негеномного действия стероидных гормонов [12; 13]. Во-первых, это влияние путем связывания со стероидными рецепторами плазматической мембраны, которое опосредуется аденилатциклазной сигнальной системой [14–17]. Взаимодействие стероидов с такими рецепторами может привести к активации протеиновых киназ, Ca^{2+} -каналов или стимулировать экзоцитоз [12; 13]. Во-вторых, действие через рецепторы некоторых нейромедиаторов, в частности гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК-рецептор) [12; 13]. В-третьих, это интеркалирование стероидов в мембраны клеток, в результате чего могут изменяться функции мембранных белков, в особенности сигнальных и транспортных [12; 13]. Например, эстроген и прогестерон снижают активность Na^+/K^+ -АТФаз, а прогестерон ингибирует Ca^{2+} -АТФазы. В то же время тестостерон повышает активность данных АТФаз [12; 13; 17–19]. Недавно было обнаружено, что классические рецепторы стероидов могут инициировать образование вторичных посредников или взаимодействовать с другими клеточными системами сигнализации [12–16]. В целом негеномные эффекты индуцируются многократно более высокими уровнями стероидных гормонов [3; 4]. В этом случае соответствующие активности в модельных лабораторных системах наблюдаются при 10^{-6} – 10^{-3} моль/л [3; 4]. В реальных природных условиях такие высокие уровни стероидов достигаются локально, главным образом в результате накопления их в биомембранах [17; 20].

Некоторые современные исследования предполагают существование в клетках животных систем «концентрирования» стероидных гормонов в мембранах клетки, что объясняет высокие значения действующих концентраций данных соединений для негеномных эффектов, регистрируемых *in vitro* [12; 13; 17; 20]. Согласно гипотезе, развиваемой рядом авторов [12; 13; 17; 20; 21], ионные каналы и их липидное окружение могут выступать сенсорными зонами биомембран, воспринимающими изменение концентрации стероидных гормонов в тканях и клетках. Ниже данная концепция рассмотрена детально.

Воздействие стероидных гормонов на ионные каналы животных

В последние два десятилетия было показано, что эндогенные стероиды являются регуляторами ионотропных рецепторов в центральной нервной системе [22–25]. Для стероидов с такими свойствами введен термин «нейроактивные стероиды», или нейростероиды [26; 27]. Они синтезируются в коре головного мозга, гиппокампе и миндалинах, являются регуляторами нервной возбудимости, обладают седативными, противотревожными, обезболивающими и противосудорожными свойствами, влияют на продолжительность жизни нейронов, развитие мозга, процессы обучения, поведение, а также ассоциированы со многими психическими заболеваниями [26; 27]. В то время как действие стероидов на геном требует периода времени от минут до часов, ограниченного скоростью биосинтеза белка и его посттрансляционной активации [28; 29], модулирующие эффекты нейростероидов проявляются в течение от миллисекунд до секунд [28; 29].

Накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что нейростероиды изменяют работу рецепторов нейротрансмиттеров и потенциалзависимых ионных каналов, таких как ГАМК-рецепторы, NMDA-рецепторы, AMPA-рецепторы, $\sigma 1$ -рецепторы, глициновые, каинатные, серотониновые (5-HT), никотиновые и мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, а также Ca^{2+} -, Na^{+} -, K^{+} -каналов и анионных каналов (таблица) [24; 30–35]. Установлено, что различные эндогенные стероиды модулируют функции Cl^{-} -канала, ассоциированного с GABA_A -рецептором [34]. Например, аллопрегненолон, 5 α -андростан-3 α ,17 α -диол (адиол) и 3 α 5 α -тетрагидродеоксикортикостерон (3 α 5 α -THDOC) взаимодействуют с GABA_A -рецептором и активируют выход ионов хлора, что приводит к изменению мембранного потенциала и торможению возбуждающего импульса [24; 34; 35]. В то же время 3 β -ОН стероиды и прегненолон-сульфат (ПС) являются антагонистами GABA_A -рецепторов и индуцируют зависимое от активации ингибирование рецептора [24; 34; 35].

Примеры воздействия стероидных гормонов
на ионотропные рецепторы и ионные каналы клеток животных
Examples of steroid hormone action on ionotropic receptors and ion channels in animals

Ионный канал/ проводимость	Стероид	Эффект	Концентрация	Источник
ГАМК-рецепторы				
GABA_A -рецептор	Андростерон Тестостерон Андростенедиол	Усиление ГАМК-индуцированных токов	Супрафизиологические концентрации	[36]
	Дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС) Дегидроэпиандростерон (ДГЭА)	Ингибирование ГАМК-индуцированных токов	Супрафизиологические концентрации	[36]
NMDA-рецепторы				
NR1-1a/NR2A и NR1-1a/NR2B-рецептор	ПС	Потенцирование, стимуляция гейтинга	21–33 мкмоль/л	[31; 37]
NR1-1a/NR2C- и NR1-1a/NR2D-рецептор	ПС	Блокирование рецепторов	62 мкмоль/л	[38]
Серотониновые рецепторы				
5-HT ₃	17 β -Эстрадиол Прогестерон	Блокирование вызываемых связыванием агониста с рецептором физиологических эффектов	10 мкмоль/л	[39]
Адренергические рецепторы				
α_2 -Адренергические рецепторы	ПС	Активация α_2 -адренергических рецепторов	0,1–3,0 мкмоль/л	[40]

Окончание таблицы
Ending table

Ионный канал/ проводимость	Стероид	Эффект	Концентрация	Источник
σ-Рецепторы				
σ-Рецепторы, связанные с $G_{i/o}$ -белками	ПС	Опосредованное активацией рецептора и повышением цитоплазматической активности Ca^{2+} высвобождение глутамата	≥ 10 мкмоль/л	[41]
AMPA-рецепторы и каинатные рецепторы				
Каинатные рецепторы	ДГЭА ДГЭАС	Ингибирование агонист- индуцированных токов	> 300 мкмоль/л	[36]
AMPA-рецепторы	ДГЭА ДГЭАС	Ингибирование агонист- индуцированных токов	> 300 мкмоль/л	[36]
Потенциалзависимые Ca^{2+}-каналы				
Ca^{2+} -каналы L-типа	Тестостерон Тестостерон	Блокирование Агонист	Физиологические концентрации (наномолярный диапазон) 10 мкмоль/л	[36; 42]
	5β-Дигидротестостерон Андростенедион	Ингибирование Повышение активности цитоплазматического Ca^{2+}	0,1–32,0 мкмоль/л 0,1–10,0 мкмоль/л	[36; 43] [36; 44]
Ca^{2+} -каналы T-типа	ДГЭА и его метаболиты	Ингибирование	2–8 мкмоль/л Супрафизиологические концентрации	[42; 43]
TRP-каналы				
TRPM3	ПС	Повышение цитоплазматической активности ионов Ca^{2+}	23 мкмоль/л	[44–46]
	ДГЭА	Повышение цитоплазматической активности ионов Ca^{2+}	30 мкмоль/л	
TRPC5	5α-Дигидротестостерон ДГЭАС	Подавление входа Ca^{2+}	Супрафизиологические концентрации (микромолярный диапазон концентраций)	[47]
TRPV1	ДГЭА ДГЭАС Эпиандростерон Эпиотихоланолон Тестостерон	Ингибирование	7 мкмоль/л 127 мкмоль/л 5 мкмоль/л 5 мкмоль/л 400 мкмоль/л	[48]
K^{+}-каналы				
Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы большой проводимости (BK_{Ca})	ДГЭА	Активация BK_{Ca}	Микромолярные концентрации	[49]
Потенциалзависимые Na^{+}-каналы				
Потенциалзависимые Na^{+} -каналы	ДГЭАС ДГЭА	Ингибирование	Супрафизиологические концентрации (микромолярный диапазон концентраций)	[50]
Cl^{-}-каналы				
Cl^{-} -каналы	Эстрогены Андрогены	Ингибирование	Супрафизиологические концентрации	[51–53]

Показано, что 5β -восстановленные нейростероиды могут выступать ингибиторами Ca^{2+} -каналов Т-типа в периферических нейронах крыс [32]. Прегненолон и эипрегненолон-сульфат способны потенцировать меластиновый TRP-канал TRPM3 [33]. $(3\beta,5\beta,17\beta)$ -3-Гидроксиандростан-17-карбонитрил блокирует Ca^{2+} -каналы Т-типа, но не имеет прямого влияния на ГАМК-рецепторы или ионотропные глутаматные рецепторы [37]. Эстрогены могут оказывать стимулирующее и ингибирующее действие на Ca^{2+} -чувствительные K^+ -каналы высокой проводимости и Ca^{2+} -каналы L-типа [54]. Дигидротестостерон влияет на Ca^{2+} -каналы L-типа в желудочковых кардиомиоцитах человека [55]. Тестостерон увеличивает экскрецию Ca^{2+} с мочой и ингибирует экспрессию ванилоидного рецептора 5 (TRPV5) в почках и поддерживает гомеостаз Ca^{2+} [56].

В последние годы также продемонстрировано, что нейростероиды оказывают как потенцирующее, так и ингибирующее влияние на NMDA-рецепторы [30]. Взаимодействие нейростероидов с потенциалзависимыми анионными каналами играет роль в формировании пластичности синаптической передачи и регуляции апоптоза [36]. Показано, что гонадные стероиды (17β -эстрадиол и прогестерон) могут выступать в качестве функциональных антагонистов для 5-HT_3 -рецепторов [36; 39]. Функциональные антагонистические свойства для 5-HT_3 -рецепторов также выявлены для эстрадиола, этинилэстрадиола- 17β -эстрадиола, местранола, тестостерона и аллопрегненолона, но не для ПС и холестерина [30; 36].

Механизм влияния стероидов на ионотропные рецепторы нейронов хорошо изучен. Показано, что ПС и ДГЭАС не блокируют Cl^- -канал, ассоциированный с ГАМК_A-рецептором, а, по-видимому, изменяют конформацию рецептора, что, в свою очередь, способствует закрытию канала [57]. Также предполагается, что мембранные фосфолипиды могут участвовать в открытии каналов ГАМК_A-рецептора под действием стероидных гормонов [57]. Функциональная группа $3\alpha\text{-OH}$ стероидов, которая необходима для их взаимодействия с ГАМК_A-рецептором, нарушает систему водородных связей между стеролами и фосфолипидами или белками в мембране [57]. Такое воздействие может обусловить конформационное изменение канала и его гейтинг. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что стероиды способны управлять активностью ионотропных рецепторов через рецепторные белки и их липидное окружение.

Физиологические реакции в растительной клетке, вызываемые высокими уровнями brassinosterоидов

В геноме растений не обнаружено генов представителей суперсемейства ядерных стероидных рецепторов [58–60]. В настоящее время расшифрована структура и продемонстрированы многие функции рецепторов стероидных гормонов растений – BRI1 [58–61]. Показано, что BRI1 – это обогащенная лейциновыми повторами рецепторная киназа, локализованная в плазматической мембране (рис. 1) [58–61].

Обширные «молекулярные» связи системы сигнализации brassinosterоидов (БС) с другими сигнальными путями клетки демонстрируют высокую степень интеграции БС в регуляторных сетях растительного организма [62; 63]. Несмотря на большое количество работ, затрагивающих механизмы рецепции БС, имеются лишь спорадические сведения о негеномном механизме передачи их сигнала [64–68]. Например, продемонстрировано, что у риса 24-эпибрассинолид (1 мкмоль/л) может вызывать изменение экспрессии гена *BUL*, кодирующего образование белка – позитивного регулятора сигналов БС, в течение 15 мин с момента начала обработки [69].

В ряде работ продемонстрировано, что БС, как и стероидные гормоны животных, способны реализовывать свои эффекты посредством модулирования активности ионных каналов [64–68]. Показано, что БС в диапазоне концентраций 100 нмоль/л – 1 мкмоль/л могут повышать цитоплазматическую активность Ca^{2+} в листьях *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., что указывает на возможность активации Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов [64]. Также установлено, что DWARF1 – фермент, участвующий в биосинтезе БС, активируется Ca^{2+} /кальмодулином (CaM) [65]. В ряде работ показано, что Ca^{2+} -связывающий белок CaM может связываться с BRI1 и влиять на его активность [64; 65; 67]. Например, повышенная гетерологическая экспрессия CaM и цитозольного домена BRI1 в *E. coli* приводит к ингибированию автофосфорилирования и трансфосфорилирования BRI1 [64; 65]. Предполагается, что увеличение цитоплазматической активности Ca^{2+} может «выключать» трансдукцию сигнала БС в ходе взаимодействия CaM и BRI1 [64; 65].

В работе на суспензионных клетках *Arabidopsis thaliana* установлено, что 28-гомобрассинолид и 28-гомокастастерон в диапазоне концентраций $0,1\text{--}100,0\text{ мкмоль/л}$ способны модифицировать активность анионных каналов и наружувывпрямляющих K^+ -каналов плазматической мембраны [68]. При этом 28-гомобрассинолид ингибирует анионные каналы и активирует наружувывпрямляющие калиевые каналы, а 28-гомокастастерон подавляет активность обоих типов каналов [68].

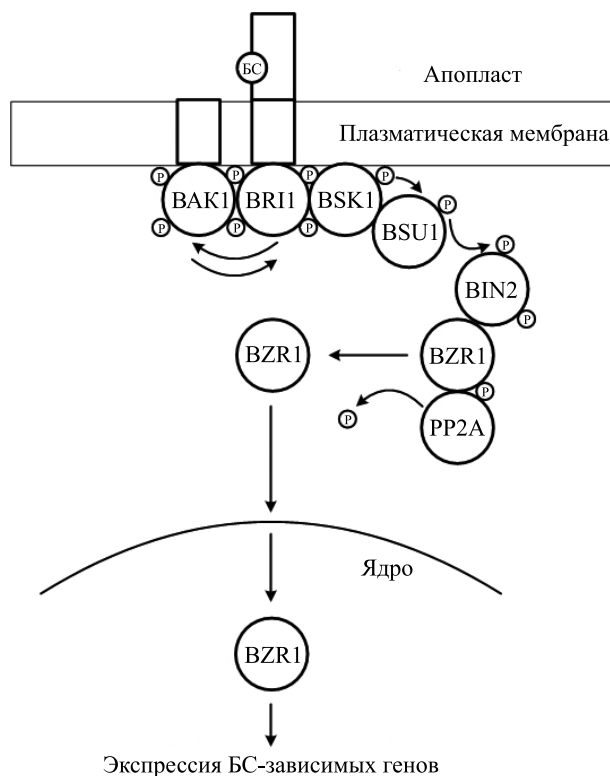


Рис. 1. Рецепция и передача сигнала БС.

После присоединения БС к BRI1 данный рецептор автофосфорилирует по серинтреониновым или тирозиновым остаткам. Для активного состояния рецептора также необходимо его взаимодействие и образование гетеродимера с корецептором серинтреониновой протеинкиназы BAK1. BRI1 и BAK1 могут взаимно фосфорилировать друг друга. BRI1, активированный автофосфорилированием после связывания БС, фосфорилирует киназы BSK1 и CDG1, которые, в свою очередь, взаимодействуют и фосфорилируют фосфатазу супрессор-1 BRI1, способную дефосфорилировать и ингибировать GSK3/SHAGGY-подобную протеинкиназу BIN2. Это приводит к накоплению в ядре нефосфорилированных факторов транскрипции BZR1 и BES1 и их последующему присоединению к ДНК и активации или подавлению экспрессии БС-зависимых генов

Fig. 1. Brassinosteroid perception and signal transduction.

Binding of brassinosteroid activates BRI1 kinase and causes autophosphorylation of BRI1 at serinethreonine or tyrosine. BRI1 interacts with BAK1 to induce the cross-phosphorylation at multiple residues. BRI1 activation recruits the co-receptor kinase BRI1-Associated Receptor Kinase1 (BAK1). Upon BR-induced activation, BRI1 phosphorylates members of plasma membrane-anchored cytoplasmic kinases, such as BSK1 and CDG1. This phosphorylation promotes BSK1 and CDG1 binding to and phosphorylation of the phosphatase BSU1. BSU1 inactivates the GSK3-like kinase BIN2 by dephosphorylating a conserved tyrosine residue. Then two homologous transcription factors BZR1 and BES1 are dephosphorylated. Dephosphorylated BZR1 and BES1 can then move into the nucleus and bind to promoters of target genes leading to their activation or repression

Гипотеза о негеномных механизмах действия БС

Анализ литературных данных показал, что БС влияют на важнейшие биологические процессы, такие как рост, метаболизм, клеточный транспорт и внутриклеточная сигнализация, биосинтез клеточной стенки, образование компонентов хроматина и цитоскелета, закрытие устьиц и др. [70–72]. Растения с нарушенным биосинтезом БС или растения, дефектные по трансдукции сигнала, характеризуются выраженными изменениями фенотипа [73–75]. В большом количестве работ указывается на то, что БС обладают стресс-протекторными свойствами и способны модулировать активность и количество различных непротеиногенных аминокислот, осмотиков, шаперонов, коротких пептидов, аминов и ферментов, ответственных за адаптацию к стрессовым воздействиям [76–79].

В последнее десятилетие сигналинг БС у растений активно изучался с помощью сочетания генетических, протеомных и геномных методов и подходов. Тем не менее пока неизвестны пути контроля эффектов широкого диапазона уровней БС в тканях и органах растения. Существует лишь небольшое количество данных о том, как путь БС интегрируется с другими процессами передачи сигналов и многими клеточными физиологическими явлениями, такими как рецепторные реакции, внутриклеточный транспорт, активность цитоскелета и т. д. [80–82]. Одним из центральных нерешенных вопросов в области исследования БС остается механизм быстрых реакций наподобие негеномных эффектов в клетках

животных, вызываемых данными стероидными гормонами, т. е. собственно непосредственных последствий взаимодействия с рецепторами, ионными каналами, активными транспортерами и другими мишенями. Имеются лишь единичные работы по выявлению влияния БС (микромольные и субмиллимольные уровни) на транспортные и сигнальные явления, опосредуемые ионными каналами в растительной клетке [64; 68; 83]. Систематического электрофизиологического анализа проводимостей плазматической мембраны, регулируемых БС, пока не проведено.

В физиологии растений устоялась концепция, согласно которой БС оказывают воздействие на растительную клетку в крайне низких концентрациях (начиная с 10^{-12} моль/л) [84–86]. Действительно, опыты, в которых гормоны вводились в таких концентрациях, показали небольшие физиологические модификации на уровне ростовых процессов и развития тканей и органов растений [84–86]. Тем не менее физиологическая значимость интактного пула БС в данном концентрационном диапазоне пока не продемонстрирована. Динамика уровня БС в клетке, его пространственное распределение пока остаются неисследованными. Не показано, например, что рецептор BRI1 способен взаимодействовать с БС в низких концентрациях с проявлением физиологической активности [61; 87]. Наоборот, уровни БС около 10^{-6} моль/л и выше были способны напрямую активировать сигнальные явления в модельных клеточных системах, в частности быстрый вход Ca^{2+} в цитоплазму [21; 64]. В то же время примеров быстрых сигнальных изменений при добавлении во внеклеточное пространство наномольных концентраций БС в литературе не отмечено. Это может быть связано с тем, что уровень БС в тканях анализировался тотально, в то время как распределение гормонов, вероятно, является неравномерным, возможно с местами высокого (хот-спотс) и низкого накопления.

Не решен также вопрос потенциального накопления БС в липидной фазе. Поскольку БС – это липофильные соединения, их аккумуляция в мембранах представляется вероятной. Тем более что примеры «концентрирования» стероидов отмечены у животных для эстрогенов [17; 20]. В этом случае локальная (хот-спот) концентрация БС в мембранах и около них может быть значительно выше тотального «организменного» уровня. Возможно, вблизи локализованного в плазматической мембране BRI1 уровни БС могут достигать высоких значений (вплоть до микромольных) (рис. 2). В подтверждение этих предположений другие известные типы рецепторов у высших растений проявляют активность в микромольном диапазоне активирующих лигандов [88–90].

На основе приведенных фактов можно выдвинуть гипотезу, согласно которой БС способны к локальному «концентрированию» в липидных компартментах и отдельных зонах клетки (хот-спотс), и вызывать изменения в работе ионных каналов и сигнальных путей, т. е. важнейших системах первичной индукции регуляторных сигналов и регуляции ионного баланса. Будущие исследования, в частности детальный анализ накопления БС в растительных мембранах и изучение их влияния на сигнальные пути клетки, смогут протестировать обоснованность данной гипотезы экспериментально.

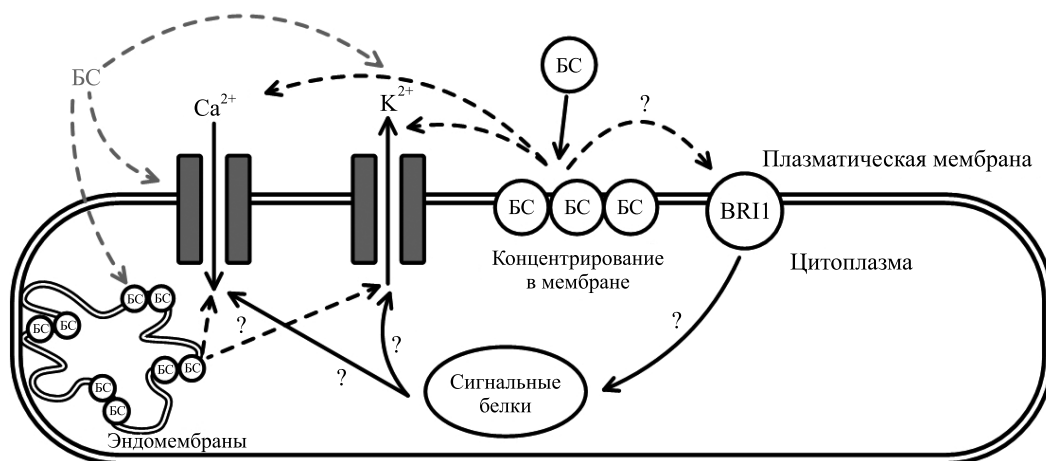


Рис. 2. Предполагаемые негеномные механизмы действия БС.

Возможно, БС, как и стероидные гормоны животных, могут реализовывать свои эффекты через негеномный путь – в результате модулирования активности ионных каналов и мембранных рецепторов. Предполагается, что БС способны к локальному «концентрированию» в липидных компартментах и могут вызывать изменения в работе ионных каналов и в дальнейшем опосредуемых ими сигнальных путей

Fig. 2. Hypothetical non-genomic action of brassinosteroids.

Hypothetically, non-genomic pathways of brassinosteroids are based on could due to the modulation of ion channel activities and other direct interactions with proteins or lipids in plant cells modification of membrane receptors. It can be suggested that brassinosteroids intercalate into the lipid compartments modulating ion channel activities and modifying processes of signal transduction

Библиографические ссылки / References

1. Rudolph LM, Cornil CA, Mittelman-Smith MA, Rainville JR, Remage-Healey L, Sinchak K, et al. Actions of steroids: new neurotransmitters. *The Journal of Neuroscience*. 2016;36(45):11449–11458. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2473-16.2016.
2. Bulun SE. Steroids, cytokines, and implantation. *Endocrinology*. 2017;158(6):1575–1576. DOI: 10.1210/en.2017-00407.
3. Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annual Review of Physiology*. 1997;59:365–393. DOI: 10.1146/annurev.physiol.59.1.365.
4. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, non-genomic effects. *Pharmacological Reviews*. 2000;52(4):513–556. PMID: 11121509.
5. Rolf L, Damoiseaux J, Hupperts R, Huitinga I, Smolders J. Network of nuclear receptor ligands in multiple sclerosis: common pathways and interactions of sex-steroids, corticosteroids and vitamin D3-derived molecules. *Autoimmunity Reviews*. 2016;15(9):900–910. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.07.002.
6. Barabás K, Godó S, Lengyel F, Ernszt D, Pál J, Ábrahám IM. Rapid non-classical effects of steroids on the membrane receptor dynamics and downstream signaling in neurons. *Hormones and Behavior*. 2018;104:183–191. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2018.05.008.
7. Wang C, Liu Y, Cao J-M. G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(9):15412–15425. DOI: 10.3390/ijms150915412.
8. Hampl R, Kubátová J, Stárka L. Steroids and endocrine disruptors – history, recent state of art and open questions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016;155(Part B):217–223. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.013.
9. Weng JH, Chung BC. Nongenomic actions of neurosteroid pregnenolone and its metabolites. *Steroids*. 2016;111:54–59. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.01.017.
10. Falkenstein E, Wehling M. Nongenomically initiated steroid actions. *European Journal of Clinical Investigation*. 2000;30 Supplement 3:51–54. DOI: 10.1046/j.1365-2362.2000.0300s3051.x.
11. Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology*. 2003;148(3):281–292. DOI: 10.1530/eje.0.1480281.
12. Whiting KP, Restall CJ, Brain PF. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sciences*. 2000;67(7):743–757. DOI: 10.1016/S0024-3205(00)00669-X.
13. Abboud R, Charcosset C, Greige-Gerges H. Biophysical methods: complementary tools to study the influence of human steroid hormones on the liposome membrane properties. *Biochimie*. 2018;153:13–25. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.02.005.
14. Kelly MJ, Lagrange AH, Wagner EJ, Rønnekleiv OK. Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids*. 1999;64(1–2):64–75. DOI: 10.1016/S0039-128X(98)00095-6.
15. Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2000;279(1):132–139. DOI: 10.1152/ajpendo.2000.279.1.E132.
16. Kelly MJ, Qiu J, Wagner EJ, Rønnekleiv OK. Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2002;83(1–5):187–193. DOI: 10.1016/S0960-0760(02)00249-2.
17. Wenz JJ. Molecular properties of steroids involved in their effects on the biophysical state of membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2015;1848(10 Part A):2448–2459. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.07.017.
18. Deliconstantinos G, Fotiou S. Sex steroid and prostaglandin interactions upon the purified rat myometrial plasma membranes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1986;45(2–3):149–156. DOI: 10.1016/0303-7207(86)90142-5.
19. Deliconstantinos G. Structure activity relationship of cholesterol and steroid hormones with respect to their effects on the Ca²⁺-stimulated ATPase and lipid fluidity of synaptosomal plasma membranes from dog and rabbit brain. *Comparative Biochemistry & Physiology. Part B: Comparative Biochemistry*. 1988;89(3):585–594. DOI: 10.1016/0305-0491(88)90178-2.
20. Wenz JJ. Predicting the effect of steroids on membrane biophysical properties based on the molecular structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2012;1818(3):896–906. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.12.021.
21. Straltsova D, Chykyun P, Subramaniam S, Sosan A, Kolbanov D, Sokolik A, et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants. *Steroids*. 2015;97:98–106. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.10.008.
22. Cheng WWL, Chen ZW, Bracamontes JR, Budelier MM, Krishnan K, Shin DJ, et al. Mapping two neurosteroid-modulatory sites in the prototypic pentameric ligand-gated ion channel GLIC. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(8):3013–3027. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000359.
23. Chen ZW, Bracamontes JR, Budelier MM, Germann AL, Shin DJ, Kathiresan K, et al. Multiple functional neurosteroid binding sites on GABA_A receptors. *PLOS Biology*. 2019;17(3):e3000157. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000157.
24. Carta MG, Paribello P, Preti A. How promising is neuroactive steroid drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2018;13(11):993–995. DOI: 10.1080/17460441.2018.1518974.
25. Gunn BG, Cunningham L, Mitchell SG, Swinny JD, Lambert JJ, Belelli D. GABA_A receptor-acting neurosteroids: a role in the development and regulation of the stress response. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2015;36:28–48. DOI: 10.1016/j.yfrne.2014.06.001.
26. Porcu P, Barron AM, Frye CA, Walf AA, Yang SY, He XY, et al. Neurosteroidogenesis today: novel targets for neuroactive steroid synthesis and action and their relevance for translational research. *Journal of Neuroendocrinology*. 2016;28(2):12351. DOI: 10.1111/jne.12351.
27. Joksimovic SL, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Neurosteroids in pain management: a new perspective on an old player. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1127. DOI: 10.3389/fphar.2018.01127.
28. Wilkenfeld SR, Lin C, Frigo DE. Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. *Steroids*. 2018;133:2–7. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.11.005.
29. Schverer M, Lanfumey L, Baulieu E-E, Froger N, Villey I. Neurosteroids: non-genomic pathways in neuroplasticity and involvement in neurological diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018;191:190–206. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.011.
30. Holubova K, Nekovarova T, Pistovcakova J, Sulcova A, Stuchlik A, Vales K. Pregnanolone glutamate, a novel use-dependent NMDA receptor inhibitor, exerts antidepressant-like properties in animal models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014;16(8):130. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00130.
31. Vyklicky V, Krausova B, Cerny J, Balik A, Zapotocky M, Novotny M, et al. Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Scientific Reports*. 2015;5:10935. DOI: 10.1038/srep10935.

32. Atluri N, Joksimovic SM, Oklopčic A, Milanovic D, Klawitter J, Eggan P, et al. A neurosteroid analogue with T-type calcium channel blocking properties is an effective hypnotic, but is not harmful to neonatal rat brain. *British Journal of Anaesthesia*. 2018;120(4):768–778. DOI: 10.1016/j.bja.2017.12.039.
33. Sághy É, Szőke É, Payrits M, Helyes Z, Börzsei R, Erőstyák J, et al. Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca^{2+} -gating of transient receptor potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacological Research*. 2015;100:101–116. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.07.028.
34. Darbandi-Tonkabon R, Manion BD, Hastings WR, Craigen WJ, Akk G, Bracamontes JR, et al. Neuroactive steroid interactions with voltage-dependent anion channels: lack of relationship to GABA_A receptor modulation and anesthesia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;308(2):502–511. DOI: 10.1124/jpet.103.058123.
35. Tuem KB, Atey TM. Neuroactive steroids: receptor interactions and responses. *Frontiers in Neurology*. 2017;8:442. DOI: 10.3389/fneur.2017.00442.
36. Hill M, Dušková M, Stárka L. Dehydroepiandrosterone, its metabolites and ion channels. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2015;145:293–314. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.05.006.
37. Ogden KK, Traynelis SF. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011;32(12):726–733. DOI: 10.1016/j.tips.2011.08.003.
38. Horak M, Vlcek K, Choudounska H, Vyklicky LJr. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience*. 2006;137(1):93–102. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.058.
39. Thompson AJ, Lummis SCR. 5-HT₃ receptors. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12(28):3615–3630. DOI: 10.2174/138161206778522029.
40. Wang ZM, Qi YJ, Wu PY, Zhu Y, Dong YL, Cheng ZX, et al. Neuroactive steroid pregnenolone sulphate inhibits long-term potentiation via activation of α_2 -adrenoreceptors at excitatory synapses in rat medial prefrontal cortex. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2008;11(5):611–624. DOI: 10.1017/S1461145707008334.
41. Meyer DA, Carta M, Partridge LD, Covey DF, Valenzuela CF. Neurosteroids enhance spontaneous glutamate release in hippocampal neurons. Possible role of metabotropic σ_1 -like receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(32):28725–28732. DOI: 10.1074/jbc.M202592200.
42. Alvarez E, Cairrão E, Morgado M, Morais C, Verde I. Testosterone and cholesterol vasodilation of rat aorta involves L-type calcium channel inhibition. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2010;2010:534184. DOI: 10.1155/2010/534184.
43. Montañó LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquía M. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca^{2+} channel activity, and 5 β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca^{2+} channel blockade. *Endocrinology*. 2008;149(5):2517–2526. DOI: 10.1210/en.2007-1288.
44. Machelon V, Nome F, Tesarik J. Nongenomic effects of androstenedione on human granulosa luteinizing cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(1):263–269. DOI: 10.1210/jcem.83.1.4523.
45. Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C. Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca^{2+} channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;318(2):503–506. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.04.054.
46. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*. 2003;83(1):117–161. DOI: 10.1152/physrev.00018.2002.
47. Chen SC, Chang TJ, Wu FS. Competitive inhibition of the capsaicin receptor mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;311(2):529–536. DOI: 10.1124/jpet.104.069096.
48. Majeed Y, Amer MS, Agarwal AK, McKeown L, Porter KE, O'Regan DJ, et al. Stereo-selective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids. *British Journal of Pharmacology*. 2011;162(7):1509–1520. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01136.x.
49. King JT, Lovell PV, Rishniw M, Kotlikoff MI, Zeeman ML, McCobb DP. β_2 and β_4 subunits of BK channels confer differential sensitivity to acute modulation by steroid hormones. *Journal of Neurophysiology*. 2006;95(5):2878–2888. DOI: 10.1152/jn.01352.2005.
50. Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Okura D, et al. Inhibition by pregnenolone sulphate, a metabolite of the neurosteroid pregnenolone, of voltage-gated sodium channels expressed in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2012;120(1):54–58. DOI: 10.1254/jphs.12106SC.
51. Hardy SP, Valverde MA. Novel plasma membrane action of estrogen and antiestrogens revealed by their regulation of a large conductance chloride channel. *FASEB Journal*. 1994;8(10):760–765. DOI: 10.1096/fasebj.8.10.8050676.
52. Li Z, Niwa Y, Sakamoto S, Chen X, Nakaya Y. Estrogen modulates a large conductance chloride channel in cultured porcine aortic endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2000;35(3):506–510. DOI: 10.1097/00005344-200003000-00023.
53. Leung GP, Cheng-Chew SB, Wong PY. Nongenomic effect of testosterone on chloride secretion in cultured rat efferent duct epithelia. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2001;280(5):C1160–C1167. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.5.C1160.
54. Kow LM, Pfaff DW. Rapid estrogen actions on ion channels: a survey in search for mechanisms. *Steroids*. 2016;111:46–53. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.02.018.
55. Er F, Gassanov N, Brandt MC, Madershahian N, Hoppe UC. Impact of dihydrotestosterone on L-type calcium channels in human ventricular cardiomyocytes. *Endocrine Research*. 2009;34(3):59–67. DOI: 10.1080/07435800903136953.
56. Na T, Peng JB. TRPV5: a Ca^{2+} channel for the fine-tuning of Ca^{2+} reabsorption. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2014;222:321–357. DOI: 10.1007/978-3-642-54215-2_13.
57. Majewska MD. Steroids and ion channels in evolution: from bacteria to synapses and mind. Evolutionary role of steroid regulation of GABA(A) receptors. *Acta Neurobiologiae Experimentalis Journal*. 2007;67(3):219–233. PMID: 17957902.
58. Li J. Brassinosteroids signal through two receptor-like kinases. *Current Opinion in Plant Biology*. 2003;6(5):494–499. DOI: 10.1016/S1369-5266(03)00088-8.
59. Jaillais Y, Vert G. Brassinosteroid signaling and BRI1 dynamics went underground. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016;33:92–100. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.06.014.
60. Wang W, Bai M-Y, Wang Z-Y. The brassinosteroid signaling network – a paradigm of signal integration. *Current Opinion in Plant Biology*. 2014;21:147–153. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.07.012.
61. Bojar D, Martinez J, Santiago J, Rybin V, Bayliss R, Hothorn M. Crystal structures of the phosphorylated BRI1 kinase domain and implications for brassinosteroid signal initiation. *Plant Journal*. 2014;78(1):31–43. DOI: 10.1111/tpj.12445.

62. Nolan T, Chen J, Yin Y. Cross-talk of brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses. *Biochemical Journal*. 2017;474(16):2641–2661. DOI: 10.1042/BCJ20160633.
63. Li Q-F, He J-X. Mechanisms of signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins. *Plant Signaling & Behavior*. 2013;8(7):e24686. DOI: 10.4161/psb.24686.
64. Zhao Y, Qi Z, Berkowitz GA. Teaching an old hormone new tricks: cytosolic Ca^{2+} elevation involvement in plant brassinosteroid signal transduction cascades. *Plant Physiology*. 2013;163(2):555–565. DOI: 10.1104/pp.112.213371.
65. Du L, Poovaiah BW. Ca^{2+} /calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature*. 2005;437(7059):741–745. DOI: 10.1038/nature03973.
66. Singla B, Chugh A, Khurana JP, Khurana P. An early auxin-responsive Aux/IAA gene from wheat (*Triticum aestivum*) is induced by epibrassinolide and differentially regulated by light and calcium. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(15):4059–4070. DOI: 10.1093/jxb/erl182.
67. Oh MH, Kim HS, Wu X, Clouse SD, Zielinski RE, Huber SC. Calcium/calmodulin inhibition of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase provides a possible link between calcium and brassinosteroid signalling. *Biochemical Journal*. 2012;443(2):515–523. DOI: 10.1042/BJ20111871.
68. Zhang Z, Ramirez J, Reboutier D, Brault M, Trouverie J, Pennarun AM, et al. Brassinosteroids regulate plasma membrane anion channels in addition to proton pumps during expansion of *Arabidopsis thaliana* cells. *Plant and Cell Physiology*. 2005;46(9):1494–1504. DOI: 10.1093/pcp/pci162.
69. Tanaka A, Nakagawa H, Tomita C, Shimatani Z, Ohtake M, Nomura T, et al. BRASSINOSTEROID UPREGULATED1, encoding a helix-loop-helix protein, is a novel gene involved in brassinosteroid signaling and controls bending of the lamina joint in rice. *Plant Physiology*. 2009;151(2):669–680. DOI: 10.1104/pp.109.140806.
70. Planas-Riverola A, Gupta A, Betegón-Putze I, Bosch N, Ibañes M, Caño-Delgado AI. Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*. 2019;146(5):dev151894. DOI: 10.1242/dev.151894.
71. Lozano-Durán R, Zipfel C. Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in Plant Science*. 2015;20(1):12–19. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.09.003.
72. Wei Z, Li J. Brassinosteroids regulate root growth, development, and symbiosis. *Molecular Plant*. 2016;9(1):86–100. DOI: 10.1016/j.molp.2015.12.003.
73. Chen E, Zhang X, Yang Z, Zhang C, Wang X, Ge X, et al. BR deficiency causes increased sensitivity to drought and yield penalty in cotton. *Plant Biology*. 2019;19(1):220. DOI: 10.1186/s12870-019-1832-9.
74. Song X-J. Crop seed size: BR matters. *Molecular Plant*. 2017;10(5):668–669. DOI: 10.1016/j.molp.2017.04.007.
75. Zhu ZX, Zhu XF, Zhu YT, Yao DN, Xuan YH. Interaction between photoreceptors and BR signaling in *Arabidopsis*. *Acta Biologica Cracoviensis. Series: Botanica*. 2014;56(2):126–135. DOI: 10.2478/abcsb-2014-0027.
76. Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:537. DOI: 10.3389/fpls.2017.00537.
77. Foyer CH, Rasool B, Davey JW, Hancock RD. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(7):2025–2037. DOI: 10.1093/jxb/erw079.
78. Oosten MJV, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2017;4:5. DOI: 10.1186/s40538-017-0089-5.
79. Saitanis CJ, Lekkas DV, Agathokleous E, Flouri F. Screening agrochemicals as potential protectants of plants against ozone phytotoxicity. *Environmental Pollution*. 2015;197:247–255. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.11.013.
80. Kühn C. Review: post-translational cross-talk between brassinosteroid and sucrose signaling. *Plant Science*. 2016;248:75–81. DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.04.012.
81. Lanza M, Garcia-Ponce B, Castrillo G, Catarecha P, Sauer M, Rodriguez-Serrano M, et al. Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Developmental Cell*. 2012;22(6):1275–1285. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.04.008.
82. Lozano-Elena F, Planas-Riverola A, Vilarrasa-Blasi J, Schwab R, Caño-Delgado AI. Paracrine brassinosteroid signaling at the stem cell niche controls cellular regeneration. *Journal of Cell Science*. 2018;131:jcs204065. DOI: 10.1242/jcs.204065.
83. Azhar N, Su N, Shabala L, Shabala S. Exogenously applied 24-epibrassinolide (EBL) ameliorates detrimental effects of salinity by reducing K^{+} efflux via depolarization-activated K^{+} channels. *Plant and Cell Physiology*. 2017;58(4):802–810. DOI: 10.1093/pcp/pcx026.
84. Arora N, Bhardwaj R, Sharma P, Arora HK. 28-Homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt treated maize (*Zea mays* L.) plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2008;20(2):153–157. DOI: 10.1590/S1677-04202008000200007.
85. Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P. Brassinosteroids confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta*. 2007;225(2):353–364. DOI: 10.1007/s00332-007-0353-3.
86. Bajguz A, Piotrowska-Niczyporuk A. Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiphyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014;80:176–183. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.04.009.
87. Kinoshita T, Caño-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S, et al. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*. 2005;433(7022):167–171. DOI: 10.1038/nature03227.
88. Savelieva EM, Oslovsky VE, Karlov DS, Kurochkin NN, Getman IA, Lomin SN, et al. Cytokinin activity of N^6 -benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors in planta, *in vitro*, and *in silico*. *Phytochemistry*. 2018;149:161–177. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.02.008.
89. Uzunova VV, Quareshy M, del Genio CI, Napier RM. Tomographic docking suggests the mechanism of auxin receptor TIR1 selectivity. *Open Biology*. 2016;6(10):160139. DOI: 10.1098/rsob.160139.
90. Quareshy M, Uzunova V, Prusinska JM, Napier RM. Assaying auxin receptor activity using SPR assays with F-box proteins and Aux/IAA degrons. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1497:159–191. DOI: 10.1007/978-1-4939-6469-7_15.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ NaCl-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ И ИНДУКЦИИ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КОРНЕ ПОДСОЛНЕЧНИКА

В. С. МАЦКЕВИЧ¹⁾, С. Н. ЗВОНАРЕВ¹⁾, А. А. ШИКЕР¹⁾,
О. А. ТУРОВЕЦ²⁾, И. И. СМОЛИЧ¹⁾, А. И. СОКОЛИК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

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

²⁾Полесский институт растениеводства НАН Беларуси, ул. Школьная, 2, 247781,
поселок Криничный, Мозырский район, Гомельская область, Беларусь

В мировом масштабе около 30 % всех почв повреждены засолением, которое приводит к снижению продуктивности агро- и биоценозов, уменьшению биоразнообразия и, как следствие, значительным экономическим потерям. Для важнейшей масличной культуры – подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) – первичные реакции на солевой стресс практически не изучены. В настоящей работе проанализировано воздействие широкого диапазона концентраций NaCl на рост основного корня проростков подсолнечника и развитие процессов запрограммированной клеточной гибели в трихобластах. В ходе проведенных опытов продемонстрировано, что растения подсолнечника являются относительно устойчивыми к засолению. Они способны расти при уровне NaCl в среде

Образец цитирования:

Мацкевич ВС, Звонарев СН, Шикер АА, Туровец ОА, Смолич ИИ, Соколик АИ, Демидчик ВВ. Выявление особенностей NaCl-индуцированной модификации ростовых процессов и индукции запрограммированной клеточной гибели в корне подсолнечника. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:13–20.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-13-20>

For citation:

Mackievic VS, Zvanarou SM, Shyker AA, Turovets OA, Smolich II, Sokolik AI, Demidchik VV. Determination of NaCl-induced modifications in growth processes and induction of programmed cell death in sunflower roots. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:13–20. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-13-20>

Авторы:

Вера Сергеевна Мацкевич – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.
Сергей Николаевич Звонарев – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.
Артур Александрович Шикер – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. С. Мацкевич.
Оксана Александровна Туровец – старший научный сотрудник лаборатории масличных культур.
Игорь Иванович Смолич – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.
Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией физиологии и биотехнологии растений, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.
Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета.

Authors:

Viera S. Mackievic, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.
v.mackievic@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-5116-0157>
Siarhej M. Zvanarou, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.
zvonarevsergey.bio@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-5403-0235>
Artur A. Shyker, student at the faculty of biology.
shikerartur04@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2251-0779>
Oksana A. Turovets, senior researcher at the laboratory of oil-seeds.
mzpolfl@mail.gomel.by
<https://orcid.org/0000-0001-8995-7519>
Ihar I. Smolich, PhD (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.
smolich@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0001-7828-606X>
Anatoly I. Sokolik, PhD (biology); head of the laboratory of plant physiology and biotechnology and associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.
sokolik@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-1513-9465>
Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology.
dzemidchik@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0003-3765-8386>

до 250 ммоль/л. Значительные симптомы запрограммированной гибели клеток обнаруживались только при концентрации NaCl 250–500 ммоль/л. Выявлена ранее не описанная в литературе реакция снижения количества симптомов запрограммированной клеточной гибели при обработке 150 ммоль/л NaCl (средний уровень стресса для подсолнечника). Анализ NaCl-индуцируемого выходящего потока калия показал, что он лишь на 15 % ингибировался специфическими антагонистами калиевых каналов (Ba^{2+}). Это указывает на низкую долю последних и доминирующую роль неселективных катионных каналов в обеспечении NaCl-индуцированного выхода калия у растений *Helianthus annuus* L.

Ключевые слова: подсолнечник; корень; рост; запрограммированная клеточная гибель; засоление; выход K^+ .

Благодарность. Работа выполнена в рамках международного проекта Государственного комитета по науке и технологиям «Оценить воздействие абиотических стрессоров на выход из клеток подсолнечника ионов калия» совместно с Индией.

DETERMINATION OF NaCl-INDUCED MODIFICATIONS IN GROWTH PROCESSES AND INDUCTION OF PROGRAMMED CELL DEATH IN SUNFLOWER ROOTS

V. S. MACKIEVIC^a, S. M. ZVANAROU^a, A. A. SHYKER^a,
O. A. TUROVETS^b, I. I. SMOLICH^a, A. I. SOKOLIK^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bPalessky Institute of Plant Growing, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Škol'naja Street, Kryničny 247781, Mazyr District, Homiel' Region, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchyk@bsu.by)

Globally, about 30 % of all soils are damaged by salinity. Salinity leads to lower productivity of agro- and biocenosis, a decline in biodiversity and, as a result, significant economic losses. For the most important oil culture – sunflower (*Helianthus annuus* L.), primary reactions to salt stress are almost unexplored. This paper analyzes the impact of a wide range of NaCl concentrations on the growth of the main root of sunflower sprouts and the development of programmed cell death processes in trichoblasts. Experiments have shown that sunflower plants are relatively resistant to salinity (NaCl). They were able to grow at the level up to NaCl 250 mmol/L in the environment. Significant symptoms of programmed cell death were detected only at high concentrations of NaCl 250–500 mmol/L. Previously undescribed in the literature, the reaction of reducing the number of symptoms of programmed cell death under 150 mmol/L NaCl treatment (medium salt stress level for sunflower) was determined. An inhibitory analysis of the NaCl-induced potassium flux showed that it was only 15 % inhibited by specific potassium channel antagonists (Ba^{2+}). This indicates a low proportion of potassium channels and the dominant role of non-selective cation channels in providing NaCl-induced potassium loss in *Helianthus annuus* L. plants.

Keywords: sunflower; root; growth; programmed cell death; salinity; K^+ efflux.

Acknowledgements. The work was carried out in the framework of the international project of the State Committee for Science and Technology with India «To assess the effect of abiotic stressors on the release of potassium ions from sunflower cells».

Введение

Одной из важнейших задач в сфере физиологии растений и сельского хозяйства является снижение негативного влияния засоления [1], приводящего к уменьшению продуктивности агро- и биocenозов, падению биоразнообразия и, как следствие, экономическим и экологическим проблемам. Основными источниками засоления обрабатываемых почв выступают орошение минерализованными водами, некачественная химическая и гидротехническая мелиорация, а также некоторые природные явления [2]. По ряду авторитетных оценок, до одной трети возделываемых почв в мировом масштабе засолены в различной степени [3; 4].

Отрицательное воздействие засоления на растения в значительной степени обусловлено влиянием высоких уровней Na^+ [5], а также (в несколько меньшей степени) Cl^- и других ионов [6]. На клеточном уровне солевой стресс проявляется в ионном, осмотическом и окислительном дисбалансе, что сопровождается усиленной генерацией активных форм кислорода (АФК), ингибированием анаболических и стимуляцией автофагических процессов [7]. Важнейшей мишенью засоления являются системы

плазматической мембраны. Выход воды через водные каналы плазматической мембраны лежит в основе осмотического дисбаланса, в то время как ионные каналы данной мембраны катализируют ионные потоки, что приводит к потере калия и модификации распределения других ионов между клеткой и средой [8]. Согласно развиваемой в последние годы «метаболической теории» засоления потеря K^+ , стимулирующая катаболические реакции и угнетающая анаболизм, лежит в основе раннего ответа растения в случае нелетальных концентраций NaCl [4; 9]. Вытеснение калия из метаболических путей при чрезмерно высоких уровнях NaCl (летальных концентрациях) может приводить к необратимым модификациям метаболизма, так как калий является «структурным» регулятором активности большинства водорастворимых ферментов клетки [10]. Наряду с деполяризацией мембраны выход калия дополнительно стимулируется синтезом АФК, который активируется вследствие входа Ca^{2+} и индукции НАДФ(Н)-оксидазной активности на плазматической мембране [12]. АФК, такие как гидроксильный радикал и перекись водорода, активируют наружувыврямляющие K^+ -каналы плазматической мембраны клеток корня [8]. Усиление антиоксидантной защиты, как и снижение активности систем синтеза АФК, потенциально может приводить к ослаблению негативных последствий засоления для растительной клетки [12].

Рассмотренные выше механизмы токсичности засоления исследованы главным образом для *Arabidopsis thaliana* и риса [9; 13]. Для этих растений идентифицированы как системы, обеспечивающие ключевые реакции, так и гены, их кодирующие. В то же время для многих сельскохозяйственных культур первичные реакции ответа растительной клетки на засоление остаются практически неизученными. В настоящей работе проведены исследования по выявлению данных реакций у растений подсолнечника – важнейшей масличной культуры с высокой устойчивостью к повышенным температурам и засухе. Тем не менее подсолнечник не является галофитом, т. е. используемые им стратегии могут иметь важное значение для селекции толерантных растений и биоинженерии солеустойчивости. Нами была предпринята попытка тестирования физиологического ответа корня подсолнечника белорусской селекции на повышенные уровни NaCl в среде. Изучены особенности двух ключевых клеточных реакций на NaCl: потери ионов K^+ корнями и K^+ -зависимой индукции запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ).

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовались растения *Helianthus annuus* L., гибрид Орион, предоставленный Полесским институтом растениеводства НАН Беларуси. Данный сорт подсолнечника отличается засухоустойчивостью, раннеспелостью, равномерностью созревания, интенсивным начальным ростом, способен противостоять полеганию. Он устойчив к ложной мучнистой росе, фузариозному увяданию, толерантен к загущению.

Семена подсолнечника 20 мин обрабатывались раствором коммерческого детергента (20 % Domestos) и промывались в проточной воде для удаления остатков детергента на протяжении 20 мин. Стерильные семена выкладывали на влажную фильтровальную бумагу (15 × 15 см) на расстоянии 1 см от верхнего края, накрывали вторым листом бумаги и закручивали в рулон. Рулоны помещали в стаканы с питательным раствором. Среда выращивания содержала 10 % по массе стандартной смеси солей Мурасиге и Скуга с микроэлементами [14] производства *Duchefa* (Нидерланды), pH поддерживался на уровне 6,0 при помощи KOH и HCl. В данную среду вводились тестируемые растворы NaCl.

Стаканы с рулонами помещались в стерильную ростовую камеру с контролируемым температурным режимом (22 °C) и условиями освещения (16 ч (свет)/8 ч (темнота)), где подращивались в течение 7 сут. Ежедневно осуществлялся мониторинг прироста корней, фотографии получали при помощи фотоаппарата Nikon D5500 (Япония). На 7-е сутки регистрировалась длина основного корня, расчеты производились при помощи приложения *ImageJ*. Средняя длина корней каждой тестируемой обработки соотносилась с длиной корней в контроле для получения относительных значений.

Корни 7-дневных проростков подсолнечника исследовались на предмет проявления типичной для ЗКГ морфологии с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100F. Проростки подсолнечника помещали на 3 и 24 ч в емкости с растворами NaCl. Для каждой серии экспериментов подсчет относительного количества клеток с симптомами ЗКГ был произведен в 15 независимых выборках (каждая группа – 100 корневых волосков). Фотографирование при проведении морфологических тестов производилось при 400-кратном увеличении.

Содержание K^+ в среде регистрировалось с помощью K^+ -селективного электрода Элис-121К (ООО «Ан-тех», Беларусь). Система измерения выхода K^+ включала иономер с системой электродов, экспериментальную ячейку (в которую помещали проростки), компрессор для воздушного барботирования. Для калибровки K^+ -селективного электрода использовались растворы KCl в концентрациях 1–1000 мкмоль/л. В эти растворы вводился NaCl в концентрации 100 ммоль/л, и проводилась повторная калибровка. Результаты калибровок представлены на рис. 1.

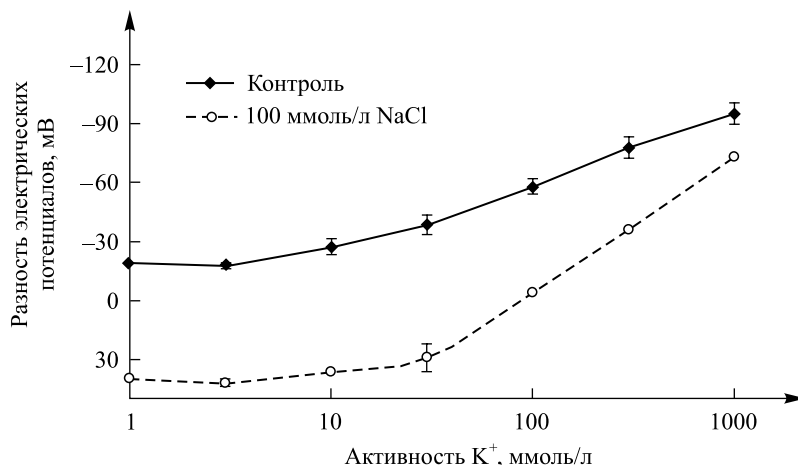


Рис. 1. Зависимость разности электрических потенциалов на сенсоре K^+ -селективного электрода от активности ионов калия в наружном растворе (калибровочный график системы)

Fig. 1. The electric potential difference (mV) on the K^+ sensor of a selective electrode on the activity of potassium ions (mmol/L) in the external solution (calibration graph of the system)

Проростки выдерживались в растворе 0,1 ммоль/л $CaCl_2$ в течение 2 ч. После этого в нем измерялось содержание K^+ . В раствор вносился NaCl в концентрации 100 ммоль/л с последующей инкубацией растений в течение 15 мин, затем повторно определялась концентрация K^+ . После данных манипуляций корни взвешивались. По калибровочной кривой рассчитывалось содержание K^+ в растворах с нормализацией по массе корней.

Результаты и их обсуждение

Первичный и наиболее общий ответ растений на воздействие засоления – ингибирование ростовых процессов, происходящее вследствие так называемого метаболического переключения, блокирующего анаболические превращения [4; 15]. При этом первичной мишенью большинства абиотических стрессоров выступают клетки корня. Анализ воздействия засоления на рост основного корня *Helianthus annuus* L. показал, что низкие концентрации соли (10 ммоль/л NaCl) увеличивали прирост основного корня примерно на 20 %, также индуцировали развитие боковых корней (рис. 2, а). В то же время более высокие уровни NaCl (свыше 100 ммоль/л) угнетали рост корней (рис. 2). Полумаксимальный ингибирующий эффект регистрировался при 100 ммоль/л NaCl, концентрация 350 ммоль/л была летальной (не обнаруживалось прорастания семян). Полученные данные указывают на то, что по сравнению со многими сельскохозяйственными видами, например пшеницей (*Triticum aestivum* L.) [16] и кукурузой (*Zea mays* L.) [17], а также модельными системами (такими как *Arabidopsis thaliana* L. Heynh.) [9], подсолнечник обладает значительно более высокой резистентностью к NaCl. Для него было отмечено прорастание на фоне 250 ммоль/л NaCl, тогда как для вышеуказанных видов верхней границей для выживания является уровень 100–150 ммоль/л.

Растения адаптируются к негативным факторам среды путем включения различных защитных механизмов, один из которых – индукция ЗКГ [18]. Например, происходит образование защитных слоев из мертвых клеток, что препятствует проникновению во внутренние слои клеток корня растворов с избыточным содержанием NaCl, тяжелых металлов и других токсических агентов [15]. Основным тестом при исследовании ЗКГ у высших растений является выявление морфологических изменений клеток: конденсации ядра, фрагментации цитоплазмы, отслоения протопласта, нарушения целостности цитоплазматической мембраны [19].

В результате воздействия NaCl в концентрации 150–500 ммоль/л в течение 3–24 ч в корневых волосках подсолнечника наблюдались типичные морфологические симптомы ЗКГ (рис. 3, б): отслоение цитоплазматической мембраны от клеточной стенки, образование темных телец на месте ядра, конденсация протопласта, видимые нарушения целостности мембран. В контрольных образцах, выдержанных в буфере, данных симптомов практически не наблюдалось (рис. 3, а), доля клеток с ЗКГ здесь не превышала 6 %. При 3-часовой экспозиции симптомы ЗКГ отмечались лишь при высоких уровнях NaCl (рис. 3, в): 250 ммоль/л увеличивал долю клеток с ЗКГ на 4 %, 500 ммоль/л – на 25 %. При дальнейшей инкубации растений в растворах NaCl число клеток с ЗКГ-морфологией возрастало.

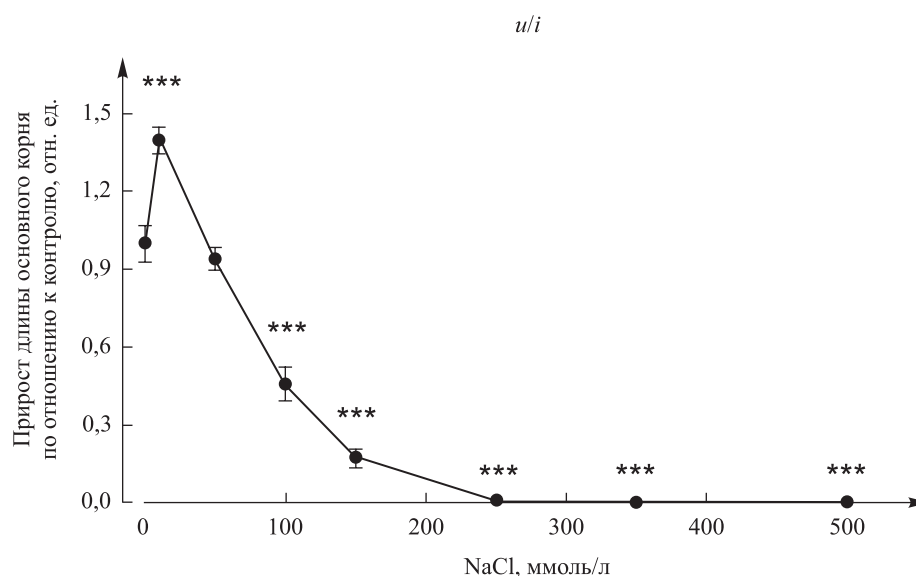
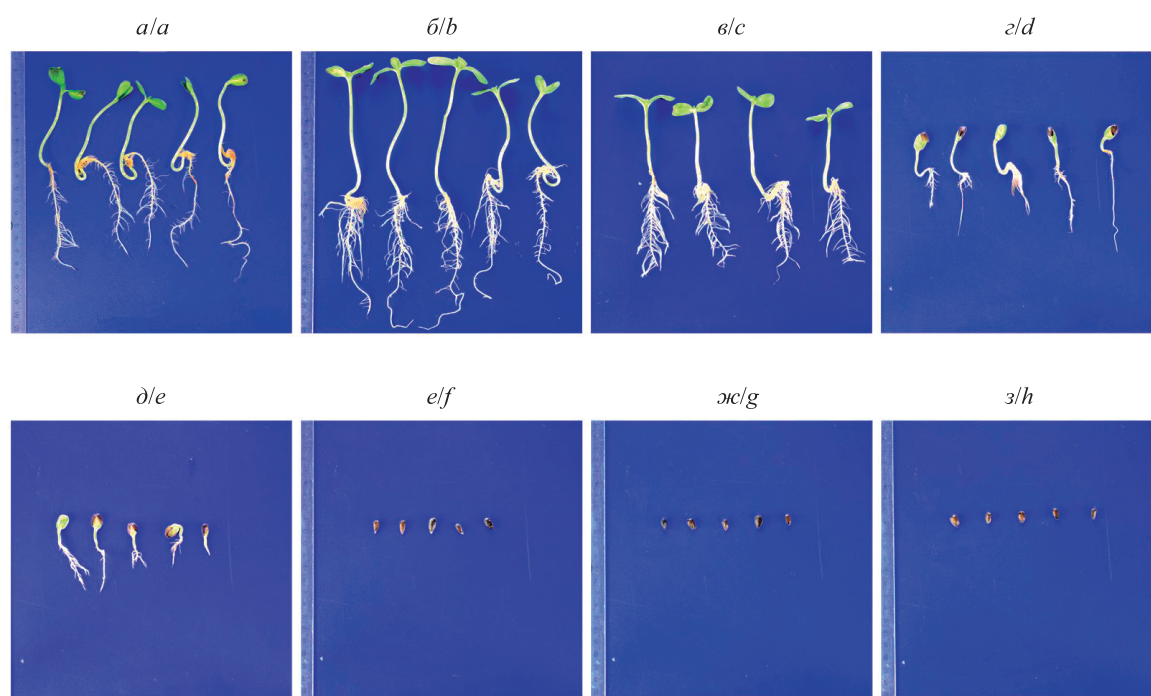


Рис. 2. Фенотипирование проростков *Helianthus annuus* L., выращиваемых 10 сут рулонным методом в 10 % растворе стандартных солей среды Мурасиге и Скуга на фоне NaCl с концентрацией, ммоль/л: а – 0 (контроль); б – 10; в – 50; г – 100; д – 150; е – 250; ж – 350; з – 500.

Изменение роста основного корня на фоне различных уровней NaCl (и).

Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю при помощи ANOVA-теста: *** – $p < 0,001$ ($n = 30$)

Fig. 2. Phenotyping of growth changes (the length of main root) in *Helianthus annuus* L. seedlings grown in paper rolls using 10 % Murashige and Skoog medium with addition NaCl at concentrations, mmol/L:

а – 0 (контроль); б – 10; в – 50; г – 100; д – 150; е – 250; ж – 350; з – 500.

Mean increment of the main root (i). The significance of differences was calculated using ANOVA: *** – $p < 0.001$ ($n = 30$)

Обработка растений 250 и 500 ммоль/л NaCl на протяжении 24 ч индуцировала гибель 95–100 % корневых волосков (рис. 3, з). Примечательно, что довольно высокая концентрация соли (150 ммоль/л NaCl) не оказывала негативного эффекта при 24-часовой обработке, а, напротив, вызывала снижение доли клеток с симптомами ЗКГ по сравнению с контролем (1,0–1,5 %) (см. рис. 3, з).

Также в исследовании был использован подход регистрации изменения уровня K^+ в экссудате корней в контролируемом объеме (рис. 4). Полученные данные указывают на высокую эффективность и надежность измерения при помощи K^+ -селективных электродов в случае засоления. Выдерживание проростков в 100 ммоль/л NaCl на протяжении 15 мин вызывало значительную потерю K^+ корнями подсолнечника, концентрация K^+ в наружном растворе при этом увеличивалась в три раза.

Добавление в среду Ba^{2+} – селективного блокатора K^+ -каналов – приводило к достоверному снижению выхода K^+ из клетки на 15 % (см. рис. 4, б). Это свидетельствует о том, что за данный процесс у подсолнечника лишь в незначительной степени отвечают K^+ -селективные ионные каналы [20]. Системой выхода калия, которая нечувствительна к Ba^{2+} , являются неселективные катионные каналы [12]. Можно предположить, что у подсолнечника эта система доминирует в выходе катионов, что, вероятно, обеспечивает более высокую толерантность к NaCl. Ранее изменения выхода калия были зарегистрированы в корнях

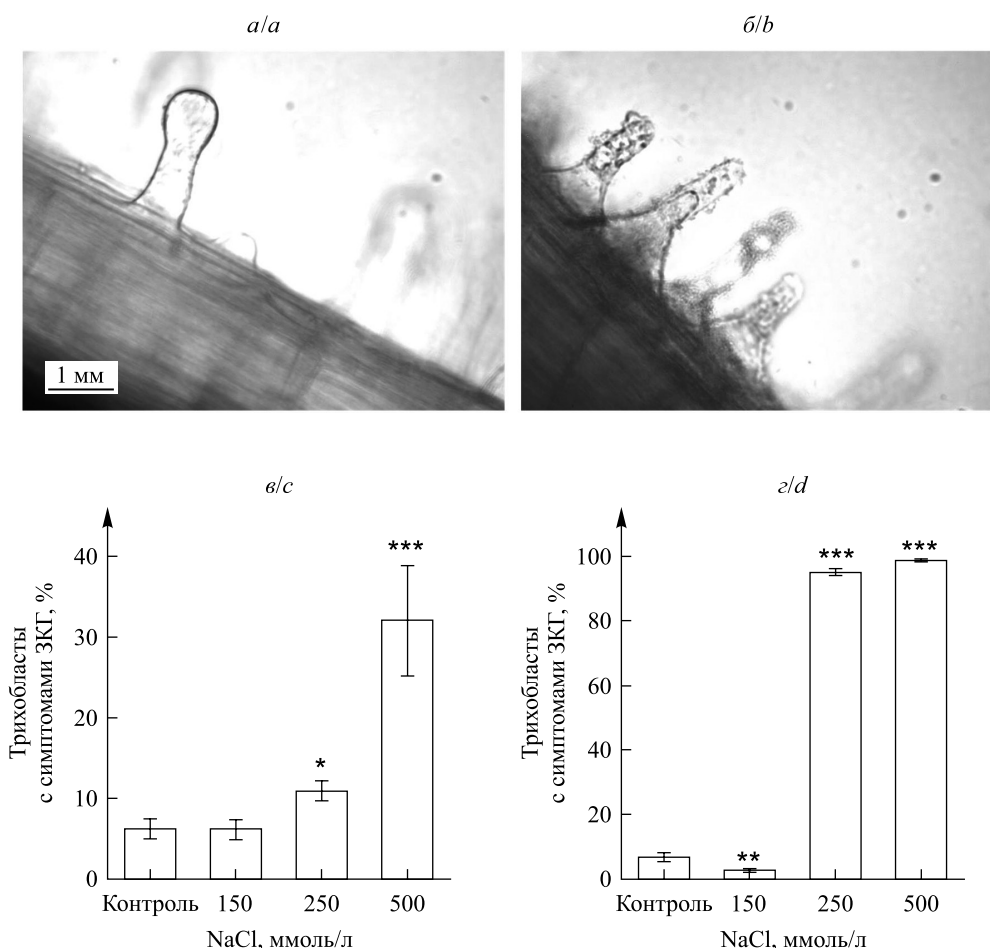


Рис. 3. Индукция симптомов ЗКГ в трихобластах *Helianthus annuus* L. при обработке NaCl. Типичная морфология клеток корня до (а) и после (б) 24-часовой обработки 250 ммоль/л NaCl. Доля трихобластов, обнаруживающих симптомы ЗКГ, при инкубации растений на фоне 150–500 ммоль/л NaCl в течение 3 ч (в) и 24 ч (з). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (n – от 15 до 25)

Fig. 3. Induction of the programmed cell death symptoms in root hairs of *Helianthus annuus* L. treated with NaCl solutions. Morphology of sunflower root cells before (a) and after (b) 24 h treatment with NaCl (250 mmol/L NaCl). The percentage of trichoblasts with PCD symptoms in plants incubated in solutions containing 150–500 mmol/L NaCl for 3 h (c) and 24 h (d). The significance of differences was calculated to the control: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ (n – from 15 to 25)

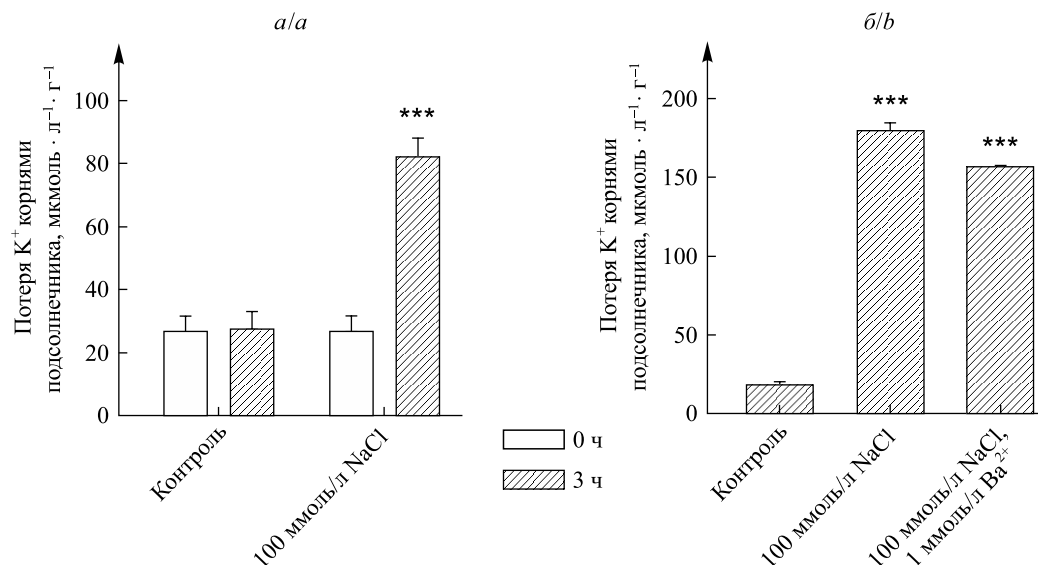


Рис. 4. Потеря K⁺ корнями *Helianthus annuus* L., индуцируемая 100 ммоль/л NaCl (а), и эффект Ba²⁺ (блокатора K⁺-каналов растений) на потерю K⁺ (б) (n = 15).

Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю:

*** – p < 0,001 (данные получены для двух независимых опытных выборок)

Fig. 4. Loss of K⁺ from sunflower roots, induced by NaCl (100 mmol/L) (a), and the effect of Ba²⁺ (K⁺-channels blocker) on K⁺ efflux (b) (n = 15).

The significance of differences was calculated to the control: *** – p < 0.001 (data obtained in two independent series of experiments)

клевера, арабидопсиса, пшеницы, ржи, кукурузы и риса при помощи ионселективных вибрационных электродов (системы MIFE™) [21; 22]. Они также продемонстрировали быстрый характер развития реакции и неполное блокирование выходящего потока ионов калия под действием блокаторов калиевых каналов.

Потеря клетками растения K⁺ первоначально в физиологии растений связывалась с неспецифическим повреждением мембран, однако в дальнейшем была отнесена к реакциям, опосредованным деполяризационно-активируемыми ионными каналами [23]. Утечка калия и других электролитов широко распространена среди различных видов растений, тканей и типов клеток и может быть вызвана всеми основными стресс-факторами, включая такие, как атака патогенов [23], засоление [7], высокие уровни тяжелых металлов [24; 25], окислительный стресс [25], повышенная кислотность (pH 4) [25], механический стресс [26], переувлажнение почвы [27], засуха [15; 24], гипертермия [9; 25] и др. Несмотря на исключительную важность K⁺-зависимых перестроек в физиологии клетки корня для повышения стрессоустойчивости и урожайности растений, механизм указанного явления остается не до конца понятным. Полученные в настоящей работе результаты дополняют современные представления о роли выхода калия из клеток высших растений в обеспечении адаптивных реакций. Для подсолнечника этот вопрос детально изучен впервые. Наиболее характерной чертой потери K⁺ корнями подсолнечника является невысокая доля калиевых каналов в обеспечении рассматриваемого процесса.

Следует отметить, что засоление запускает сложную серию механизмов задержки роста, нарушения минерального питания, изменения проницаемости мембран, индукции ионного и метаболического дисбаланса, а также окислительного стресса, ингибирования активности антиоксидантных ферментов [15]. В этой связи выявленные здесь закономерности могут лежать в основе целого комплекса down-stream-реакций, приводящих к патофизиологическим и адаптивным процессам, связанным с генерацией ответа растительного организма на засоление.

Заключение

В работе продемонстрировано, что растения подсолнечника являются относительно устойчивыми к засолению (NaCl). Они способны расти при уровне NaCl до 250 ммоль/л. Значительные симптомы ЗКГ обнаруживались при концентрации NaCl 250–500 ммоль/л. Выявлена не описанная ранее в литературе реакция снижения количества регистрируемых симптомов ЗКГ при обработке 150 ммоль/л NaCl. Выходящий поток K⁺ лишь на 15 % ингибировался специфическими антагонистами калиевых каналов, что указывает на высокую долю неселективных катионных каналов в обеспечении стресс-индуцированного выхода калия у растений подсолнечника.

Библиографические ссылки / References

1. Bazihizina N, Barrett-Lennard EG, Colmer TD. Plant growth and physiology under heterogeneous salinity. *Plant and Soil*. 2012;354(1–2):1–19. DOI: 10.1007/s11104-012-1193-8.
2. Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK. Antioxidative response mechanisms in halophytes: Their role in stress defence. *Journal of Genetics*. 2006;85(3):237–254. DOI: 10.1007/BF02935340.
3. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.
4. Munns R, Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 2008;59(1):651–681. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
5. Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*. 2014;19(6):371–379. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.02.001.
6. Geilfus C-M. Chloride: from nutrient to toxicant. *Plant and Cell Physiology*. 2018;59(5):877–886. DOI: 10.1093/pcp/pcy071.
7. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 2015;109:212–228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
8. Demidchik V. ROS-activated ion channels in plants: biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4):1263–1281. DOI: 10.3390/ijms19041263.
9. Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, et al. Arabidopsis root K⁺ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 2010;123:1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
10. Marschner H. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic Press; 2012.
11. Demidchik V, Tester M. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiology*. 2002;128(2):379–387. DOI: 10.1104/pp.010524.
12. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated 'ROS-Ca²⁺ Hub'. *Functional Plant Biology*. 2017;45(2):9–27. DOI: 10.1071/FP16420.
13. Horie T, Karahara I, Katsuhara M. Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: an overview with the central focus on rice plants. *Rice*. 2012;5(1):11–29. DOI: 10.1186/1939-8433-5-11.
14. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
15. Kumar D, Al Hassan M, Naranjo MA, Agrawal V, Boscaiu M, Vicente O. Effects of salinity and drought on growth, ionic relations, compatible solutes and activation of antioxidant systems in oleander (*Nerium oleander* L.). *PLOS ONE*. 2017;12(9):e0185017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185017.
16. Robin AHK, Matthew C, Uddin MdJ, Bayazid KN. Salinity-induced reduction in root surface area and changes in major root and shoot traits at the phytomer level in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(12):3719–3729. DOI: 10.1093/jxb/erw064.
17. Sozharajan R, Natarajan S. Influence of NaCl salinity on plant growth and nutrient assimilation of *Zea mays* L. *Journal of Applied and Advanced Research*. 2016;1(1):54–61. DOI: 10.21839/jaar.2016.v1i1.16.
18. Hogg BV, Kacprzyk J, Molony EM, O'Reilly C, Gallagher TF, Gallois P, et al. An *in vivo* root hair assay for determining rates of apoptotic-like programmed cell death in plants. *Plant Methods*. 2011;7(1):1–9. DOI: 10.1186/1746-4811-7-45.
19. Jones AM. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology*. 2001;125:94–97. DOI: 10.1104/pp.125.1.94.
20. Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65(5):1259–1270. DOI: 10.1093/jxb/eru004.
21. Shabala S, Cuin A. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*. 2008;133(4):651–669. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01008.x.
22. Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*. 2001;414:37–42. DOI: 10.1038/35102000.
23. Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2017;78:45–49. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
24. Shabala S, editor. *Plant stress physiology*. 2nd edition. Boston: CABI; 2017.
25. Demidchik V, Tyutereva E, Voitsekhovskaja O. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2017;45(2):28–46. DOI: 10.1071/FP16380.
26. Cox CD, Nomura T, Ziegler CS, Campbell AK, Wann KT, Martinac B. Selectivity mechanism of the mechanosensitive channel MscS revealed by probing channel subconducting states. *Nature Communications*. 2013;4:2137–2148. DOI: 10.1038/ncomms3137.
27. Urano D, Jones AM. Heterotrimeric G-protein – coupled signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2014;65(1):365–384. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040133.

Статья поступила в редакцию 04.09.2019.
Received by editorial board 04.09.2019.

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АКТИНОМИЦЕТОВ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФУЗАРИОЗА ТОМАТА

С. Г. СИДОРОВА¹⁾

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

В лабораторных модельных экспериментах изучена антифунгальная активность штаммов актиномицета рода *Streptomyces* из коллекции кафедры микробиологии БГУ в отношении возбудителя фузариозного увядания томата – микромицета *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen. Проанализированы динамика роста колоний, их морфология и окраска, интенсивность спороношения микромицета. Скрининг тестируемых штаммов на предмет их антифузариозной активности показал, что штамм 10 оказывал сильное (более 60 %) ингибирующее действие на все изучаемые изоляты фузариума: высокопатогенный (Fol 1), среднепатогенный (Т 2) и слабопатогенный (Т 11), останавливая рост их колоний начиная с 4-х суток совместного культивирования. Штамм 11 явился антагонистом для изолятов Fol 1 и Т 2, а штамм 20 – для изолята Т 11. Штаммы 18 и 35 не обладают антифунгальной активностью в отношении всех изученных изолятов *F.oxysporum* f. *lycopersici*.

Ключевые слова: фузариум; томат; актиномицеты; фитопатология.

THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF RAY FUNGUM AGAINST THE FUSARIUM WILT CAUSAL AGENT OF TOMATO

S. G. SIDOROVA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

The antifungal activity of genus *Streptomyces* strains (from collection of department of microbiology, Belarusian State University) against the fusarium wilt causal agent of tomato micromycetes *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen were studied in laboratory model experiments. Dynamic of micromycete colonies growth, morphology, color and fruiting intensity were analyzed. The screening of tested strains of genus *Streptomyces* for their anti-wilt activity has showed that the strain 10 influences the inhibiting (more than 60 %) effect on all fusarium isolates: high-pathogenic (Fol 1), middle-pathogenic (T 2) and low-pathogenic (T 11). Their colonies growth were blocked from the 4th day of joint cultivation. The strain 11 has been an antagonist for the isolates Fol 1 and T 2, and the strain 20 – for the isolate T 11. Strains 18 and 35 demonstrate no antifungal activity to all *F.oxysporum* f. *lycopersici* isolates under study.

Keywords: fusarium; tomato; ray fungus; phytopathology.

Образец цитирования:

Сидорова СГ. Антифунгальная активность актиномицетов в отношении возбудителя фузариоза томата. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019; 3:21–32.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-21-32>

For citation:

Sidorova SG. The antifungal activity of ray fungus against the fusarium wilt causal agent of tomato. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:21–32. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-21-32>

Автор:

Светлана Георгиевна Сидорова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Author:

Svetlana G. Sidorova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
sidorova@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-9808-4809>

Введение

Выращивание томатов – одна из важных составляющих продовольственного ресурса Республики Беларусь. Эта культура отличается ценными пищевыми качествами и разнообразным использованием (в свежем, соленом и консервированном виде). Однако успешному возделыванию томата препятствует подверженность его заболеваниям, которые могут быть обусловлены комплексом возбудителей, в том числе и грибной этиологии. Среди наиболее вредоносных патологий этой культуры можно выделить фузариозное увядание, вызываемое микромицетом *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen.

В 1990-х гг. фузариоз томатов в Беларуси был отмечен во всех культуурооборотах как в пленочных, так и в остекленных теплицах. При этом имели место значительные потери урожая [1–4]. В этой связи разработка мероприятий по защите томата является актуальной и практически значимой.

Экологизация современного производства растениеводческой продукции базируется на использовании биологического метода защиты растений от болезней. Этот метод заключается в применении потенциальных агентов среди различных групп микроорганизмов, обитающих в почве (грибов, бактерий, цианобактерий, актиномицетов), в целях использования их для защиты от фитопатогенных грибов. Поиск таких организмов, а также совершенствование знаний их биологии позволяют расширить границы применения биологического метода [5].

Мицелиальные прокариоты обладают, с одной стороны, способностью синтезировать антибиотики (в первую очередь аминогликозиды, макролиды и новые антибиотики – макваримициды), а также другие биологически активные вещества [6]. С другой стороны, актиномицеты являются продуцентами хитиназ [7] и глюканаз [8], что дает возможность рассматривать этих агентов в качестве естественной защиты растения от фитопатогенных грибов. Негативным свойством актиномицетов, которое немало важно для организмов-антагонистов, является неспособность мицелиальных прокариот к быстрому росту, что позволяет отнести их к представителям так называемых К-стратегов. Вместе с тем широкий метаболический потенциал актиномицетов, эффективность расселения спор, устойчивость к высушиванию и временному отсутствию питательных веществ открывают возможность создания биопрепаратов как на основе актиномицетов [9], так и в комплексе с другими организмами, в частности цианобактериями [10; 11].

В последнее время в ряде работ показана принципиальная возможность использования актиномицетов как основы для препаратов комплексного действия, применяемых на различных культурах в качестве экологически безопасных средств защиты [12–20]. Такие биопестициды проявляют антагонизм к фитопатогенным грибам и бактериям. Они обладают избирательностью действия и безопасны для здоровья животных и человека.

Цель настоящего исследования – выявить антагонистов фитопатогенного микромицета *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen, характеризующегося внутривидовой неоднородностью, среди почвенных актиномицетов рода *Streptomyces*.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на базе кафедры ботаники биологического факультета БГУ. Объектами изучения служили 3 изолята возбудителя фузариозного увядания томата – Fol 1, T 2 и T 11, полученные из коллекции чистых культур указанной выше кафедры. Данные изоляты характеризуются разной степенью патогенности: Fol 1 – высокопатогенный (вызывает поражение восприимчивого к фузариозному увяданию сорта томата Перамога 165, оцениваемое 5 баллами); T 2 – среднепатогенный (2,2 балла) и T 11 – слабопатогенный (1,6 балла) [2; 3]. Штаммы (10, 11, 18, 20, 35) актиномицета рода *Streptomyces*, используемые в экспериментальных исследованиях, взяты из коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии БГУ.

Культивирование изолятов патогена осуществляли по общепринятой методике [21]. Изучение культуральных свойств (динамика роста колоний, интенсивность спороношения) возбудителя фузариоза томата проводили согласно методикам, изложенным в руководствах [21; 22]. В эксперименте по изучению взаимоотношений между патогенами использовали метод встречных колоний [22]. Ежедневно учитывали диаметр колоний фитопатогена, описывали их морфологию, отмечали изменение окраски колонии и субстрата. Показатель ингибирования фитопатогена актиномицетами определялся в процентах (как разность диаметров колонии в контрольном и опытном вариантах, деленная на диаметр колонии в контроле и умноженная на 100). Значение этого показателя рассчитывали на 4-е и 8-е сутки, а интенсивность спорообразования микромицета – на 8-е сутки [22]. Повторность опыта (n) восьмикратная для каждой экспериментальной серии и контроля. Данные представляли в следующем виде: среднее $\pm$ ошибка среднего. Статистическая обработка проводилась с использованием программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Для получения данных, характеризующих антифузариозную активность актиномицетов, и последующего отбора активных штаммов исследовали их влияние на фитопатогенный микромицет в условиях чистой культуры. Результаты оценки показали неоднозначную реакцию изучаемых изолятов *F. oxysporum* f. *lycopersici*, проявившуюся в прекращении или замедлении роста фитопатогена. Так, для изолята Fol 1 показатель ингибирования его ростовой активности по прошествии 4 сут в вариантах культивирования со штаммами 10 и 11 актиномицета рода *Streptomyces* был равен 45,3 и 50,4 % соответственно (табл. 1). Все остальные изучаемые штаммы актиномицета не оказали сильного антифунгального воздействия в отношении возбудителя фузариоза томата. Учитываемый параметр колебался в пределах от 25,3 до 32,5 % (срок культивирования 4 сут) (см. табл. 1).

Таблица 1

Показатель ингибирования изолята
Fol 1 *F. oxysporum* f. *lycopersici*
штаммами актиномицета рода *Streptomyces*, %

Table 1

The inhibition index of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate Fol 1
by genus *Streptomyces* actinomycetes strains, %

Вариант опыта	Длительность культивирования, сут	
	4	8
Fol 1 + A 10	45,3	67,3
Fol 1 + A 11	50,4	66,8
Fol 1 + A 18	30,3	20,8
Fol 1 + A 20	32,5	22,0
Fol 1 + A 35	25,3	18,8

Примечание. Здесь и в табл. 2–5, на рис. 1, 3 и 5 обозначено: A 10, A 11, A 18, A 20, A 35 – штаммы 10, 11, 18, 20, 35 актиномицета соответственно.

С увеличением длительности культивирования наблюдалось дальнейшее усиление ингибирующего влияния штаммов 10 и 11 актиномицета, проявившееся в увеличении показателя ингибирования примерно до 67 %. Степень угнетающего воздействия штаммов 18, 20 и 35 составляла 19–22 %.

Анализируя динамику роста изолята Fol 1 в присутствии исследуемых штаммов актиномицета рода *Streptomyces*, можно заключить, что в вариантах применения штаммов 10 и 11 отмечалось снижение диаметра колоний микромицета в 1,8 и 2,0 раза соответственно при 4-суточном культивировании (рис. 1, а). В остальных опытных вариантах оцениваемый показатель уменьшился в 1,3–1,5 раза (см. рис. 1, б). Учет диаметра колоний изолята Fol 1 фузариума остроспорового на 8-е сутки культивирования позволил выявить статистически достоверное ($p \leq 0,05$) снижение этого показателя примерно в 3 раза в случае совместного культивирования с актиномицетами. Этот параметр составил $(3,3 \pm 0,16)$ и $(3,35 \pm 0,18)$ см для штаммов 10 и 11 соответственно, а в контроле – $(10,1 \pm 0,04)$ см (см. рис. 1, а). Степень влияния штаммов 18, 20 и 35 актиномицета на рост изолята Fol 1 проявилась в уменьшении диаметра колоний в 1,2–1,3 раза (см. рис. 1, б).

Рост исследованных изолятов фитопатогенного микромицета описывается логарифмическими уравнениями, анализ которых позволяет сделать вывод о том, что штаммы 10 и 11 актиномицета рода *Streptomyces* подавляют, а штаммы 18, 20 и 35 замедляют рост изолята Fol 1 фузариума остроспорового. В пользу этого говорит практическая неизменность размера колоний микромицета начиная с 4-х суток в вариантах совместного культивирования со штаммами 10, 11. В вариантах культивирования изолята Fol 1 фузариума остроспорового в присутствии штаммов 18, 20 и 35 актиномицета рода *Streptomyces* было отмечено увеличение диаметра колоний микромицета в период с 4 до 8 сут.

Описание характера роста изолята Fol 1 фузариума остроспорового свидетельствует о том, что при совместном его культивировании со штаммами 10 и 11 актиномицета рода *Streptomyces*, которые проявляли высокую антифузариозную активность, в месте посева образовывался белый пушистый мицелий, который формировал кольцо диаметром 1,0–1,5 см. Затем он становился изреженным и частично погруженным в субстрат (вблизи кольца актиномицета) (рис. 2).

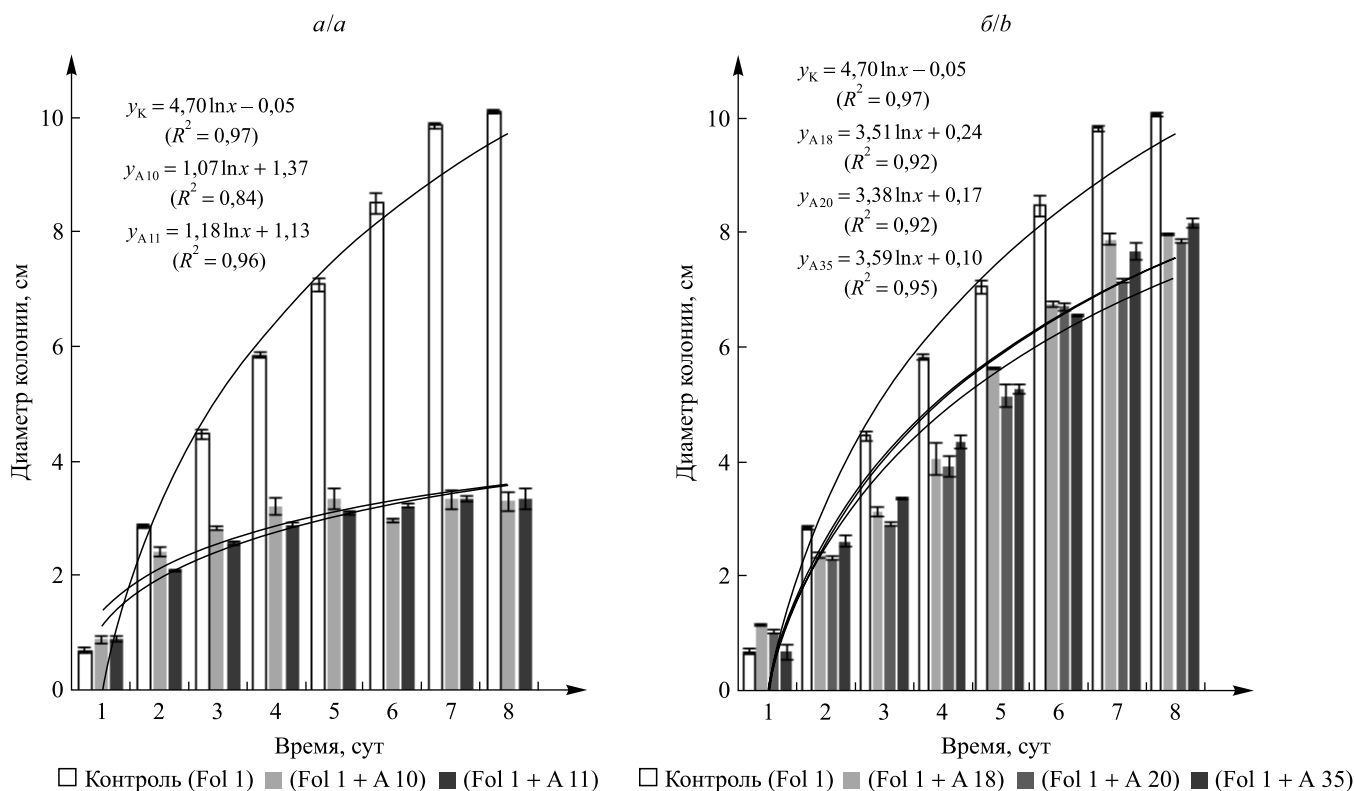


Рис. 1. Динамика роста изолята Fol 1 *F. oxysporum* f. *lycopersici* в присутствии подавляющих (а) и замедляющих (б) его активность штаммов актиномицета рода *Streptomyces*.

Представлены данные (столбцы) и линия тренда, построенная на основании уравнения регрессии (y), а также величина достоверности такой аппроксимации (R^2).

Для множественной регрессии статистические различия с контролем составили: $t = 10,37$ ($p < 0,0001$), $t = 15,49$ ($p < 0,0001$), $t = 1,68$ ($p = 0,0981$), $t = 1,17$ ($p = 0,2450$) и $t = 1,29$ ($p = 0,2030$) для штаммов 10, 11, 18, 20 и 35 актиномицета соответственно

Fig. 1. The dynamics of the *F. oxysporum* f. *lycopersici* Fol 1 isolate growth in the presence of inhibiting (a) and slowing down (b) genus *Streptomyces* actinomycetes strains. Data presented by columns, trend lines are based on regression equations (y) and significantly approximate by R^2 coefficient. For multiple regression results significance vs control are: $t = 10.37$ ($p < 0.0001$), $t = 15.49$ ($p < 0.0001$), $t = 1.68$ ($p = 0.0981$), $t = 1.17$ ($p = 0.2450$) and $t = 1.29$ ($p = 0.2030$) for actinomycetes strains 10, 11, 18, 20 and 35 respectively

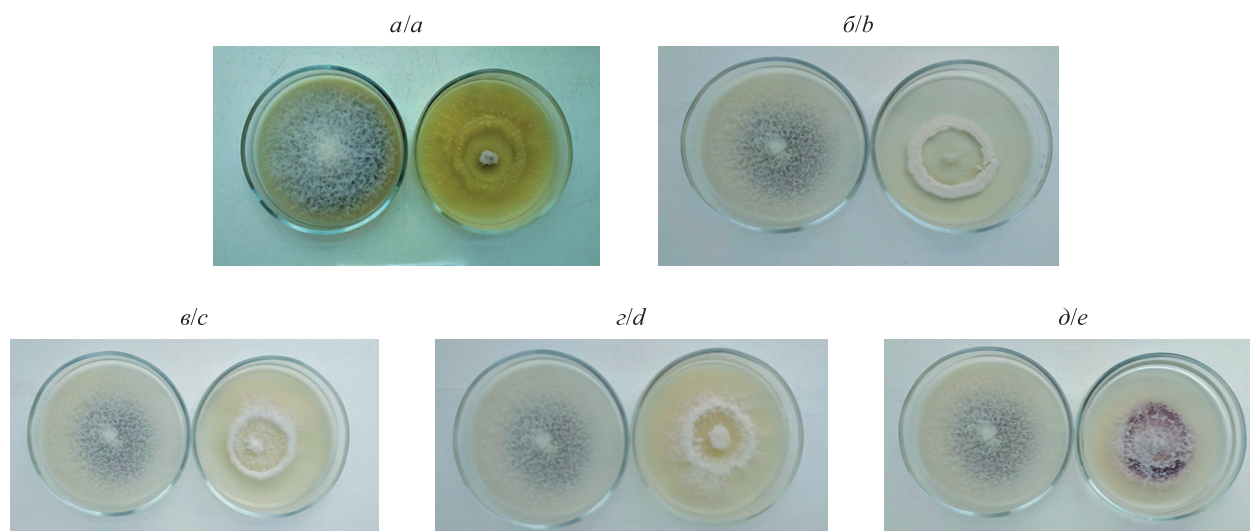


Рис. 2. Взаимоотношения изолята Fol 1 *F. oxysporum* f. *lycopersici* и штаммов 10 (а), 11 (б), 20 (в), 35 (г), 18 (д) актиномицета рода *Streptomyces* (8-е сутки).

Слева на фотографии – контроль, справа – опытный вариант

Fig. 2. The relationship of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate Fol 1 and genus *Streptomyces* actinomycetes strains 10 (a), 11 (b), 20 (c), 35 (d), 18 (e) (8th day). On the left on the photo is the control variant, on the right – experimental variant

Наблюдаемое снижение плотности грибного мицелия в присутствии антагониста может быть рассмотрено как конкуренция за питательные вещества. К аналогичному заключению пришла О. К. Струникова (с соавторами) [23], изучая развитие грибного мицелия *Fusarium culmorum* в присутствии микробов-антагонистов, в частности *Pseudomonas fluorescens*, а также Л. И. Домрачева (с соавторами) [16], исследуя взаимоотношения фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. nivale*) с актиномицетами и цианобактериями.

Анализ интенсивности спорообразования показал снижение этого показателя от центра колонии к ее краю практически во всех опытных вариантах в сравнении с контрольным. Так, при совместном культивировании Fol 1 и штаммов 10 и 11 актиномицета рода *Streptomyces* наблюдалось статистически достоверное ($p \leq 0,05$) уменьшение (в 7,3 и 4,0 раза соответственно) количества спор на единицу спороносящей поверхности по сравнению с контролем (табл. 2). Это может быть связано с наблюдаемым изреживанием и усыханием грибного мицелия.

Таблица 2

Интенсивность спорообразования изолята Fol 1 *F. oxysporum* f. *lycopersici* в присутствии штаммов актиномицета рода *Streptomyces*, $\times 10^6 \text{ см}^{-2}$

Table 2

The spore formation intensity of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate Fol 1 in presence of genus *Streptomyces* actinomycetes strains, $\times 10^6 \text{ cm}^{-2}$

Вариант опыта	Участок колонии	
	Центр	Край
Контроль (изолят Fol 1)	18,3 $\pm$ 0,16	6,7 $\pm$ 0,11
Fol 1 + A 10	2,5 $\pm$ 0,24*	—
Fol 1 + A 11	4,6 $\pm$ 0,32*	2,0 $\pm$ 0,14*
Fol 1 + A 18	19,4 $\pm$ 0,56	6,5 $\pm$ 0,48
Fol 1 + A 20	33,7 $\pm$ 1,15*	22,3 $\pm$ 1,19*
Fol 1 + A 35	34,3 $\pm$ 0,98*	24,2 $\pm$ 1,43*

*Достоверно ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем для аналогичного места измерения (центр или край колонии).

Наряду с угнетающим действием на ростовые процессы и спорообразование изучаемых изолятов фитопатогенного микромицета выявлен и обратный эффект. Так, в вариантах культивирования изолята Fol 1 и штаммов 20 и 35 актиномицета рода *Streptomyces* отмечено статистически достоверное ($p \leq 0,05$) стимулирование процесса спорообразования. Этот показатель в центре колоний был в 1,8 раза выше по сравнению с контрольным вариантом. Воздействие штамма 18 актиномицета выразилось в формировании спор на единице спороносящей поверхности в пределах контроля (см. табл. 2).

Количество спор, приходящихся на единицу спороносящей поверхности, у края колоний описывается аналогичным образом: полное их отсутствие и уменьшение в вариантах культивирования со штаммами 10 и 11 актиномицета, стимуляция данного процесса под воздействием штаммов 20 и 35. Это может быть связано с тем, что актиномицеты, как и грибы, способны к синтезу большого спектра биологически активных веществ различной химической природы – антибиотиков, токсинов, ферментов и ингибиторов ферментов, геосминов, соединений гуминовой природы, витаминов и др. [10; 11; 24]. Результаты, полученные в проведенных нами исследованиях, указывают на то, что продуцируемые актиномицетами метаболиты, по-видимому, могут оказывать контрастное воздействие на развитие изучаемых штаммов фузариума остроспорового. Поэтому возникает необходимость их предварительного тестирования.

Изучение антифузариозной активности тестируемых штаммов актиномицета рода *Streptomyces* в отношении изолята Т 2 фузариума остроспорового позволило выявить такой же, как и для изолята Fol 1, характер воздействия. Наиболее сильный ингибирующий эффект отмечен при совместном культивировании со штаммами 10 и 11 актиномицета (на 47,6 и 50,8 % соответственно при 4-суточном культивировании и на 62,9 и 64,5 % – при 8-суточном выращивании). Для штаммов 18 и 20 актиномицета выявлено также достаточно сильное угнетающее воздействие на 4-е сутки культивирования. Однако в конце наблюдения это влияние заметно ослабевало. Показатель ингибирования снизился более чем в 3 раза (табл. 3).

Таблица 3

Показатель ингибирования изолята Т 2 *F. oxysporum* f. *lycopersici* штаммами актиномицета рода *Streptomyces*, %

Table 3

The inhibition index of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate Т 2 by genus *Streptomyces* actinomycetes strains, %

Вариант опыта	Длительность культивирования, сут	
	4	8
Т 2 + А 10	47,6	62,9
Т 2 + А 11	50,8	64,5
Т 2 + А 18	47,9	13,0
Т 2 + А 20	49,5	15,8
Т 2 + А 35	27,7	20,1

Существенно отличающееся ингибирование ростовой активности изолята Т 2 *F. oxysporum* f. *lycopersici* проявилось в конце учета. Анализируя измерения величины колоний, можно отметить, что при совместном культивировании со штаммами 10 и 11 актиномицета рода *Streptomyces* в период наблюдения с 4 до 8 сут происходило незначительное (от 3,25 до 3,65 см для штамма 10 и от 3,05 до 3,49 см для штамма 11) увеличение размера колоний изолята Т 2 (рис. 3, а, и 4, а, б). Это может быть связано со способностью актиномицетов выделять в окружающую среду антибиотические вещества, подавляющие рост фузариума остроспорового. Вместе с тем угнетающий эффект штаммов 18, 20 и 35 был слабее. Диаметр колоний изолята Т 2 фузариума остроспорового увеличился в 2,6 раза в период культивирования с 4 до 8 сут в вариантах совместного культивирования со штаммами 18 и 20 актиномицета и в 1,8 раза – со штаммом 35 (рис. 3, б, и 4, в, г, д).

Как и в случае предыдущего изолята *F. oxysporum* f. *lycopersici*, анализ логарифмических уравнений временной зависимости увеличения диаметра его колоний показал, что штаммы 10 и 11 полностью подавляют дальнейший рост изолята Т 2 микромицета по прошествии 8 сут после начала совместного культивирования, а штаммы 18, 20, 35 лишь замедляют ростовую активность (рис. 3).

Подсчет интенсивности спороношения показал, что воздействие штаммов 10 и 11 актиномицета характеризовалось значительным угнетающим эффектом. Количество спор, приходящихся на единицу спороносящей поверхности в центре колонии, снизилось в 18 раз при совместном культивировании со штаммом 10 и в 2,6 раза – со штаммом 11. Двухкратное уменьшение интенсивности спороношения зафиксировано в варианте применения штамма 18 актиномицета рода *Streptomyces*. Для штаммов 20 и 35 количество спор, приходящихся на единицу спороносящей поверхности, существенно не отличалось от аналогичного показателя контрольного варианта (табл. 4).

Таблица 4

Интенсивность спорообразования изолята Т 2 *F. oxysporum* f. *lycopersici* в присутствии штаммов актиномицета рода *Streptomyces*, $\times 10^6$ см⁻²

Table 4

The spore formation intensity of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate Т 2 in the presence of genus *Streptomyces* actinomycetes strains, $\times 10^6$ cm⁻²

Вариант опыта	Участок колонии	
	Центр	Край
Контроль (Т 2)	28,5 $\pm$ 0,33	15,3 $\pm$ 2,09
Т 2 + А 10	1,55 $\pm$ 0,09*	–
Т 2 + А 11	10,8 $\pm$ 0,07*	1,2 $\pm$ 0,03*
Т 2 + А 18	14,1 $\pm$ 0,29*	–
Т 2 + А 20	34,4 $\pm$ 2,19*	14,5 $\pm$ 2,56
Т 2 + А 35	32,3 $\pm$ 3,13	19,1 $\pm$ 1,94

*Достоверно ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем для аналогичного места измерения (центр или край колонии).

Результаты, приведенные в табл. 4, указывают на снижение спорообразовательной способности у края колонии изолята Т 2 по сравнению с центральной частью во всех опытных вариантах. Кроме того, при совместном культивировании изолята Т 2 со штаммами 10 и 18 актиномицета установлено полное отсутствие спор. Существенное ингибирование (в 12,8 раза) спорносыщей активности отмечено для варианта с применением штамма 11. Для штаммов 20 и 35 актиномицета числовое выражение спорносыщей способности находилось на уровне контроля (см. табл. 4).

Анализ экспериментальных данных, отражающих ростовую активность изолята Т 11 *F. oxysporum* f. *lycopersici*, показал, что наиболее сильный угнетающий эффект отмечен при его совместном культивировании со штаммами 10 и 20 актиномицета рода *Streptomyces*, когда показатель ингибирования по истечении 4 сут составил 44,8 и 48,0 % соответственно (табл. 5). В период культивирования с 4 до 8 сут наблюдалось дальнейшее усиление антифузариозного влияния штаммов 10 и 20. Показатель ингибирования в конце наблюдения достигал 62,4–63,7 %. Ростовая активность изолята Т 11 выразилась в снижении диаметра его колоний в 1,8–1,9 раза в сравнении с контрольным вариантом при выращивании в течение 4 сут в присутствии штаммов 10 и 20 актиномицета (рис. 5, а). Влияние штамма 11 актиномицета рода *Streptomyces* проявилось в снижении размера колоний изолята Т 11 фузариума остроспорового в 1,6 раза по сравнению с контролем. Воздействие остальных тестируемых штаммов на формирование колоний изолята Т 11 выразилось в уменьшении их диаметра в 1,2–1,3 раза (см. рис. 5, б).

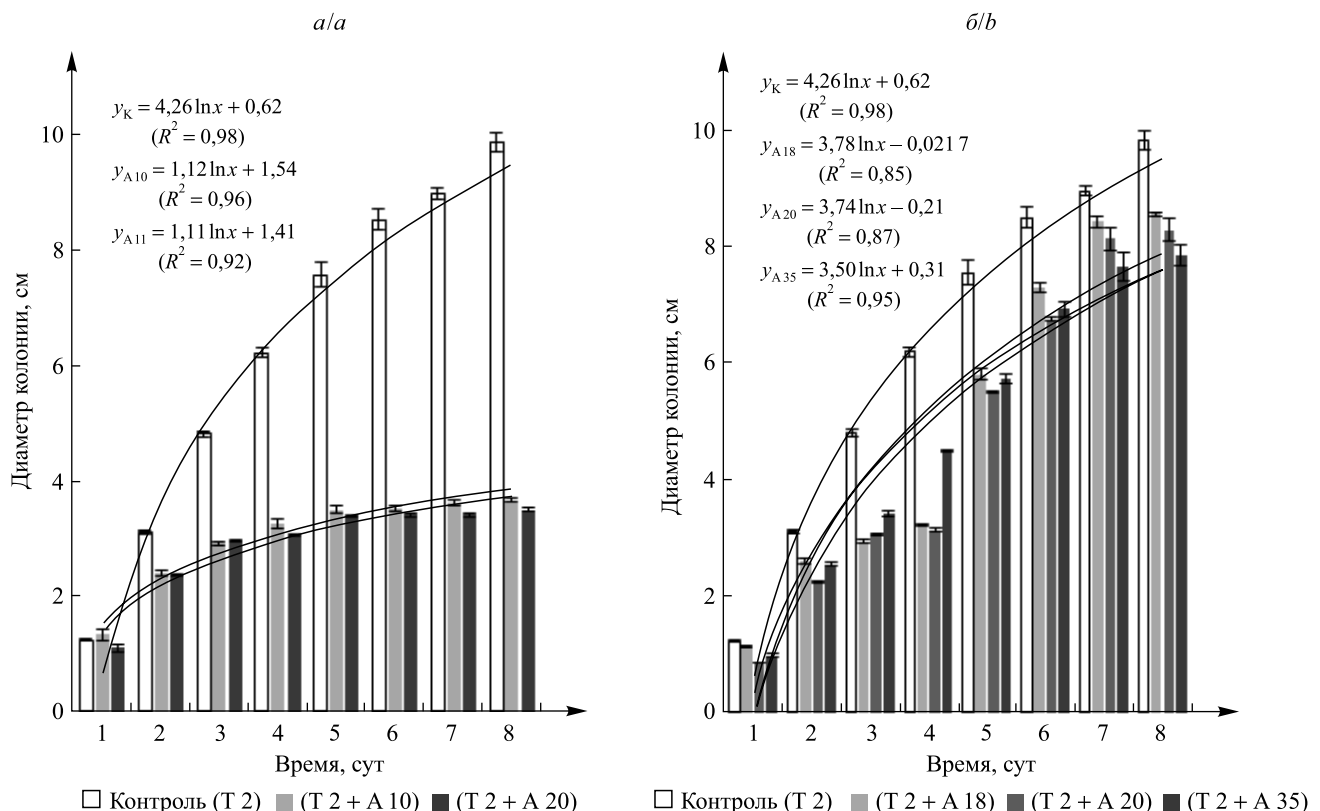


Рис. 3. Динамика роста изолята Т 2 *F. oxysporum* f. *lycopersici* в присутствии подавляющих (а) и замедляющих (б) его штаммов актиномицета рода *Streptomyces*.

Представлены данные (столбцы) и линия тренда, построенная на основании уравнения регрессии (у), а также величина достоверности такой аппроксимации (R^2).

Для множественной регрессии статистические различия с контролем составили:

$t = 16,46$ ($p < 0,0001$), $t = 13,90$ ($p < 0,0001$), $t = 2,52$ ($p = 0,0143$), $t = 3,17$ ($p = 0,0024$)

и $t = 1,98$ ($p = 0,0526$) для штаммов 10, 11, 18, 20 и 35 актиномицета соответственно.

В отношении штаммов 18 и 20 отмеченные различия обусловлены аномальной задержкой роста колоний на 4-е сутки после начала культивирования и вызванного этим изменением хода кривой регрессии

Fig. 3. Dynamics of the *F. oxysporum* f. *lycopersici* T 2 isolate growth in presence of inhibiting (a) and slowing down (b) genus *Streptomyces* actinomycetes strains. Data presented by columns, trend lines are based on regression equations (y) and significantly approximate by R^2 coefficient. For multiple regression results significance vs control are:

$t = 16,46$ ($p < 0,0001$), $t = 13,90$ ($p < 0,0001$), $t = 2,52$ ($p = 0,0143$), $t = 3,17$ ($p = 0,0024$)

and $t = 1,98$ ($p = 0,0526$) for actinomycetes strains 10, 11, 18, 20 and 35 respectively.

For strains 18 and 20 significant differences are due to the abnormal growth delay on the 4th day of incubation which results in variables of regression curves course

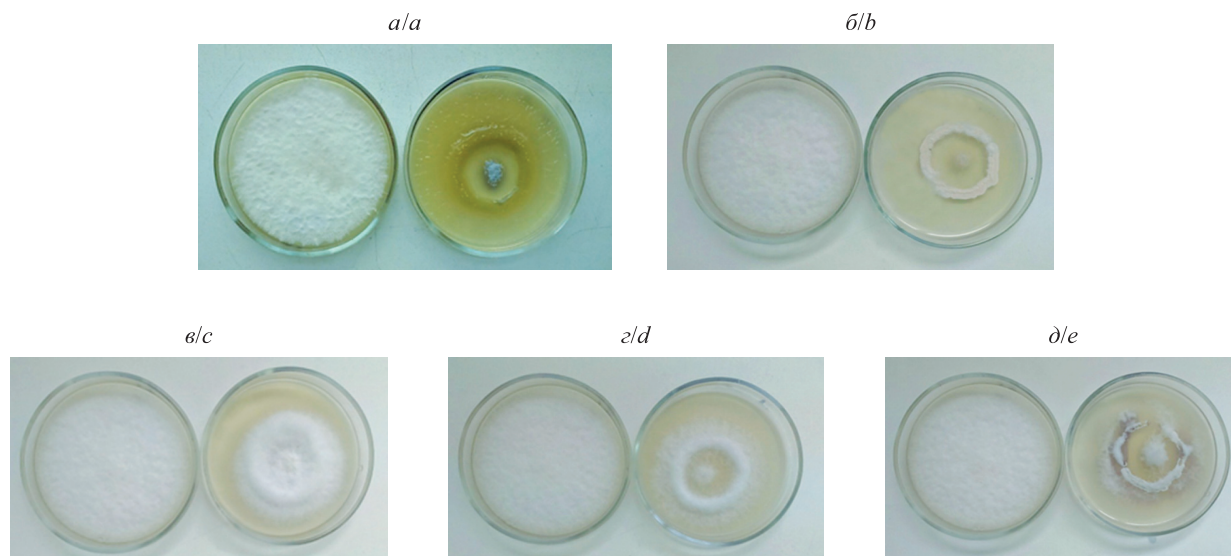


Рис. 4. Взаимоотношения изолята Т 2 *F. oxysporum* f. *lycopersici* и штаммов 10 (а), 11 (б), 20 (в), 35 (г), 18 (д) актиномицета рода *Streptomyces* (8-е сутки).

Слева на фотографии – контроль, справа – опытный вариант

Fig. 4. The relationship of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate Т 2 and genus *Streptomyces actinomycetes* strains (8th day) 10 (a), 11 (b), 20 (c), 35 (d), 18 (e).

On the left on the photo is the control variant, on the right – experimental variant

Таблица 5

Показатель ингибирования изолята Т 11 *F. oxysporum* f. *lycopersici* штаммами актиномицета рода *Streptomyces*, %

Table 5

The inhibition index of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate Т 11 by genus *Streptomyces actinomycetes* strains, %

Вариант опыта	Длительность культивирования, сут	
	4	8
Т 11 + А 10	44,8	63,7
Т 11 + А 11	37,8	26,9
Т 11 + А 18	18,3	20,7
Т 11 + А 20	48,0	62,4
Т 11 + А 35	21,1	8,3

Анализ роста изолята Т 11 фузариума остроспорового в период с 4 до 8 сут выявил усиление угнетающего воздействия штаммов 10 и 20 актиномицета рода *Streptomyces*. Отмечено практически одинаковое (в 2,8 и 2,7 раза) статистически достоверное ($p \leq 0,05$) уменьшение размера колонии фитопатогенного микромицета (см. рис. 5, а). Видимо, это проявилось в остановке роста фитопатогена, т. е. его подавлении под воздействием актиномицета. Снижение диаметра колонии изолята Т 11 фузариума остроспорового в вариантах совместного культивирования со штаммами 11, 18 и 35 актиномицета рода *Streptomyces* колебалось в диапазоне 0,8–2,0 см и проявлялось в замедлении его роста (см. рис. 5, б).

Анализ логарифмических уравнений роста изолята Т 11 показал, что подавление этого роста ассоциируется с действием штаммов 10 и 20 актиномицета рода *Streptomyces* (прекращение увеличения размеров колоний микромицета по сравнению с таковым для предыдущих суток) начиная с 4-го дня

совместного культивирования. Штаммы 11, 18, 35 лишь замедляют рост данного изолята *F. oxysporum* f. *lycopersici*, оцениваемый по сохранности увеличения диаметра колонии в каждый из дней экспериментальных наблюдений.

Для штаммов 11, 18 и 35 отмеченное увеличение диаметра колоний до конца наблюдения внешне проявлялось в чередовании воздушного и субстратного мицелия: в месте посева формировался белый воздушный мицелий (диаметром около 1,7 см). Затем он уходил в субстрат, перерастал кольцо актиномицета и вновь становился белым пушистым (рис. 6, з, д) либо паутинистым (рис. 6, в).

Подсчет интенсивности спороношения показал, что наиболее сильное статистически достоверное ($p \leq 0,05$) снижение этого показателя, в сравнении с контрольным вариантом, отмечено при культивировании изолята Т 11 и штамма 10 актиномицета. Данный показатель в центре колонии был в 14 раз, а по краю – в 2,8 раза ниже, чем в контроле (табл. 6).

Воздействие штаммов 11 и 35 актиномицета рода *Streptomyces* на способность формирования спор изолятом Т 11 выразилось в снижении их количества на единице спороносящей поверхности в центре колонии в 1,4 и 2,1 раза соответственно по сравнению с контролем ($(40,2 \pm 0,28) \cdot 10^6$ штук на сантиметре квадратном).

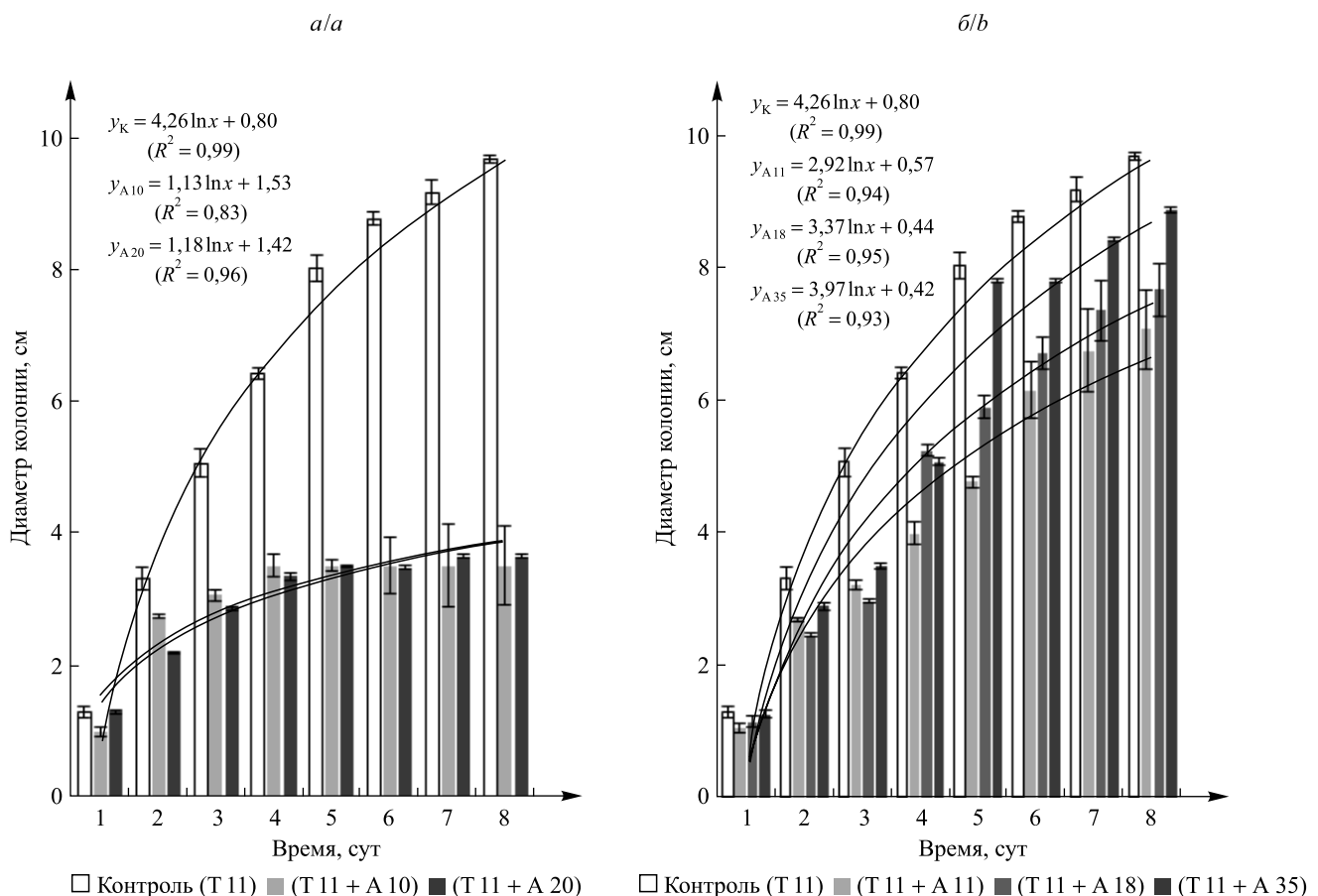


Рис. 5. Динамика роста изолята Т 11 *F. oxysporum* f. *lycopersici* в присутствии подавляющих (а) и замедляющих (б) его штаммов актиномицета рода *Streptomyces*.

Представлены данные (столбцы) и линия тренда, построенная на основании уравнения регрессии (y), а также величина достоверности такой аппроксимации (R^2).

Для множественной регрессии статистические различия с контролем составили:

$t = 10,61$ ($p < 0,0001$), $t = 17,34$ ($p < 0,0001$), $t = 0,00$ ($p = 0,9999$), $t = 0,88$ ($p = 0,3813$)

и $t = 1,98$ ($p = 0,0518$) для штаммов актиномицета 10, 20, 11, 18 и 35 соответственно

Fig. 5. The dynamics of the *F. oxysporum* f. *lycopersici* T11 isolate growth in the presence of inhibiting (a) and slowing down (b) genus *Streptomyces* actinomycetes strains.

Data presented by columns, trend lines are based on regression equations (y)

and significantly approximate by R^2 coefficient. For multiple regression results significance vs control are:

$t = 10.61$ ($p < 0.0001$), $t = 17.34$ ($p < 0.0001$), $t = 0.00$ ($p = 0.9999$), $t = 0.88$ ($p = 0.3813$)

and $t = 1.98$ ($p = 0.0518$) for actinomycetes strains 10, 20, 11, 18 and 35 respectively

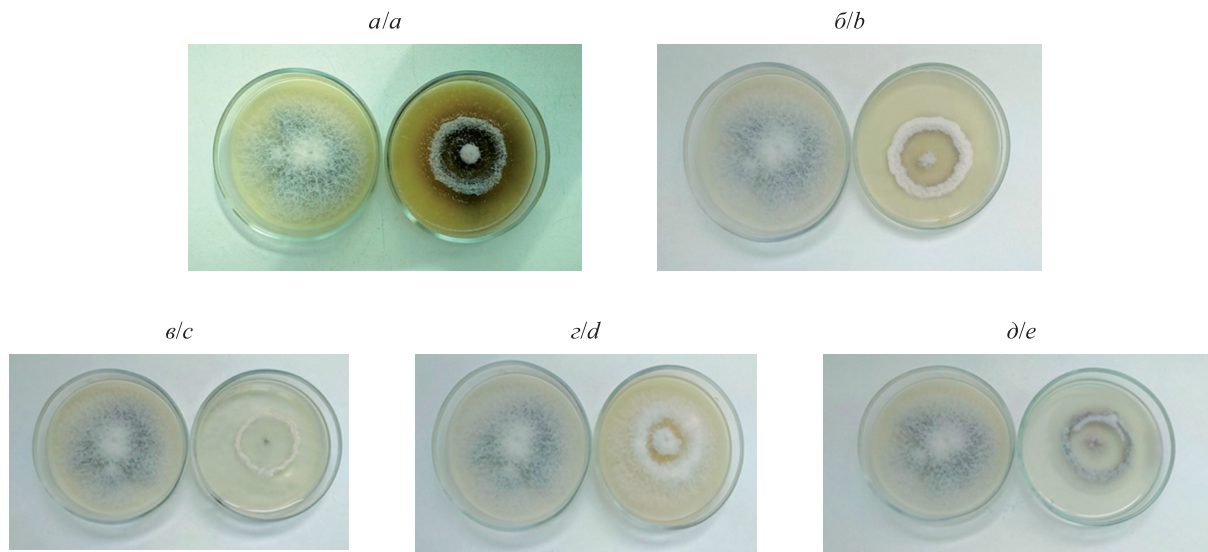


Рис. 6. Взаимоотношения изолята Т 11 *F. oxysporum* f. *lycopersici* и штаммов 10 (а), 11 (б), 20 (в), 35 (г), 18 (д) актиномицета рода *Streptomyces* (8-е сутки).
Слева на фотографии – контроль, справа – опытный вариант

Fig. 6. The relationship of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate T 11 and genus *Streptomyces* strains 10 (a), 11 (b), 20 (c), 35 (d), 18 (e) (8th day).
On the left on the photo is the control variant, on the right – experimental variant

Таблица 6

**Интенсивность спорообразования изолята Т 11
F. oxysporum f. *lycopersici* в присутствии штаммов
актиномицета рода *Streptomyces*, $\times 10^6$ см⁻²**

Table 6

**The spore formation intensity
of *F. oxysporum* f. *lycopersici* isolate T 11
in the presence of genus *Streptomyces* actinomycetes strains, $\times 10^6$ cm⁻²**

Вариант опыта	Участок колонии	
	Центр	Край
Контроль (Т 11)	40,2 ± 0,28	3,1 ± 0,04
Т 11 + А 10	2,8 ± 0,06*	1,1 ± 0,09*
Т 11 + А 11	28,3 ± 0,44*	—
Т 11 + А 18	5,25 ± 0,34*	3,1 ± 0,02
Т 11 + А 20	14,9 ± 1,07*	1,95 ± 0,12*
Т 11 + А 35	19,5 ± 0,08*	1,3 ± 0,21*

*Достоверно ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем для аналогичного места измерения (центр или край колонии).

Данные, приведенные в табл. 6, свидетельствуют о том, что в варианте применения штамма 18 актиномицета рода *Streptomyces* учитываемый показатель был примерно в 8 раз ниже, чем в контроле. Как указывалось ранее, подобное может быть связано с тем, что актиномицеты способны выделять в окружающую среду вещества различной химической природы, в том числе и негативно влияющие на спорообразовательный процесс микромицета. Количество спор на единицу спороносящей поверхности у края колонии статистически достоверно ($p \leq 0,05$) уменьшалось вплоть до полного исчезновения практически во всех (за исключением варианта совместного культивирования со штаммом 18 актиномицета рода *Streptomyces*) вариантах наблюдения.

Заключение

Скрининг тестируемых штаммов актиномицета рода *Streptomyces* на предмет их антифузариозной активности позволил установить, что штамм 10 оказывает ингибирующее воздействие на все изучаемые изоляты *F. oxysporum* f. *lycopersici* и может быть рекомендован для практического применения в качестве антагониста возбудителя фузариоза томата. Штамм 11 является антагонистом для изолятов фузариума Fol 1 и T 2, а штамм 20 – для изолята T 11.

В ходе проведенных нами исследований не выявлено зависимости антифузариозной активности исследуемых штаммов актиномицета рода *Streptomyces* от уровня патогенности изолятов фузариума остроспорового. Это, вероятно, может свидетельствовать о большей значимости биохимической активности изолятов возбудителя фузариозного увядания для проявления их антагонистических свойств. Следовательно, при тестировании штаммов актиномицета рода *Streptomyces* на антифунгальную активность целесообразно иметь представление и о фитотоксической способности изолятов фузариума остроспорового с учетом внутривидовой неоднородности [2; 3].

Библиографические ссылки

1. Поликсенова ВД. Фузариозное увядание томатов. *Защита растений*. 1987;6:51–52.
2. Пискун СГ, Поликсенова ВД, Анохина ВС. Внутривидовая дифференциация возбудителя фузариозного увядания томатов. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2002;3:36–41.
3. Пискун СГ, Поликсенова ВД, Анохина ВС. Фитотоксичная активность возбудителя фузариозного увядания томата. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2003;2:87–89.
4. Поликсенова ВД. *Микозы томата: возбудители заболеваний, устойчивость растений*. Минск: БГУ; 2008. 159 с.
5. Соколов МС, Монастырский ОА, Покушова ЭА. *Экологизация защиты растений*. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН; 1994. 462 с.
6. Tarkka M, Hampp R. Secondary metabolites of soil streptomycetes in biotic interaction. In: Karlovsky P, editor. *Secondary Metabolites in Soil Ecology. Volume 14. Soil biology*. Berlin: Springer; 2008. p. 107–126.
7. Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;66(4):434–442. DOI: 10.1007/s00253-004-1664-9.
8. Chater KF, Biro S, Lee KJ, Painer T, Schrepf H. The complex extracellular biology of streptomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2010;34(2):171–198. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x.
9. Strap JL. Actinobacteria – plant interactions: A boon to agriculture. In: Maheshwari DK, editor. *Bacteria in agrobiology: plant growth responses*. Berlin: Springer; 2011. p. 285–307.
10. Goodfellow M, Simpson KE. Ecology of streptomycetes. *Frontiers in Applied Microbiology*. 1987;2:97–125.
11. Звягинцев ДГ, Зенова ГМ. *Экология актиномицетов*. Москва: ГЕОС; 2001. 257 с.
12. Широких ИГ. Антифунгальный потенциал актиномицетов в ризосфере ячменя на дерново-подзолистых почвах. *Почвоведение*. 2003;4:458–464.
13. Виноградова КА, Шаркова ТС, Александрова АВ, Кожевин ПА. Анализ межпопуляционных взаимодействий почвенных грибов и актиномицетов. *Микология и фитопатология*. 2005;39(3):28–40.
14. Новикова ИИ, Бойкова ИВ, Шенин ЮД. Биологические особенности и компонентный состав активного комплекса штамма *Streptomyces chrysomallus* P-21 – антагониста фитопатогенных грибов. *Вестник защиты растений*. 2006;3:13–21.
15. Омарова ЕО, Зенова ВК, Орлеанский ВК, Карпов ГА, Жегалло ЕА. Экологические особенности взаимодействия синезеленых водорослей (цианобактерии) и стрептомицетов как компонентов альгобактериальных ассоциаций. В: *Грибы и водоросли в биоценозах. Материалы международной конференции, посвященной 75-летию биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова; 31 января – 3 февраля 2006 г.; Москва, Россия*. Москва: МАКС Пресс; 2006. с. 116–117.
16. Домрачева ЛИ, Широких ИГ, Фокина АИ. Антифузариозное действие цианобактерий и актиномицетов в почве и ризосфере. *Микология и фитопатология*. 2009;43(2):157–165.
17. Белявская ЛА, Копылов ЕП, Шаховнина ЕА, Козырицкая ВЕ, Иутинская ГА. Стрептомицеты – перспективные продуценты биопестицидов. В: Дьяков ЮТ, редактор. *Современная микология в России. Том 3. Тезисы докладов 3-го съезда микологов России*. Москва: Национальная академия микологии; 2012. с. 332–333.
18. Широких ИГ, Рябова ОВ, Харина АВ, Коряковцева ЛА, Широких АА. Влияние штамма *Streptomyces hygrosopicus* A-4 на комплекс микромицетов – патогенов яровой мягкой пшеницы. *Микология и фитопатология*. 2013;47(6):410–416.
19. Бурцева СА, Бырса МН, Березюк ЮН, Васильчук АВ. Способность задерживать рост фитопатогенных грибов у стрептомицетов почв Молдовы. В: Дьяков ЮТ, Сергеев ЮВ, редакторы. *Современная микология в России. Том 7. Тезисы докладов 4-го съезда микологов России*. Москва: Национальная академия микологии; 2017. с. 20–22.
20. Раткевич ЕБ, Сидорова СГ. Антифунгальная активность грибов рода *Trichoderma* Pers.: Фг. и актиномицетов в отношении возбудителя фузариоза томата. В: Смолич ИИ, Демидчик ВВ, Падутов ВЕ, редакторы. *Клеточная биология и биотехнология растений. Тезисы докладов II Международной научно-практической конференции; 28–31 мая 2018 г.; Минск, Беларусь*. Минск: Издательский центр БГУ; 2018. с. 73–74.
21. Дудка ИА, Вассер СП, Элланская ИА, Коваль ЭЗ, Горбик ЛТ, Никольская ЕА и др. *Методы экспериментальной микологии*. Киев: Наукова думка; 1982. 52 с.
22. Поликсенова ВД, Храмцов АК, Пискун СГ. *Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4-го курса дневного отделения специальности G 31 01 01 «Биология»*. Минск: БГУ; 2004. 38 с.
23. Струнникова ОК, Шахназарова ВЮ, Вишневская НА. Развитие и взаимоотношение фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum* и антагонистической бактерии *Pseudomonas fluorescens* в почве, ризосфере и на корнях ячменя. В: *Фитосанитарное оздоровление экосистем. Материалы II Всероссийского съезда по защите растений; 10 декабря 2005 г.; Санкт-Петербург, Россия*. Санкт-Петербург: ВИЗР; 2005. с. 193–194.
24. Зенова ГМ. *Почвенные актиномицеты*. Москва: МГУ; 1992. 78 с.

References

1. Poliksenova VD. [Fusarium wilt of tomato]. *Zashchita rastenii*. 1987;6:51–52. Russian.
2. Piskun SG, Poliksenova VD, Anokhina VS. Intraspecific differentiation of the causative agent of fusarium wilting of tomatoes. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2002;3:36–41. Russian.
3. Piskun SG, Poliksenova VD, Anokhina VS. Phytotoxic activity by fusarium wilt of tomato causal agent. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2003;2:87–89. Russian.
4. Poliksenova VD. *Mikozy tomata: vzbuditeli zabolevaniy, ustoichivost' rastenii* [Tomato mycosis: pathogens, plants resistance]. Minsk: Belarusian State University; 2008. 159 p. Russian.
5. Sokolov MS, Monastirskiy OA, Pokushova YeA. *Ekologizatsiya zashchity rastenii* [Ecologization of plant protection]. Pushchino: ONTI PNTs RAN; 1994. 462 p. Russian.
6. Tarkka M, Hampp R. Secondary metabolites of soil streptomycetes in biotic interaction. In: Karlovsky P, editor. *Secondary Metabolites in Soil Ecology. Volume 14. Soil biology*. Berlin: Springer; 2008. p. 107–126.
7. Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;66(4):434–442. DOI: 10.1007/s00253-004-1664-9.
8. Chater KF, Biro S, Lee KJ, Painer T, Schrempf H. The complex extracellular biology of streptomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2010;34(2):171–198. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x.
9. Strap JL. Actinobacteria – plant interactions: A boon to agriculture. In: Maheshwari DK, editor. *Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses*. Berlin: Springer; 2011. p. 285–307.
10. Goodfellow M, Simpson KE. Ecology of streptomycetes. *Frontiers in Applied Microbiology*. 1987;2:97–125.
11. Zvyagintsev DG, Zenova GM. *Ekologiya aktinomitsetov* [Ecology of actinomycetes]. Moscow: GEOS; 2001. 257 p. Russian.
12. Shirokikh IG. [Antifungal potential of actinomycetes in the rhizosphere of barley on sod-podzol soils]. *Pochvovedenie*. 2003;4:458–464. Russian.
13. Vinogradova KA, Sharkova TS, Aleksandrova AB, Kozhevnikov PA. [Analysis of interpopulation interactions of soil fungi and actinomycetes]. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2005;39(3):28–40. Russian.
14. Novikova II, Boykova IV, Shenin YuD. [Biological features and component composition of the active complex of the strain *Streptomyces chrysomallus* P-21 an antagonist of phytopathogenic fungi]. *Vestnik zashchity rastenii*. 2006;3:13–21. Russian.
15. Omarova EO, Zenova VK, Orleanskiy VK, Karpov GA, Zhegallo EA. [Environmental features of the interaction of cyanobacteria and streptomycetes as components of algobacterial associations]. In: *Griby i vodorosli v biotsenozakh. Materialy mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchennoi 75-letiyu biologicheskogo fakul'teta MGU im. M. V. Lomonosova; 31 yanvarya – 3 fevralya 2006 g.; Moskva, Rossiya* [Fungi and algae in biocenoses. Materials of the international conference dedicated to the 75th anniversary of the faculty of biology of Lomonosov Moscow State University; 2006 January 31 – February 3; Moscow, Russia. Moscow: MAKSS Press; 2006. p. 116–117. Russian.
16. Domracheva LI, Shirokikh IG, Fokina AI. Cyanobacteria and actinomycetes influence against fusarium species in soil and rhizosphere. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2009;43(2):157–165. Russian.
17. Belyavskaya LA, Kopylov EP, Shakhovkina EA, Kozlytskaya VE, Iutinskaya GA. [Streptomycetes are promising producers of biopesticides]. In: D'yakov YuT, editor. *Sovremennaya mikologiya v Rossii. Tom 3. Tezisy dokladov 3-go s'ezda mikologov Rossii* [Modern mycology in Russia. Volume 3. Abstracts of the 3rd Congress of mycologists of Russia]. Moscow: National Academy of Mycology; 2012. p. 332–333. Russian.
18. Shirokikh IG, Ryabova OV, Kharina AB, Korjakovtseva LA, Shirokikh AA. Impact of *Streptomyces hygroscopicus* A-4 strain on microfungus complexes in the wheat rhizosphere. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2013;47(6):410–416. Russian.
19. Burtseva SA, Byrsa MN, Berezyuk YuN, Vasilchuk AV. [Ability to inhibit the growth of phytopathogenic fungi in streptomycetes of Moldavian soils]. In: D'yakov YuT, Sergeev YuV, editors. *Sovremennaya mikologiya v Rossii. Tom 7. Tezisy dokladov 4-go s'ezda mikologov Rossii* [Modern mycology in Russia. Volume 7. Abstracts of the 4th Congress of mycologists of Russia]. Moscow: National Academy of Mycology; 2017. p. 20–22. Russian.
20. Ratkevich EB, Sidorova SG. [Antifungal activity of fungi of the genus *Trichoderma* Pers.: Fr. and actinomycetes against the causative agent of tomato fusarium wilt. In: Smolich II, Demidchik VV, Padutov VE, editors. *Kletchnaya biologiya i biotekhnologiya rastenii. Tezisy dokladov II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 28–31 maya 2018 g.; Minsk, Belarus*] [Cell biology and plant biotechnology. Abstracts of the II International scientific and practical conference; 2018 May 28–31; Minsk, Belarus]. Minsk: BSU Publishing Center; 2018. p. 73–74. Russian.
21. Dudka IA, Vasser SP, Ellanskaya IA, Koval' EZ, Gorbik LT, Nikol'skaya EA, et al. *Metody eksperimental'noi mikologii* [Experimental mycology methods]. Kiev: Naukova dumka; 1982. 52 p. Russian.
22. Poliksenova VD, Khrantsov AK, Piskun SG. *Metodicheskie ukazaniya k zanyatiyam spetspraktikuma po razdelu «Mikologiya. Metody eksperimental'nogo izucheniya mikroskopicheskikh gribov» dlya studentov 4-go kursa dnevnogo otdeleniya spetsial'nosti G 31 01 01 «Biologiya»* [Methodical instructions for special workshop in the section «Mycology. Methods of experimental study of microscopic mushrooms» for 4th year students of the full-time department of speciality G 31 01 01 «Biologiya»]. Minsk: Belarusian State University; 2004. 38 p. Russian.
23. Strunnikova OK, Shakhnazarova VYu, Vishnevskaya NA. Development and relationship of the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* and the antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* in soil, rhizosphere and on the roots of barley. In: *Fitosanitar-noe ozdorovlenie ekosistem. Materialy II Vserossiiskogo s'ezda po zashchite rastenii; 10 dekabrya 2005 g.; Sankt-Peterburg, Rossiya* [Phytosanitary rehabilitation of ecosystems. Materials of the II All-Russian Congress on plant protection; 2005 December 10; Saint Petersburg, Russia]. Saint Petersburg: All-Russian Institute of Plant Protection; 2005. p. 193–194. Russian.
24. Zenova GM. *Pochvennye aktinomitsety* [Soil actinomycetes]. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 1992. 78 p. Russian.

Статья поступила в редакцию 07.10.2019.
Received by editorial board 07.10.2019.

ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ КОРКОВОГО ЭТАПА СЕНСОРНОЙ РЕЦЕПЦИИ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Е. Н. САВАНЕВСКАЯ¹⁾

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

Рассматривается методологическая проблема идентификации электроэнцефалографического коррелята вкусовой чувствительности в процессе рецепции сложных стимулов при участии нескольких сенсорных систем. В качестве примера определен паттерн активности коры больших полушарий при сенсорной рецепции раствора лимонной кислоты. По итогам анализа наиболее вероятным коррелятом вкусовой чувствительности представляется очаг бета-высокочастотной активности, наблюдаемый в правой фронтальной области коры. Другие очаги корковой активности, отмечаемые во время рецепции лимонной кислоты, отражают невкусовые формы чувствительности, возникающие под действием исследуемого раздражителя.

Ключевые слова: электроэнцефалография; вкусовая чувствительность; лимонная кислота.

ELECTROENCEPHALOGRAPHICAL CORRELATES OF CORTEX STAGE OF SENSORY CITRIC ACID PERCEPTION

A. M. SAVANEUSKAYA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

The article deals with the methodological problem faced while identifying the EEG-correlate of taste sense by perception of complex stimuli involving a wide spectrum of sensory systems. As an example we defined a brain cortex activity pattern by tasting citric acid. As a result most promising taste perception correlate was found in beta high frequency band of right frontal cortex area. Other loci of brain cortex activity observed by citric acid presentation reflect non-taste perception forms appearing as by-products of oral stimulation.

Keywords: electroencephalography; taste perception; citric acid.

Введение

В соответствии с аналитическим подходом к изучению функций сенсорных систем в современной исследовательской практике часто используются упрощенные стимулы, предъявляемые по отдельности [1; 2]. Однако даже в этом случае их перцепция является результатом взаимодействия нескольких воспринимающих сложный стимул рецепторов. Примером может служить рецепция вкусовых стимулов, помещенных в ротовую полость. Значительная часть работ по изучению процессов, сопровождающих возникновение вкусовых ощущений, действительно констатирует появление в сложном сигнале

Образец цитирования:

Саваневская ЕН. Электроэнцефалографические корреляты коркового этапа сенсорной рецепции лимонной кислоты. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:33–39.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-33-39>

For citation:

Savaneuskaya AM. Electroencephalographical correlates of cortex stage of sensory citric acid perception. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:33–39. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-33-39>

Автор:

Елена Николаевна Саваневская – аспирантка кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор А. Г. Чумак.

Author:

Alena M. Savaneuskaya, postgraduate student at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
esavaneuskaja@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6703-493X>

электроэнцефалограммы (ЭЭГ), регистрируемом от всей поверхности скальпа, нескольких корковых локусов активации нейронных сетей, одновременно присутствующих в коре на конечном этапе сенсорной рецепции вкуса пищи [3–11]. В подобных случаях бывает трудно или невозможно идентифицировать, являются ли все регистрируемые очаги активности отражением рецепции вкуса с участием обширных областей мозга, или же диффузная активация обусловлена эффектами, параллельно вызываемыми тактильным, температурным и другими раздражителями, действующими в полости рта при попадании пищевого комка или раствора нутриента [12; 13]. Проблема носит методологический характер и требует решения даже с учетом того, что при полимодальном пищевом ощущении происходит взаимодействие сенсорных систем и, как следствие, видоизменение реакции на каждую из них [14].

Современные исследования корковой фазы сенсорной рецепции нутриентов в организме человека основаны на методах, позволяющих с высокой точностью локализовать участки возбуждения, возникающие вследствие роста импульсной активности нейронных сетей в ответ на раздражение тех или иных рецепторов. Так, при исследовании вкусовой рецепции стимулов различной интенсивности используется функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ) [15; 16]. Однако ни один из методов не продемонстрировал возможность определить, каким или смесью каких видов чувствительности преимущественно обусловлено возникновение того или иного очага наблюдаемой корковой активности. Имеются сведения [17] и о том, что, кроме фМРТ, в качестве надежного способа получения информации о динамике корковых процессов при сенсорной рецепции пищевых веществ может выступать компьютерная электроэнцефалография.

Цель исследования – попытка применить метод компьютерной электроэнцефалографии в режиме картирования для определения реакций коры больших полушарий мозга человека при вкусовой рецепции лимонной кислоты с учетом действия сопутствующих тактильных и температурных раздражителей.

Материалы и методы исследования

В обследовании участвовали 20 девушек в возрасте от 18 до 21 года. Все они были правшами, отрицали наличие в анамнезе неврологических, гастроэнтерологических заболеваний, а также заболеваний, препятствующих восприятию вкуса, и употребление седативных препаратов. Испытуемые воздерживались от приема пищи, кофе, алкоголя, от курения как минимум в течение 3 ч до начала эксперимента. Для установления характера активации коры больших полушарий записывалась ЭЭГ. Обследование проводилось в полутемной комнате в полной тишине. Девушки находились в положении сидя в расслабленной позе с открытыми глазами с фиксацией взора перед собой. Запись ЭЭГ осуществлялась с помощью 8-канального компьютерного электроэнцефалографа Нейрон-Спектр-4 (ООО «Нейрософт», Россия). Смоченные в физрастворе мостиковые электроды в соответствии с международной схемой 10–20 % накладывались на точки Fp1, Fp2, C3, C4, T3, T4, референтные электроды располагались на мочках ушей.

Экспериментальный протокол состоял в следующем. Регистрация ЭЭГ-сигнала начиналась после приема и удержания (1 мин) в ротовой полости испытуемыми пищевой лимонной кислоты (10 мл водного 1 % раствора цитрата комнатной температуры). Затем обследуемому предлагалось проглотить раствор с последующей регистрацией ЭЭГ в течение 5 мин. Для получения контрольных значений мозговая активность записывалась без помещения раздражителей в ротовую полость.

Для анализа использовались 30-секундные периоды ЭЭГ, выделенные на нативной записи эксперимента после ручного удаления артефактов. В указанных записях рассчитывалась относительная спектральная мощность в частотных диапазонах α (8–14 Гц), $\beta_{H\Gamma}$ (14–20 Гц), Δ (0,5–4,0 Гц), Θ (4–8 Гц). Оценка достоверности различий между выборками определялась с помощью однофакторного дисперсионного анализа для зависимых наблюдений (one-way repeated-measures ANOVA) или критерия Фридмана (Friedman rank sum test), если распределение хотя бы одной из выборок не соответствовало закону Гаусса. При использовании ANOVA были соблюдены все требования, предъявляемые к выборке данным статистическим методом. Нормальность распределения проверялась по критерию Шапиро – Уилка, гомоскедастичность и сферичность – с помощью тестов Левене и Моучли соответственно. Апостериорные сравнения проводились с использованием теста Тьюки. Достоверность различий признавалась при $p < 0,05$. Все процедуры статистического анализа проводились в среде R. При визуализации характера электрической активности коры применялся метод частотного картирования спектральной мощности ЭЭГ.

Результаты и их обсуждение

Для того чтобы выявить локусы активации коры больших полушарий мозга на действие в ротовой полости раствора лимонной кислоты, сравнивали мощности ЭЭГ до и после приема. По итогам анализа установлено, что преобладающей формой реакции по выборке была активация нейронных сетей

коры правого полушария мозга, что не противоречит классическим [18] и современным [5] публикациям. Так, возрастание доли бета-высокочастотного компонента спектра наблюдалось в правом фронтальном отведении (рис. 1). Рост мощности бета-волн был отмечен и в правой теменной области коры (см. рис. 1). Кроме того, под правым центральным электродом зафиксировано падение спектральной мощности альфа-частот (рис. 2). То же самое происходило и с тета-частотами (рис. 3). Уменьшение доли альфа- и тета-волн в спектральном составе ЭЭГ отмечено и в правой височной зоне коры (см. рис. 2 и 3).

Кроме этого, нам удалось наблюдать и некоторые изменения левополушарной активности коры. Так, снизилась альфа-мощность ЭЭГ в правом лобном отведении (см. рис. 2).

После проглатывания раствора лимонной кислоты достоверный рост спектральной мощности в серии обнаружился лишь в бета-высокочастотном диапазоне в правой фронтальной области коры (см. рис. 1).

Правосторонняя межполушарная асимметрия зафиксирована также при сравнении паттернов ЭЭГ в процессе аппликации цитрата и после проглатывания. В частности, произошло снижение бета-мощности в правом центральном отведении (см. рис. 1). В этой области мозга снижалась тета-частотная активность. Падение тета-мощности наблюдалось и в правом темпоральном отведении (см. рис. 3). Рост спектральных значений отмечался в альфа-частотном диапазоне в правой височной области коры. Та же динамика зафиксирована в левом фронтальном отведении (см. рис. 2).

Ни на одном из этапов эксперимента не было зафиксировано изменений дельта-частотной активности во фронтальной коре (рис. 4), предлагаемой в качестве коррелята коркового этапа вкусовой рецепции [19]. В такой ситуации коррелятом финального этапа рецепции вкуса с равной вероятностью могут служить все обнаруженные очаги мозговой активности. Результаты по данной серии отличаются от сделанных нами ранее наблюдений с использованием в качестве стимулов глюкозы и поваренной соли [20; 21]. Кроме того, неясно, индуцирует ли вкусовая стимуляция всю наблюдаемую активность целиком или только некоторую ее часть. Согласно современным представлениям [14] более вероятно, что наряду с перцепцией вкуса в этой активности отражены другие виды чувствительности, в частности тактильной, индуцированной помещением лимонной кислоты на язык.

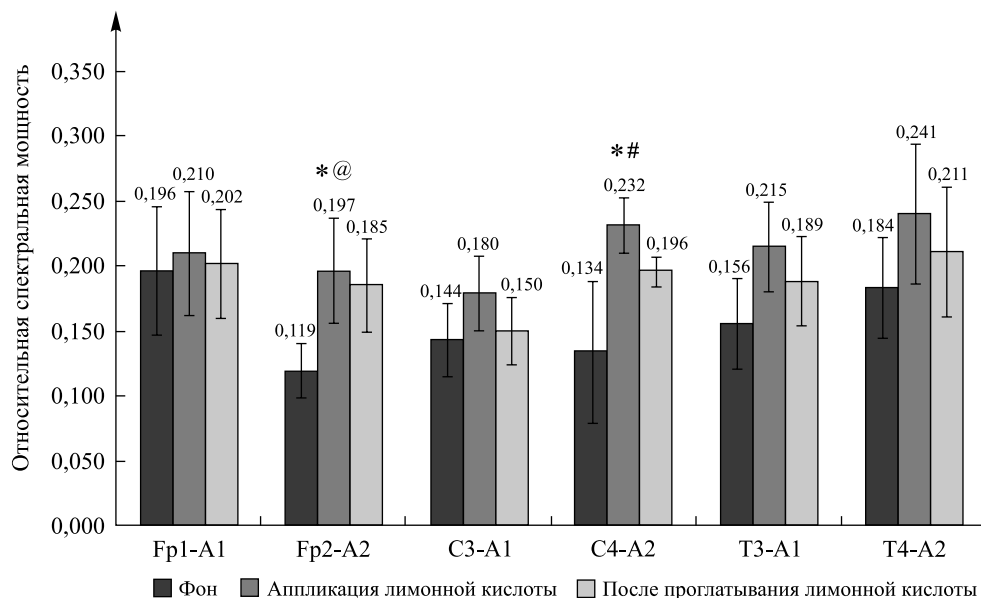


Рис. 1. Изменение относительной спектральной мощности ЭЭГ-сигнала в бета-высокочастотном диапазоне (ось ординат) при аппликации на язык лимонной кислоты, а также после ее проглатывания.

По оси абсцисс указаны точки отведения и сравнения показателя (электроды).

Достоверность различий между средними по выборке показателями:

* – в контроле и при аппликации раствора лимонной кислоты,

– в контроле и после проглатывания, @ – при аппликации и после проглатывания

Fig. 1. Relative EEG spectral power changes in beta high frequency band (Y axis) by putting citric acid on the tongue as well as after swallowing.

Here and further registration leads (electrodes) are laid off as abscissa.

Symbol * here and further emphasizes significant differences between mean values in control and by citric acid administration, # – in control and after swallowing,

@ – by acid administration and after swallowing

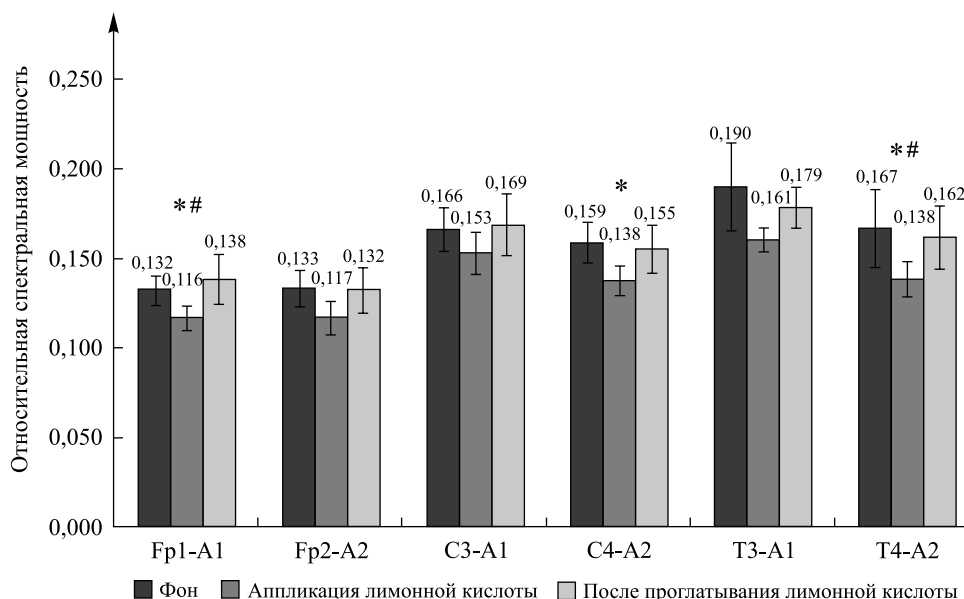


Рис. 2. Изменение относительной спектральной мощности ЭЭГ-сигнала в альфа-диапазоне (ось ординат) при аппликации на язык лимонной кислоты, а также после ее проглатывания. По оси абсцисс указаны точки отведения и сравнения показателя (электроды)

Fig. 2. Relative EEG spectral power changes in alpha band (Y axis) by putting citric acid on the tongue as well as after swallowing. Here and further registration leads (electrodes) are laid off as abscissa

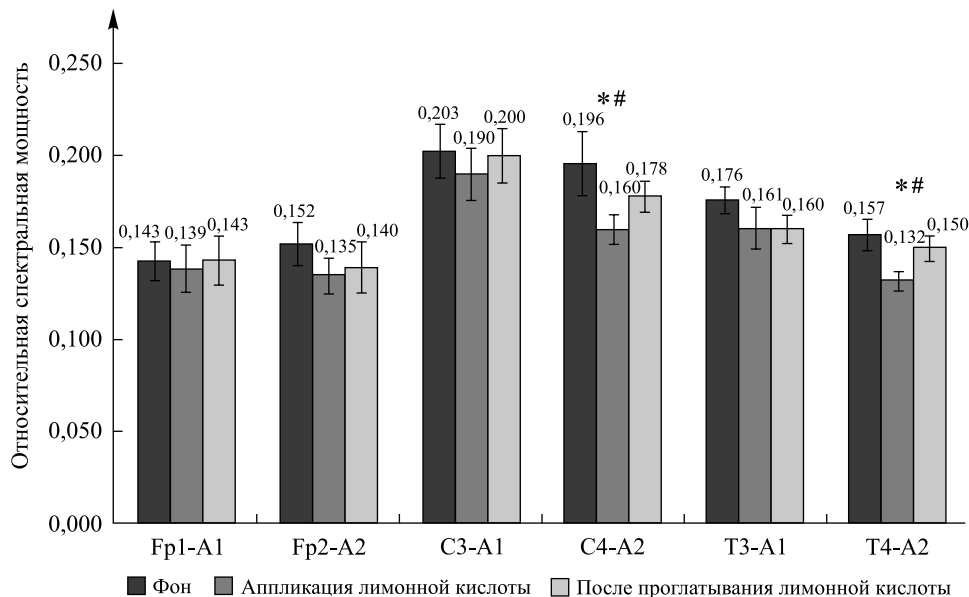


Рис. 3. Изменение относительной спектральной мощности ЭЭГ-сигнала в тета-диапазоне (ось ординат) при аппликации на язык лимонной кислоты, а также после ее проглатывания. По оси абсцисс указаны точки отведения и сравнения показателя (электроды)

Fig. 3. Relative EEG spectral power changes in theta band (Y axis) by putting citric acid on the tongue as well as after swallowing. Here and further registration leads (electrodes) are laid off as abscissa

Для устранения указанной неясности видится целесообразным сравнение очагов активности, вызванной относительно фона аппликацией раствора цитрата и его проглатыванием, которое в этой связи является способом сохранения ощущения вкуса на языке при одновременном устранении сопутствующих соматосенсорных влияний. По итогам сравнения локусы, обнаруженные при аппликации и сохранившиеся после проглатывания раствора, логично рассматривать в качестве коррелятов вкусовой чувствительности.

Общим для обоих этапов оказался только очаг бета-высокочастотной активности в правом фронтальном отведении. Можно предположить, что именно он является коррелятом вкусовой чувствительности в общем паттерне сенсорной активации коры (рис. 5). Из условий эксперимента следует, что остальные сдвиги электрической активности в коре мозга испытуемых могут быть обусловлены как невкусовыми формами чувствительности в полости рта, так и возбуждением интерорецепторов. Если указанная

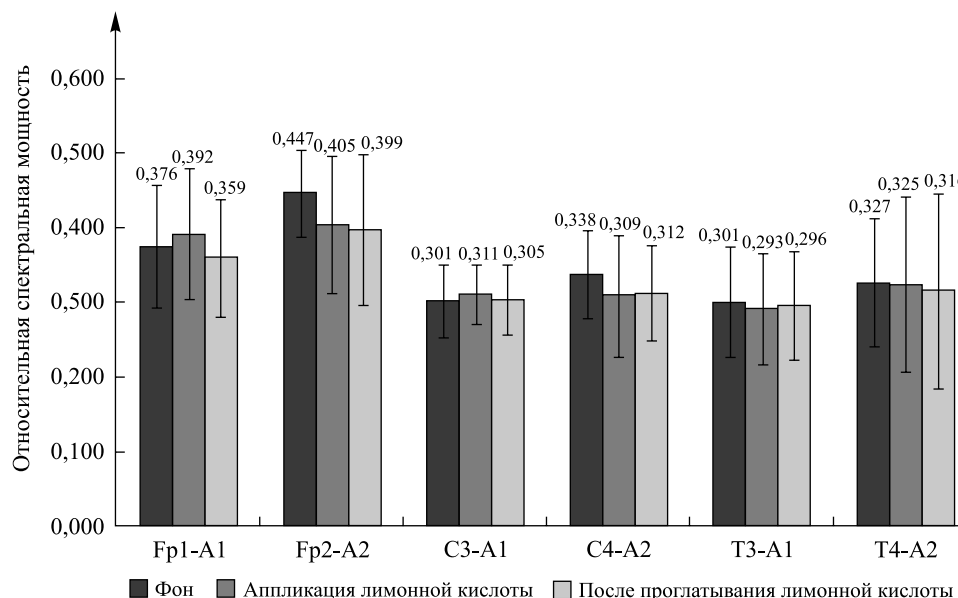


Рис. 4. Изменение относительной спектральной мощности ЭЭГ-сигнала в дельта-диапазоне (ось ординат) при аппликации на язык лимонной кислоты, а также после ее проглатывания. По оси абсцисс указаны точки отведения и сравнения показателя (электроды)

Fig. 4. Relative EEG spectral power changes in delta band (Y axis) by putting citric acid on the tongue as well as after swallowing.

Here and further registration leads (electrodes) are laid off as abscissa

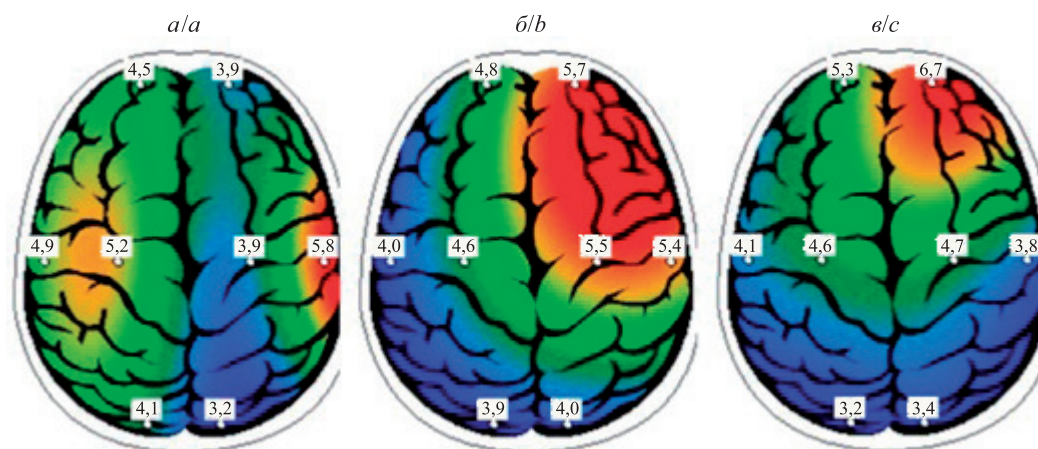


Рис. 5. Локализация максимальной мощности бета-высокочастотного компонента ЭЭГ-спектра в контроле (а), в процессе нахождения раствора лимонной кислоты в полости рта (б) и после проглатывания (в) (цифрами обозначена полная мощность, μV^2)

Fig. 5. Localization of the EEG beta band highest spectral power in control (a), by placing citric acid solution into the oral cavity (b) and after swallowing (c) (total spectral power pointed, μV^2)

активация связана с соматосенсорными сигналами из полости рта, то после проглатывания она будет снижаться в тех точках, в которых выросла при первоначальной аппликации раствора кислоты.

Сравним локализацию активности коры при предъявлении лимонной кислоты с расположением очагов, сохранившихся относительно присутствия ее во рту после проглатывания. Зафиксировано снижение мощности ЭЭГ после проглатывания раствора цитрата в тех же отведениях и частотных диапазонах (за исключением тета-ритма), где наблюдался ее рост при предъявлении кислоты. Это позволяет определить паттерн активации коры при рецепции цитрата в ротовой полости как совокупностью коррелятов вкусовых и соматосенсорных влияний.

Заключение

В ходе исследования был установлен паттерн активации коры больших полушарий в процессе сенсорной рецепции носителя вкуса наименее изученной модальности – раствора лимонной кислоты – в полости рта [22]. Полученные результаты позволяют предположить, что наблюдаемая динамика ЭЭГ является коррелятом вкусовой рецепции, а также соматосенсорной чувствительности, индуцируемых раствором цитрата в ротовой полости. При этом проекция вкусовой рецепции на кору больших полушарий сопровождается возникновением локуса бета-активности в правой фронтальной области коры, что подтверждает и конкретизирует данные литературы [5]. Указанное справедливо лишь с учетом частичной обусловленности одних ЭЭГ-коррелятов чувствительности другими ввиду одновременной рецепции лимонной кислоты несколькими сенсорными системами [14]. Стоит отметить, что ни в одной из областей коры не обнаружено изменения доли дельта-частот в спектре ЭЭГ, выявленного в [19] при изучении мозгового этапа рецепции вкуса.

Библиографические ссылки

1. Beauchamp GK. Basic taste: a perceptual concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;13:1–40. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03542.
2. Sonkusare S, Breakspear M, Guo Chr. Naturalistic stimuli in neuroscience: critically acclaimed. *Trends in Cognitive Science*. 2019;23(8):699–714. DOI: 10.1016/j.tics.2019.05.004.
3. de Araujo IE, Simon SA. The gustatory cortex and multisensory integration. *International Journal of Obesity*. 2009;33(2):S34–S43. DOI: 10.1038/ijo.2009.70.
4. Driver J, Noesselt T. Multisensory interplay reveals crossmodal influences on «sensory-specific» brain regions, neural responses, and judgments. *Neuron*. 2008;57(1):11–23. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.12.013.
5. Fox NA, Davidson RJ. Taste-elicited changes in facial signs of emotions and the asymmetry of brain electrical activity in human newborns. *Neuropsychologia*. 1986;24(3):417–422. DOI: 10.1016/0028-3932(86)90028-x.
6. Fry Vennerød FF, Nicklaus S, Lien N, Almlí VL. The development of basic taste sensitivity and preferences in children. *Appetite*. 2018;127:130–137. DOI: 10.1016/j.appet.2018.04.027.
7. Ghazanfar AA, Schroeder CE. Is neocortex essentially multisensory? *Trends in Cognitive Sciences*. 2010;10:278–285. DOI: 10.1016/j.tics.2006.04.008.
8. Hartley IE, Liem DG, Keast R. Umami as an ‘alimentary’ taste. A new perspective on taste classification. *Nutrients*. 2019;11(1):182–200. DOI: 10.3390/nu11010182.
9. Jones LM, Fontanini A, Sadacca BF, Miller P, Katz DB. Natural stimuli evoke dynamic sequences of states in sensory cortical ensembles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(47):18772–18777. DOI: 10.1073/pnas.0705546104.
10. Katz DB, Simon SA, Nicolelis MAL. Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *Journal of Neuroscience*. 2001;21:4478–4489. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-12-04478.2001.
11. Ohla K, Toepel U, le Coutre J, Hudry J. Electrical neuroimaging reveals intensity-dependent activation of human cortical gustatory and somatosensory areas by electric taste. *Biological Psychology*. 2010;85(3):446–455. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2010.09.007.
12. Chikazoe J, Lee DH, Kriegeskorte N, Anderson AK. Distinct representations of basic taste qualities in human gustatory cortex. *Nature Communications*. 2019;10:1048. DOI: 10.1038/s41467-019-08857-z.
13. Small DM, Jones-Gotman M, Zatorre RJ, Petrides P, Evans AC. Flavor processing: more than a sum in its parts. *NeuroReport*. 1997;8(18):3913–3917. DOI: 10.1097/00001756-199712220-00014.
14. Kaskan PM, Dean AM, Nicholas MA, Mitz AR, Murray EA. Gustatory responses in macaque monkeys revealed with fMRI: comments on taste, taste preference, and internal state. *NeuroImage*. 2019;184:932–942. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.10.005.
15. Grabenhorst F, Rolls ET, Bilderbeck A. How cognition modulates affective responses to taste and flavor: top-down influences on the orbitofrontal and pregenual cingulate cortices. *Cerebral Cortex*. 2008;18(7):1549–1559. DOI: 10.1093/cercor/bhm185.
16. Grabenhorst F, Rolls ET. Selective attention to affective value alters how the brain processes taste stimuli. *European Journal of Neuroscience*. 2008;27:723–729. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06033.x.
17. Yiannakas A, Rosenblum K. The insula and taste learning. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017;10:1–24. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00335.
18. Kotini A, Anninos P, Gemousakakis T, Adamopoulos A, et al. The effects of sweet, bitter, salty and sour stimuli on alpha rhythm. A Meg Study. *Maedica (Buchar)*. 2016;11(3):208–213. PMID: PMC5486162.
19. Wallroth R, Höhenberger R, Ohla K. Delta activity encodes taste information in the human brain. *NeuroImage*. 2018;181:471–479. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.07.034.

20. Саваневская ЕН, Люзина КМ, Чумак АГ. Электрическая активность мозга при активации вкусового анализатора. В: *Актуальные вопросы физиологии. Сборник материалов научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию кафедры нормальной физиологии ГрГМУ; 23 мая 2019 г.; Гродно, Беларусь*. Гродно: ГрГМУ; 2019. с. 214–218.
21. Саваневская ЕН, Чумак АГ. Электрофизиологические корреляты активации орбито-фронтальной коры мозга в процессе сенсорной рецепции сладкого. *Новости медико-биологических наук*. 2019;19:16–22.
22. Wenlei Y, Rui BC, Jeremy DB, Yu-Hsiang T, Eric MM, Courtney EW, et al. The K^+ channel $K_{IR}2.1$ functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(2):E229–E238. DOI: 10.1073/pnas.1514282112.

References

1. Beauchamp GK. Basic taste: a perceptual concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;13:1–40. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03542.
2. Sonkusare S, Breakspear M, Guo Chr. Naturalistic stimuli in neuroscience: critically acclaimed. *Trends in Cognitive Science*. 2019;23(8):699–714. DOI: 10.1016/j.tics.2019.05.004.
3. de Araujo IE, Simon SA. The gustatory cortex and multisensory integration. *International Journal of Obesity*. 2009;33(2):S34–S43. DOI: 10.1038/ijo.2009.70.
4. Driver J, Noesselt T. Multisensory interplay reveals crossmodal influences on «sensory-specific» brain regions, neural responses, and judgments. *Neuron*. 2008;57(1):11–23. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.12.013.
5. Fox NA, Davidson RJ. Taste-elicited changes in facial signs of emotions and the asymmetry of brain electrical activity in human newborns. *Neuropsychologia*. 1986;24(3):417–422. DOI: 10.1016/0028-3932(86)90028-x.
6. Fry Vennerød FF, Nicklaus S, Lien N, Almlil VL. The development of basic taste sensitivity and preferences in children. *Appetite*. 2018;127:130–137. DOI: 10.1016/j.appet.2018.04.027.
7. Ghazanfar AA, Schroeder CE. Is neocortex essentially multisensory? *Trends in Cognitive Sciences*. 2010;10:278–285. DOI: 10.1016/j.tics.2006.04.008.
8. Hartley IE, Liem DG, Keast R. Umami as an ‘alimentary’ taste. A new perspective on taste classification. *Nutrients*. 2019;11(1):182–200. DOI: 10.3390/nu11010182.
9. Jones LM, Fontanini A, Sadacca BF, Miller P, Katz DB. Natural stimuli evoke dynamic sequences of states in sensory cortical ensembles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(47):18772–18777. DOI: 10.1073/pnas.0705546104.
10. Katz DB, Simon SA, Nicolelis MAL. Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *Journal of Neuroscience*. 2001;21:4478–4489. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-12-04478.2001.
11. Ohla K, Toepel U, le Coutre J, Hudry J. Electrical neuroimaging reveals intensity-dependent activation of human cortical gustatory and somatosensory areas by electric taste. *Biological Psychology*. 2010;85(3):446–455. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2010.09.007.
12. Chikazoe J, Lee DH, Kriegeskorte N, Anderson AK. Distinct representations of basic taste qualities in human gustatory cortex. *Nature Communications*. 2019;10:1048. DOI: 10.1038/s41467-019-08857-z.
13. Small DM, Jones-Gotman M, Zatorre RJ, Petrides P, Evans AC. Flavor processing: more than a sum in its parts. *NeuroReport*. 1997;8(18):3913–3917. DOI: 10.1097/00001756-199712220-00014.
14. Kaskan PM, Dean AM, Nicholas MA, Mitz AR, Murray EA. Gustatory responses in macaque monkeys revealed with fMRI: comments on taste, taste preference, and internal state. *NeuroImage*. 2019;184:932–942. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.10.005.
15. Grabenhorst F, Rolls ET, Bilderbeck A. How cognition modulates affective responses to taste and flavor: top-down influences on the orbitofrontal and pregenual cingulate cortices. *Cerebral Cortex*. 2008;18(7):1549–1559. DOI: 10.1093/cercor/bhm185.
16. Grabenhorst F, Rolls ET. Selective attention to affective value alters how the brain processes taste stimuli. *European Journal of Neuroscience*. 2008;27:723–729. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06033.x.
17. Yiannakas A, Rosenblum K. The insula and taste learning. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017;10:1–24. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00335.
18. Kotini A, Anninos P, Gemousakakis T, Adamopoulos A, et al. The effects of sweet, bitter, salty and sour stimuli on alpha rhythm. A Meg Study. *Maedica (Buchar)*. 2016;11(3):208–213. PMID: PMC5486162.
19. Wallroth R, Höhenberger R, Ohla K. Delta activity encodes taste information in the human brain. *NeuroImage*. 2018;181:471–479. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.07.034.
20. Savaneuskaya AM, Liuzina KM, Chumak AG. [Electrical brain activity by activation of gustatory system]. In: *Aktual'nye voprosy fiziologii. Sbornik materialov nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 60-letiyu kafedry normal'noi fiziologii GrGМУ; 23 maya 2019 g.; Grodno, Belarus* [Current questions in physiology. Proceedings of scientific-practical conference with international participation dedicated to the 60th anniversary of the department of normal physiology of GrSMU; 2019 May 23; Grodno, Belarus]. Grodno: Grodno State Medical University; 2019. p. 214–218. Russian.
21. Savaneuskaya AM, Chumak AG. Frontal cortex activation by tasting sweet as well as taste mixtures. *News of Biomedical Sciences*. 2019;19:16–22. Russian.
22. Wenlei Y, Rui BC, Jeremy DB, Yu-Hsiang T, Eric MM, Courtney EW, et al. The K^+ channel $K_{IR}2.1$ functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(2):E229–E238. DOI: 10.1073/pnas.1514282112.

Статья поступила в редакцию 13.09.2019.
Received by editorial board 13.09.2019.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ХЛОРИДА МАГНИЯ

Р. В. ЯНКО¹⁾, Е. Г. ЧАКА¹⁾, И. Г. ЛИТОВКА¹⁾, М. И. ЛЕВАШОВ¹⁾

¹⁾Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины,
ул. Богомольца, 4, 01024, г. Киев, Украина

В работе исследовались морфологические изменения печени крыс разного возраста после продолжительного введения хлорида магния. Эксперименты выполнены на 48 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 3 и 15 мес. Подопытные животные в дополнение к стандартному рациону питания ежедневно в течение 21 сут получали хлорид магния в дозе 50 мг/кг массы тела. Из ткани печени изготавливали гистологические препараты по стандартной методике. Морфометрию осуществляли с помощью компьютерной программы *Image J*. В сыворотке крови и суспензии эритроцитов определяли концентрацию катионов магния. Из результатов исследований следует, что введение хлорида магния активирует процессы физиологической регенерации и функциональной активности паренхимы печени у крыс разного возраста. Об этом свидетельствует увеличение количества двоядерных клеток и ядрышек в ядрах гепатоцитов, возрастание ядерно-цитоплазматического и ядрышко-ядерного соотношения. В печени 3-месячных подопытных животных выявлено возрастание относительной площади сетки синусоидов, а также увеличение количества и плотности размещения клеток соединительной ткани, что может указывать на повышение трофической и защитной активности стромы в этом органе. Выявлено умеренное повышение содержания магния в суспензии эритроцитов и сыворотке крови у подопытных крыс (особенно у 15-месячных). Таким образом, после введения хлорида магния имеют место морфологические признаки повышения физиологической регенерации и функциональной активности паренхимы печени как у молодых (в большей степени), так и у взрослых животных.

Ключевые слова: хлорид магния; печень; гепатоцит.

Образец цитирования:

Янко РВ, Чака ЕГ, Литовка ИГ, Левашов МИ. Морфологические изменения печени крыс разного возраста после введения хлорида магния. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:40–48. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-40-48>

For citation:

Yanko RV, Chaka EG, Litovka IG, Levashov MI. Morphological changes in the rat's liver of different age after administration of magnesium chloride. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:40–48. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-40-48>

Авторы:

Роман Васильевич Янко – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник отдела клинической физиологии соединительной ткани.

Елена Георгиевна Чака – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник отдела клинической физиологии соединительной ткани.

Ирина Георгиевна Литовка – доктор биологических наук, старший научный сотрудник; ведущий научный сотрудник отдела клинической физиологии соединительной ткани.

Михаил Иванович Левашов – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник; заведующий отделом клинической физиологии соединительной ткани.

Authors:

Roman V. Yanko, PhD (biology); senior researcher at the department of clinical physiology of connective tissue.

biolag@ukr.net

<http://orcid.org/0000-0002-0397-7517>

Elena G. Chaka, PhD (biology); senior researcher at the department of clinical physiology of connective tissue.

lenchaka@ukr.net

<http://orcid.org/0000-0001-7425-2751>

Irina G. Litovka, doctor of science (biology), senior researcher; leading researcher at the department of clinical physiology of connective tissue.

litir@biph.kiev.ua

<http://orcid.org/0000-0001-9163-3572>

Mikhail I. Levashov, doctor of science (medicine), senior researcher; head of the department of clinical physiology of connective tissue.

levashov@biph.kiev.ua

<http://orcid.org/0000-0003-1354-2047>

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RAT'S LIVER OF DIFFERENT AGE AFTER ADMINISTRATION OF MAGNESIUM CHLORIDE

R. V. YANKO^a, E. G. CHAKA^a, I. G. LITOVKA^a, M. I. LEVASHOV^a

^aA. A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine,
4 Bogomoletz Street, Kiev 01024, Ukraine

Corresponding author: R. V. Yanko (biolag@ukr.net)

The aim of the work was to study the morphological changes in the rat's liver of different ages after prolonged administration of magnesium chloride. The experiments were performed on 48 Wistar male rats at 3 and 15 months of age. Experimental animals, in addition to the standard diet, received magnesium chloride daily for 21 days at a dose of 50 mg/kg of body weight. Histological preparations were made from the liver tissue according to the standard method. The liver morphometry was performed on digital images using the computer program *Image J*. The content of magnesium cations was determined in the serum and suspension of red blood cells. Based on the results of our studies, it can be assumed that the administration of magnesium chloride activates the processes of physiological regeneration and functional activity of the liver parenchyma in rats of different ages. This is evidenced by an increase in the number of binuclear cells and nucleolus in the nucleus of hepatocytes, an increase in the nuclear-cytoplasmic and nucleolar-nuclear ratio. The relative area of the sinusoid network, the number and density of connective tissue cells were increased in the liver of 3-month-old experimental rats. This may indicate an increase of trophic and protective activity of the stroma in this organ. Experimental rats (15-month-old animals) revealed a moderate increasing in the erythrocyte suspension and blood serum magnesium content. The administration of magnesium chloride has the morphological features indicating an increasing of the physiological regeneration and activity of the liver parenchyma in young (to a greater extent) and adult animals.

Keywords: magnesium chloride; liver; hepatocyte.

Введение

В печени протекают сложные процессы обмена белков, липидов, углеводов, биологически активных веществ, а также макро- и микроэлементов. Так, она участвует в обеспечении постоянства содержания в крови большинства макроэлементов, регулируя их поступление, депонирование и выведение из организма. Поскольку все звенья минерального обмена теснейшим образом связаны с печенью, развитие патологических процессов, сопровождающихся снижением ее функциональной активности, может нарушать обмен микро- и макроэлементов [1]. Среди наиболее распространенных причин ухудшения работы печени, таких как злоупотребление алкоголем и лекарственными препаратами, неправильное питание, инфекции, особое место занимает возрастной фактор. В этой связи поиск новых средств повышения активности печени является весьма актуальным. Одно из таких возможных средств – использование макроэлементов, необходимых живым организмам для обеспечения нормальной жизнедеятельности, и прежде всего магния.

Нормальный уровень магния признан основополагающей константой, контролирующей здоровье человека. Среди катионов, присутствующих в организме, магний по концентрации занимает четвертое место, а внутри клетки – второе после калия. Установлено наличие более 290 генов и белковых соединений в последовательности генома человека, которые способны связывать магний как кофактор множества ферментов, участвующих более чем в 300 внутриклеточных биохимических реакциях. Данный макроэлемент необходим для нормального протекания большого количества физиологических процессов, которые обеспечивают энергетику и функции различных органов, что определяет его ведущую роль в системном функционировании и позволяет рассматривать как важнейший регулирующий фактор жизнедеятельности [2]. Магний контролирует работу многих органов и систем: нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой, костно-мышечной, пищеварительного тракта и др. [3–6].

Известно, что с возрастом снижается уровень активности большинства физиологических функций организма, падает сопротивляемость воздействию различных факторов внешней среды, нарушается работа многих органов, в том числе и печени: изменяется ее морфологическое строение, снижается функциональная способность [7]. В процессе онтогенеза печень по-разному реагирует на одни и те же воздействия. Не является исключением и возрастная восприимчивость этим органом макроэлементов, особенно магния. Данные литературы о влиянии такового на структуру и функцию печени часто имеют неоднозначный характер. Это связано с использованием различных препаратов магния и их дозировок, сезонностью и продолжительностью проведения экспериментов и т. д. [8; 9]. Вместе с тем до настоящего времени практически отсутствуют сведения об особенностях воздействия

магния на гистоморфологические изменения печени у животных с различным возрастом. Поэтому, чтобы сравнить и проанализировать возрастные морфологические особенности печени после введения магния, в эксперимент нами были взяты разновозрастные крысы.

Цель данной работы – исследовать возрастные закономерности морфологических изменений печени после продолжительного введения хлорида магния.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 48 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 3 и 15 мес. в весенний период. В качестве естественного источника ионов магния использовали хлорид магния, который встречается в природе в виде минерала бишофита и входит в состав некоторых минеральных вод. Хлорид магния широко применяется в медицинской практике в профилактических и лечебных целях.

Крысы были разделены на четыре группы (по 12 животных в каждой): I и III – 3- и 15-месячные контрольные животные соответственно, II и IV – 3- и 15-месячные подопытные крысы соответственно. Животные ежедневно (в 10 ч утра) получали перорально хлорид магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) в дозе 50 мг/кг в течение 21 сут. Во избежание стресса, связанного с принудительным введением, препарат (после предварительного измельчения) добавляли в пищу с сырной массой и осуществляли визуальный контроль полного поедания порции. Крысы контрольной группы получали аналогичную порцию сырной массы без магния. С учетом того что биодоступность хлорида магния не превышает 50 %, такая доза может рассматриваться как профилактическая, так как не приводит к существенному повышению его содержания в организме, но является достаточной для коррекции возможного дефицита магния до значений физиологической нормы. Животные всех групп находились в унифицированных условиях со стандартным рационом питания. По завершении эксперимента крыс декапитировали под эфирным наркозом. Исследования проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), а также комитета по биомедицинской этике Института физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины.

Для морфологических и морфометрических исследований методом слепой рандомизации отбирали образцы ткани печени, из которых изготавливали гистологические препараты по стандартной методике: фиксировали в жидкости Буэна, обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм изготавливали на санном микротоме, окрашивали гематоксилином Бемеера и эозином. Для визуализации элементов соединительной ткани применяли методы двух- и трехцветной окраски по Ван Гизону и Массону [10]. С использованием цифровой камеры микропрепараты фотографировали на микроскопе Nicon (Япония). Морфометрию осуществляли с помощью компьютерной программы *Image J*.

На гистологических срезах печени измеряли средний диаметр, площадь поперечного сечения гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы, определяли ядерно-цитоплазматическое соотношение, находили количество одно- и двуядерных клеток и плотность размещения гепатоцитов, подсчитывали количество ядрышек в ядрах гепатоцитов и определяли ядрышко-ядерное соотношение, измеряли расстояние между смежными ядрами гепатоцитов. Ядрышко-ядерное соотношение рассчитывали по формуле $\Sigma S_{\text{ядрышек}} / (S_{\text{ядра}} - \Sigma S_{\text{ядрышек}})$, где $\Sigma S_{\text{ядрышек}}$ – общая сумма площадей ядрышек в ядре; $S_{\text{ядра}}$ – площадь ядра. Количество гепатоцитов находили в 10 полях зрения микроскопа (при увеличении в 800 раз), количество ядрышек подсчитывали на 100 ядер гепатоцитов, измерение диаметра и площади осуществляли для каждой клетки с определением среднего значения относительно 100 клеток. С использованием метода наложения точечных морфометрических сеток определяли относительную площадь сетки синусоидов и относительную площадь паренхимы печени. Рассчитывали коэффициент Vizotto – отношение относительной площади сетки синусоидов к относительной площади паренхимы печени. Подсчитывали количество и определяли плотность размещения клеток соединительной ткани (синусоидальных клеток: Купфера, Ито, тучных и Pit). Находили отношение количества клеток соединительной ткани к количеству гепатоцитов [11].

Содержание катионов магния (ммоль/л) в суспензии эритроцитов и сыворотке крови определяли фотометрическим методом с использованием стандартных наборов реактивов (*Diagnosticum*, Венгрия). Принцип метода заключается в измерении интенсивности окраски комплекса красного цвета, образовавшегося при взаимодействии магния с титановым желтым в присутствии гидроксилamina, который стабилизирует окраску [12; 13].

Статистическую обработку осуществляли методами вариационной статистики с помощью компьютерной программы *Statistica 6.0*. Нормальность распределения цифровых массивов проверяли, используя критерий Пирсона. Все результаты исследований подчинялись закону нормального распределения. Для оценки достоверности различий средних величин контрольной и подопытной групп животных использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Как известно, основная часть магния в организме находится в клетках и костных тканях. Только 1 % общего магния локализуется во внеклеточных жидкостях, и около 0,3 % присутствует в сыворотке [14]. Тем не менее определение его концентрации в сыворотке крови и эритроцитах наиболее часто используется в лабораторной практике. Нами выявлено, что содержание магния в сыворотке крови и эритроцитах 15-месячных крыс контрольной группы было достоверно ниже, чем у 3-месячных, на 30 и 28 % соответственно (табл. 1). Это согласуется с общеизвестными данными о том, что с возрастом ухудшается всасывание магния в кишечнике и увеличивается риск развития его дефицита в организме [15].

Таблица 1

Содержание катионов магния в суспензии эритроцитов
и сыворотке крови ($n = 12$, $M \pm m$), ммоль/л

Table 1

The content of magnesium cations in the suspension
of red blood cells and blood serum ($n = 12$, $M \pm m$), mmol/L

Показатели	Крысы			
	3-месячные		15-месячные	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Содержание магния: в сыворотке крови эритроцитах	$1,84 \pm 0,08$	$1,80 \pm 0,04$	$1,28 \pm 0,14^{**}$	$1,48 \pm 0,08^*$
	$1,78 \pm 0,07$	$2,09 \pm 0,08^*$	$1,28 \pm 0,05^{**}$	$1,50 \pm 0,07^*$

* $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем 3-месячных крыс.

У подопытных крыс 15-месячного возраста после 21-суточного введения хлорида магния его содержание в сыворотке крови было на 16 % ($p < 0,05$) выше, чем у контрольных, тогда как у 3-месячных подопытных крыс концентрация магния в сыворотке крови не изменялась. Это можно объяснить тем, что молодым животным при сбалансированном рационе питания магния вполне достаточно, поэтому его излишек выводится из организма и он не накапливается в сыворотке крови. В суспензии эритроцитов подопытных крыс независимо от возраста содержание магния было на 17 % ($p < 0,05$) выше, чем у контрольных животных (см. табл. 1).

После введения хлорида магния паренхима печени крыс как 3-месячных, так и 15-месячных сохраняла физиологическую структуру. Гепатоциты – среднего размера, с хорошо выраженными контурами. Ядра – округлой формы, с центральным расположением в клетке. Структурные границы долек не четкие, что свойственно данному виду животных. Междольковая соединительная ткань слабо выражена. Ядрышки – округлой формы, среднего размера (≈ 1 мкм) (см. рисунок).

Большинство морфометрических показателей гепатоцитов контрольных крыс разного возраста не имели существенных отличий, тогда как активность соединительной ткани в печени 15-месячных крыс, по сравнению с 3-месячными, была несколько выше. Об этом свидетельствуют достоверно большие величины относительной площади сетки синусоидов (на 39 %), коэффициента Vizotto (на 42 %), количества и плотности размещения клеток соединительной ткани в печени (на 18 и 17 % соответственно) взрослых крыс (табл. 2).

Выявлено, что структурные изменения в паренхиме печени 3-месячных крыс, получавших хлорид магния, проявлялись в большей степени, чем у 15-месячных подопытных животных. У молодых крыс после введения хлорида магния наблюдали тенденцию к уменьшению площади поперечного сечения гепатоцитов и их цитоплазмы на 8 и 9 % соответственно по сравнению с контролем. Площадь ядра оставалась без изменений, что привело к достоверному возрастанию ядерно-цитоплазматического соотношения на 13 % по сравнению с контрольным значением. У взрослых подопытных крыс данные показатели не изменялись (см. табл. 2).

Ядерно-цитоплазматическое соотношение – это морфологический показатель, который позволяет оценить уровень метаболизма, выявить степень проявления компенсаторных реакций. Он также является одним из важных параметров процессов регенерации и функциональной активности клетки. Увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения свидетельствует о возрастании функциональной активности ядра гепатоцитов, что может указывать на подготовку клетки к митозу и связанную с ним интенсификацию синтеза нуклеиновых кислот, белков и т. д. [16].

Таблица 2

Морфометрические показатели печени ($n = 12, M \pm m$)

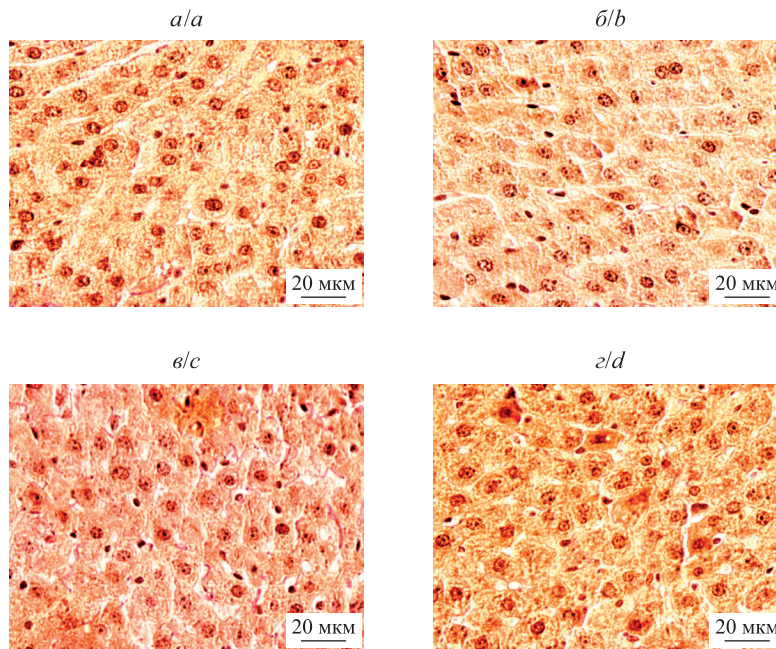
Table 2

Morphometric parameters of the liver ($n = 12, M \pm m$)

Показатели	Крысы			
	3-месячные		15-месячные	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Средний диаметр гепатоцита, мкм	17,6 ± 0,1	17,0 ± 0,2	17,4 ± 0,3	17,2 ± 0,3
Площадь, мкм ² : гепатоцита ядра цитоплазмы	302,4 ± 5,0 40,7 ± 0,9 261,7 ± 5,0	278,6 ± 9,1 40,3 ± 1,3 238,3 ± 6,2	285,3 ± 8,3 37,1 ± 0,9 248,2 ± 7,7	278,4 ± 12,8 38,1 ± 1,5 240,3 ± 11,6
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0,15 ± 0,004	0,17 ± 0,005*	0,15 ± 0,004	0,16 ± 0,004
Количество гепатоцитов на 10 000 мкм ² : общее однойдерных двухдерных Соотношение двухдерных и однойдерных гепатоцитов	25,6 ± 0,6 24,9 ± 0,7 0,7 ± 0,01 0,028 ± 0,005	25,6 ± 0,6 24,3 ± 0,8 1,3 ± 0,05* 0,053 ± 0,005*	27,8 ± 0,7 26,8 ± 0,8 1,0 ± 0,06** 0,037 ± 0,005**	26,3 ± 0,9 25,0 ± 0,8 1,3 ± 0,05* 0,052 ± 0,006*
Плотность размещения гепатоцитов, (1000 мкм ²) ⁻¹	2,56 ± 0,11	2,56 ± 0,09	2,78 ± 0,12	2,63 ± 0,07
Количество ядрышек в ядре гепатоцита Ядрышко-ядерное соотношение	1,81 ± 0,05 0,044 ± 0,001	2,13 ± 0,04* 0,053 ± 0,002*	1,65 ± 0,08 0,044 ± 0,003	1,89 ± 0,05* 0,05 ± 0,002*
Расстояние между ядрами смежных гепатоцитов, мкм	9,5 ± 0,3	8,2 ± 0,2*	8,7 ± 0,3	8,3 ± 0,2
Относительная площадь паренхимы, %	89,5 ± 1,2	88,3 ± 1,9	85,4 ± 1,5	84,9 ± 1,4
Относительная площадь сети синусоидов, %	10,5 ± 0,8	11,7 ± 0,9	14,6 ± 0,7**	15,1 ± 1,0
Коэффициент Vizotto	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02**	0,18 ± 0,01
Количество клеток соединительной ткани на 10 000 мкм ²	8,65 ± 0,4	9,78 ± 0,6*	10,2 ± 0,8**	9,91 ± 0,6
Плотность размещения клеток соединительной ткани (1000 мкм ²) ⁻¹	0,87 ± 0,01	0,98 ± 0,01*	1,02 ± 0,02**	0,99 ± 0,01
Соотношение количества клеток соединительной ткани и гепатоцитов	0,34 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,38 ± 0,02

* $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем 3-месячных крыс.

Состояние ядрышкового аппарата служит информационным показателем функциональной активности гепатоцитов. Выявлено, что как у 3-месячных, так и у 15-месячных животных, подвергавшихся воздействию хлорида магния, количество ядрышек в ядрах гепатоцитов было достоверно больше (на 18 и 15 % соответственно) по сравнению с контролем. Это обусловило достоверное увеличение ядрышко-ядерного соотношения на 20 % (3-месячные крысы) и 14 % (15-месячные) (см. табл. 2). Одной из причин подобного изменения может быть активация физиологической регенерации гепатоцитов на внутриклеточном уровне, что проявляется в гиперплазии ядрышек [17]. Не исключена и активация латентных ядрышкообразующих районов хромосом, т. е. их переход к более активному функциональному состоянию. К основным функциям ядрышек относят синтез рРНК, из которой образуются субъединицы рибосом. Из этого следует, что увеличение количества ядрышек после введения хлорида магния указывает на повышение белоксинтетической активности гепатоцитов [18].



Микрофотография печени контрольных (а, в)
и подопытных (б, г) 3-месячных (а, б) и 15-месячных (в, г) крыс.
Окраска по методу Ван Гизона

A micrograph of the liver of the control (a, c)
and experimental (b, d) 3 month old (a, b) and 15 month old (c, d) rats. Van Gieson stain

В печени подопытных животных независимо от возраста общее количество гепатоцитов и количество одноядерных гепатоцитов не изменялось, тогда как число двуядерных гепатоцитов достоверно возросло на 86 % у 3-месячных крыс и на 30 % у 15-месячных по сравнению с контролем. Это повлекло увеличение соотношения между двуядерными и одноядерными гепатоцитами на 89 % (3-месячные крысы) и 41 % (15-месячные) (см. табл. 2).

Биологический смысл двуядерных гепатоцитов долгое время оставался неизвестным. У взрослых животных и человека они встречаются постоянно, но их процент по отношению к общему количеству клеток может варьироваться. В литературе имеются сведения об увеличении числа двуядерных гепатоцитов в результате старения клетки, незаконченного митоза или амитоза. Некоторые исследователи считают, что образование двуядерных гепатоцитов из одноядерных при регенерации есть резерв полиплоидизации. Общим принципом регенерации является восстановление всего суммарного тканевого генома. Это достигается либо делением клеток, либо увеличением геномов в клетке, которая не разделилась, т. е. полиплоидизацией. Таким образом, по мнению ряда авторов, полиплоидизация с биологической точки зрения служит эквивалентом клеточного размножения [19–21]. Большинство авторов считают, что рост количества двуядерных гепатоцитов свидетельствует об усилении интенсивности регенерации паренхимы печени на внутриклеточном уровне [17].

После введения хлорида магния в печени молодых крыс выявили достоверное уменьшение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов на 14 %, что, скорее всего, связано со снижением размеров клеток (см. табл. 2).

В ткани печени крыс в норме имеется незначительное количество соединительной ткани по сравнению с другими органами. Строма выполняет опорную роль для клеток паренхимы и выстилает стенки кровеносных, лимфатических сосудов и желчных канальцев. Важной особенностью соединительной ткани является ее способность к размножению и замещению дефектов, «пустот», которые образуются в паренхиме при массовой гибели гепатоцитов. В состав стромы печени входят соединительнотканые клетки: фибробласты, продуцирующие коллаген, клетки Купфера, Ито, тучные клетки и Рит-клетки, которые размещаются преимущественно в синусоидах. Строма содержит также более тонкие разветвленные коллагеновые волокна, образующие опорную сетевидную структуру между гепатоцитами [22]. При окраске препаратов печени 2 % кислым пикрофуксином в сочетании с железным гематоксилином Вейгерта (модифицированный метод окраски по Ван Гизону) не было выявлено существенных различий в интенсивности окраски элементов (коллагеновых и эластиновых волокон) соединительной ткани между контрольными и подопытными группами животных. В основном соединительнотканые волокна в печени локализуются возле центральной вены и портальных триад.

После введения хлорида магния в печени 3-месячных крыс выявлена тенденция к росту относительной площади сетки синусоидов на 11 % по сравнению с контролем. Синусоиды образуют сеть соединенных между собой сосудов. В состав стенок синусоидов входят клетки ретикулоэндотелиальной системы – эндотелиальные и звездчатые ретикулоэндотелиоциты (клетки Купфера). Ретикулоэндотелиальные клетки (относятся к строме печени) захватывают и переваривают бактерии и другие чужеродные частицы, поступающие с током крови, и участвуют в ряде других защитных (иммунных) реакций организма. Коэффициент Vizotto у подопытных молодых крыс имел тенденцию к росту на 8 %. Увеличение относительной площади сетки синусоидов и коэффициента Vizotto может свидетельствовать о лучшей кровенаполненности паренхимы печени, активации трофической функции соединительной ткани в ней. Общее количество и плотность расположения соединительнотканых клеток достоверно возросло на 13 % по сравнению с контрольными показателями. Это может указывать на активацию в печени защитной функции соединительной ткани. Морфометрические показатели состояния последней у подопытных крыс 15-месячного возраста оставались близкими к контрольным значениям (см. табл. 2).

Следует отметить, что магний оказывает существенное влияние на морфофункциональное состояние и регенерацию гепатоцитов, а также на процессы биотрансформации, протекающие в них. В литературе имеются данные о воздействии магния на регуляцию внутриклеточных процессов и ключевые метаболические системы эндоплазматического ретикула гепатоцитов [23].

Многие ученые исследовали влияние недостатка магния на состояние печени. Так, показано, что дефицит магния вызывает в ней окислительный стресс и воспалительные реакции [8], различные метаболические нарушения (включая метаболизм глюкозы) [9]. Примерно 85 % случаев вирусных гепатитов протекают на фоне дефицита магния. Выявлено, что хронические гепатиты В и С сопровождаются магниевой тканевой недостаточностью [24]. Установлено, что у магнидефицитных перепелов снижается количество митохондрий в гепатоцитах при увеличении их средней площади. Эти морфологические изменения свидетельствуют о нарушениях в энергетическом обмене этих органелл [25]. В другом исследовании показано, что пероральные добавки хлорида магния снижают уровни АЛТ в плазме крови у женщин с ожирением, страдающих гипомagneмией [26]. Выявлено, что 28-суточное пероральное введение крысам (с моделируемой формой холестаза) сульфата магния в различных концентрациях (0,01; 0,05; 0,1 и 0,25 г/кг) уменьшает повреждения печени путем снижения некроза гепатоцитов, окислительного стресса и воспалительных процессов в ней, а также уменьшает пролиферацию звездчатых клеток и образование фиброза [27]. Доказано, что такое соединение, как магний изоглицирризинат, обладает противовоспалительными, гепатопротекторными, детоксикационными и антиоксидантными свойствами. Кроме того, магний в таком сочетании улучшает функцию печени, защищает мембрану гепатоцитов от различных ядовитых химических веществ, поддерживает их нормальную морфологию и снижает гибель [28; 29].

Заключение

Гистоморфологическая структура печени у животных разных возрастных групп, получавших хлорид магния, изменялась одинаково. Однако морфофункциональные изменения в паренхиме печени 3-месячных подопытных крыс проявлялись в большей степени, чем у взрослых животных. На основании результатов наших исследований можно предположить, что 21-суточное введение хлорида магния (в дозе 50 мг/кг) активирует процессы физиологической регенерации и функциональной активности паренхимы печени. Об этом свидетельствует увеличение количества двуядерных клеток и ядрышек в ядрах гепатоцитов, возрастание ядерно-цитоплазматического и ядрышко-ядерного соотношения, а также повышение трофической и защитной активности соединительной ткани в печени молодых крыс.

Библиографические ссылки

1. Pickett-Blakely O, Young K, Carr RM. Micronutrients in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2018;6(4):451–462. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.07.004.
2. Хабаров АА, Новиков ДА. Магний. Биологическая роль и применение в медицине. Курск: КГМУ; 2005.
3. Romani AM. Magnesium in health and disease. *Metal Ions in Life Sciences*. 2013;13:49–79. DOI: 10.1007/978-94-007-7500-8_3.
4. Jahnhen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clinical Kidney Journal*. 2012;5(supplement 1):i3–i14. DOI: 10.1093/ndt-plus/sfr163.
5. Янко РВ, Чака ЕГ, Левашов МИ. Возрастные различия морфофункционального состояния поджелудочной железы крыс после введения хлорида магния. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2019;105(4):501–509. DOI: 10.1134/S0869813919040125.
6. Yanko RV. Investigation of the influence of magnesium ions on the morphofunctional state of the thyroid gland of adult rats. *Endokrynologia*. 2018;23(3):230–234.

7. Калинин АЛ. Морфологические и патофизиологические особенности печени у пожилых пациентов. *Проблемы здоровья и экологии*. 2016;47(1):13–17.
8. Matsui T. Magnesium and liver. *Clinical Calcium*. 2012;22(8):1181–1187. DOI: CliCa120811811187.
9. Mei S, Ryosuke N, Shozo T, Masayuki F. Fluctuations in metabolite content in the liver of magnesium-deficient rats. *British Journal of Nutrition*. 2016;116(10):1694–1699. DOI: 10.1017/S0007114516003676.
10. Данилов РК, редактор. *Руководство по гистологии. Том 2*. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2011. 511 с.
11. Rudzki Z, Szczudrawa J, Stachura J. Morphometry of normal, regenerating and cancerous hepatocytes. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 1989;27(3):141–148.
12. Громова ОА, Калачева АГ, Торшин ИЮ, Грустливая УЕ, Прозорова НВ, Егорова ЕЮ и др. О диагностике дефицита магния. Часть 1. *Архивъ внутренней медицины*. 2014;2:5–10. DOI: 10.20514/2226-6704-2014-0-2-5-10.
13. Kunkel H, Pearson P, Schweiqert B. The photoelectric determination of magnesium in body fluids. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1947;32(8):1027–1033.
14. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients*. 2015;7(9):8199–8226. DOI: 10.3390/nu7095388.
15. Barbagallo M, Belvedere M, Dominguez LJ. Magnesium homeostasis and aging. *Magnesium Research*. 2009;22(4):235–246. DOI: 10.1684/mrh.2009.0187.
16. Rosioru C, Talu S, Talu M, Giovanzana S, Craciun C. Morphometric assessments for the healthy rat hepatocytes. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2012;17(1):74–79.
17. Саркисов ДС, Втюрин БВ. *Электронная микроскопия деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессов*. Москва: Медицина; 1967. 224 с.
18. Boisvert F, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(7):574–585. DOI: 10.1038/nrm2184.
19. Романова ЛП, Малышев ИИ. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс. *Вестник Чувашского университета*. 2011;3:398–402.
20. Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Hanlon Newell AE, Lenzi ML, Olson SB, et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature*. 2010;467(7316):707–710. DOI: 10.1038/nature09414.
21. Бродский ВЯ, Урываева ИВ. *Клеточная полиплоидия. Пролiferация и дифференцировка*. Москва: Наука; 1981. 259 с.
22. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Human physiology: The mechanisms of body function. 9th edition*. New York: The McGraw-Hill Companies; 2003. 864 p.
23. Боев ВМ. Среда обитания и экологически обусловленный дисбаланс микроэлементов у населения урбанизированных и сельских территорий. *Гигиена и санитария*. 2002;5:3–8.
24. Плотникова ЕЮ, Карягина МС, Шамрай МА, Зинчук СФ, Баранова ЕН, Максимов СА. Магниево-цинковый статус у пациентов с хроническими гепатитами В и С. РМЖ. *Медицинское обозрение*. 2017;2:60–64.
25. Didier R, Gueux E, Rayssiguier Y. Magnesium deficiency in the Japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1984;79(2):223–227. DOI: 10.1016/0300-9629(84)90420-1.
26. Rodriguez-Hernandez H, Cervantes-Huerta M, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Oral magnesium supplementation decreases alanine aminotransferase levels in obese women. *Magnesium research*. 2010;23(2):90–96. DOI: 10.1684/mrh.2010.0204.
27. Eshraghi T, Eidi A, Mortazavi P. The protective effects of magnesium on liver tissue alteration induced by bile duct ligation in rat. *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences*. 2015;2(1):50–53. DOI: 10.15242/IJACEBS.A0915005.
28. Zheng J, Wu G, Hu GX, Peng YZ, Xiong XJ. Protective effects against and potential mechanisms underlying the effect of magnesium isoglycyrrhizinate in hypoxia-reoxygenation injury in rat liver cells. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(4):15453–15461. DOI: 10.4238/2015.November.30.23.
29. Xu Q, Ji W, Chen F, Lin K, Zhu M, Chen L, et al. Protective role of magnesium isoglycyrrhizinate in non-alcoholic fatty liver disease and the associated molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016;38(1):275–282. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2603.

References

1. Pickett-Blakely O, Young K, Carr RM. Micronutrients in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2018;6(4):451–462. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.07.004.
2. Habarov AA, Novikov DA. *Magnii. Biologicheskaya rol' i primeneniye v meditsine* [Magnesium. Biological role and application in medicine]. Kursk: Kursk State Medical University; 2005. Russian.
3. Romani AM. Magnesium in health and disease. *Metal Ions in Life Sciences*. 2013;13:49–79. DOI: 10.1007/978-94-007-7500-8_3.
4. Jahnhen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clinical Kidney Journal*. 2012;5(supplement 1):i3–i14. DOI: 10.1093/ndtplus/sfr163.
5. Yanko RV, Chaka EG, Levashov MI. Age-related differences in the morphofunctional state of the rat pancreas after magnesium chloride administration. *Russian Journal of Physiology*. 2019;105(4):501–509. DOI: 10.1134/S0869813919040125. Russian.
6. Yanko RV. Investigation of the influence of magnesium ions on the morphofunctional state of the thyroid gland of adult rats. *Endokrynologia*. 2018;23(3):230–234.
7. Kalinin AL. The morphological and pathophysiological features of the liver in elderly patients. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2016;47(1):13–17. Russian.
8. Matsui T. Magnesium and liver. *Clinical Calcium*. 2012;22(8):1181–1187. DOI: CliCa120811811187.
9. Mei S, Ryosuke N, Shozo T, Masayuki F. Fluctuations in metabolite content in the liver of magnesium-deficient rats. *British Journal of Nutrition*. 2016;116(10):1694–1699. DOI: 10.1017/S0007114516003676.
10. Danilov RK, editor. *Rukovodstvo po gistologii. Tom 2* [Guide to histology. Volume 2]. Saint Petersburg: SpetsLit; 2011. 511 p. Russian.
11. Rudzki Z, Szczudrawa J, Stachura J. Morphometry of normal, regenerating and cancerous hepatocytes. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 1989;27(3):141–148.

12. Gromova OA, Kalacheva AG, Torshin IYu, Grustlivaya UE, Prozorova NV, Egorova EYu, et al. [About the diagnosis of magnesium deficiency. Part 1]. *The Russian Archives of Internal Medicine*. 2014;2:5–10. DOI: 10.20514/2226-6704-2014-0-2-5-10. Russian.
13. Kunkel H, Pearson P, Schweigert B. The photoelectric determination of magnesium in body fluids. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1947;32(8):1027–1033.
14. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients*. 2015;7(9):8199–8226. DOI: 10.3390/nu7095388.
15. Barbagallo M, Belvedere M, Dominguez LJ. Magnesium homeostasis and aging. *Magnesium Research*. 2009;22(4):235–246. DOI: 10.1684/mrh.2009.0187.
16. Rosioru C, Talu S, Talu M, Giovanzana S, Craciun C. Morphometric assessments for the healthy rat hepatocytes. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2012;17(1):74–79.
17. Sarkisov DS, Vtyurin BV. *Elektronnaya mikroskopiya destruktivnykh i regenerativnykh vnutrikletochnykh protsessov* [Electron microscopy of destructive and regenerative intracellular processes]. Moscow: Meditsina; 1967. 224 p. Russian.
18. Boisvert F, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(7):574–585. DOI: 10.1038/nrm2184.
19. Romanova LP, Malyshev II. The role of binuclear hepatocytes in liver regeneration after mechanical trauma in early ontogenesis in rats. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*. 2011; 3:398–402. Russian.
20. Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Hanlon Newell AE, Lenzi ML, Olson SB, et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature*. 2010;467(7316):707–710. DOI: 10.1038/nature09414.
21. Brodskii VYa, Uryvaeva IV. *Kletochnaya poliploidiya. Proliferatsiya i differentsirovka* [Cell polyploidy. Proliferation and differentiation]. Moscow: Nauka; 1981. 259 p. Russian.
22. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Human physiology: The mechanisms of body function*. 9th edition. New York: The McGraw-Hill Companies; 2003. 864 p.
23. Boyev VM. [Habitat and ecologically caused imbalance of microelements in the population of urbanized and rural areas]. *Hygiene and Sanitation*. 2002;5:3–8. Russian.
24. Plotnikova EYu, Karyagina MS, Shamray MA, Zinchuk SF, Baranova EN, Maximov SA. The magnesium-zinc status at patients with chronic hepatitis B and C. *RMJ. Medical Review*. 2017;2:60–64. Russian.
25. Didier R, Gueux E, Rayssiguier Y. Magnesium deficiency in the Japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1984;79(2):223–227. DOI: 10.1016/0300-9629(84)90420-1.
26. Rodriguez-Hernandez H, Cervantes-Huerta M, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Oral magnesium supplementation decreases alanine aminotransferase levels in obese women. *Magnesium research*. 2010;23(2):90–96. DOI: 10.1684/mrh.2010.0204.
27. Eshraghi T, Eidi A, Mortazavi P. The protective effects of magnesium on liver tissue alteration induced by bile duct ligation in rat. *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences*. 2015;2(1):50–53. DOI: 10.15242/IJACEBS.A0915005.
28. Zheng J, Wu G, Hu GX, Peng YZ, Xiong XJ. Protective effects against and potential mechanisms underlying the effect of magnesium isoglycyrrhizinate in hypoxia-reoxygenation injury in rat liver cells. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(4):15453–15461. DOI: 10.4238/2015.November.30.23.
29. Xu Q, Ji W, Chen F, Lin K, Zhu M, Chen L, et al. Protective role of magnesium isoglycyrrhizinate in non-alcoholic fatty liver disease and the associated molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016;38(1):275–282. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2603.

Статья поступила в редакцию 02.10.2019.
Received by editorial board 02.10.2019.

РЕАКЦИИ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ КАРДИОРЕГУЛЯТОРНЫХ НЕЙРОНОВ ЦНС МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И ПРИ ДЕЙСТВИИ ИНСУЛИНА

А. В. СИДОРОВ¹⁾, В. Н. ШАДЕНКО²⁾, В. Б. КАЗАКЕВИЧ¹⁾

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

²⁾Республиканский научно-практический центр психического здоровья,
Долгиновский тракт, 152, 220053, г. Минск, Беларусь

Возрастание содержания глюкозы в гемолимфе (с 0,09 (0,08; 0,10) до 0,54 (0,44; 0,69) ммоль/л), а также внутриполостная инъекция инсулина (0,05 МЕ/г) приводят к 10–20-процентному увеличению частоты сердечных сокращений по сравнению с контрольной группой. В отношении идентифицированных пептидургических нейронов V.D.1 и R.Pa.D.2 установлено разнонаправленное влияние глюкозы (10 ммоль/л) и инсулина (0,2 МЕ) – возрастание (в 1,6 раза) и снижение (в 2,3 раза) частоты их импульсации соответственно. Действие указанных веществ инициирует появление синаптических входов на мембране нейрона R.Pa.D.1, свидетельствующих об активации кардиорегуляторного ритма в центральных нервных ганглиях *Lymnaea*. Предполагается, что колебания уровня глюкозы вовлечены в процессы нейрогенной кардиорегуляции у моллюсков.

Ключевые слова: электрическая активность; сердце; глюкоза; инсулин.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б07К-041) и в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2020» (задание 3.10.2).

Образец цитирования:

Сидоров АВ, Шаденко ВН, Казакевич ВБ. Реакции идентифицированных кардиорегуляторных нейронов ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях гипергликемии и при действии инсулина. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:49–58.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-49-58>

For citation:

Sidorov AV, Shadenko VN, Kazakevich VB. Responses of identified cardioregulatory neurons within CNS of mollusc *Lymnaea stagnalis* at hyperglycemia and insulin action. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:49–58. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-49-58>

Авторы:

Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Виктория Николаевна Шаденко – научный сотрудник лаборатории клинко-эпидемиологических исследований.
Виктор Бернардович Казакевич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
sidorov@bsu.by
Victoria N. Shadenko, researcher at the laboratory of clinical and epidemiological research.
vika-st-18@list.ru
Victor B. Kazakevich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
kazakevichvb@bsu.by

RESPONCES OF IDENTIFIED CARDIOREGULATORY NEURONS WITHIN CNS OF MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* AT HYPERGLYCEMIA AND INSULIN ACTION

A. V. SIDOROV^a, V. N. SHADENKO^b, V. B. KAZAKEVICH^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bRepublican Research and Practice Center for Mental Health,
152 Daŭhinaŭski Tract, Minsk 220053, Belarus

Corresponding author: A. V. Sidorov (sidorov@bsu.by)

Increase in haemolymph glucose level (from 0,09 (0,08; 0,10) to 0,54 (0,44; 0,69) mmol/L) and intracavitary injection of insulin (0,05 IU/g) results in 10–20 % growth of heart rate in comparison with control group. Multidirectional effects of glucose (10 mmol/L) and insulin (0,2 IU) – 1,6-time increase and 2,3-time decrease of firing rate respectively, were observed in identified peptide-containing neurons V.D.1 and R.Pa.D.2. Both these substances initiate the appearance of synaptic inputs on the membrane of the R.Pa.D.1 neuron, being the evidence of the central cardioregulatory rhythm activation within CNS of *Lymnaea*. It is assumed that shifts of glucose level are involved in neuronal cardioregulation in molluscs.

Keywords: electrical activity; heart; glucose; insulin.

Acknowledgements. This research has been financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project No. B07K-41) and also by State Program for Scientific Research «Convergence-2020» (task 3.10.2).

Введение

Пептидергический контроль играет важную роль в регуляции работы висцеральных систем у позвоночных и беспозвоночных [1]. Известно о существовании более 100 физиологически активных пептидов, число которых продолжает увеличиваться, а многие, будучи изначально идентифицированными на периферии, обладают выраженным нейротропным действием, т. е. относятся к нейропептидам. Одним из них является инсулин, действие которого опосредуется активацией специфических рецепторов тирозинкиназного типа, что предполагает широкую диверсификацию такого сигнала на внутриклеточном уровне, а следовательно, и самые различные проявления его (инсулина) эффектов [2]. Поскольку выброс инсулина происходит при изменении глюкозного гомеостаза, возрастание уровня глюкозы во внутренней среде можно рассматривать в качестве пускового сигнала модификации комплекса физиологических функций, в том числе и на нейронном уровне.

В центральных нервных ганглиях (т. е. в ЦНС) пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* ряд крупных пептидсодержащих клеток (нейроны R.Pa.D.1 и клетки пары V.D.1 и R.Pa.D.2) вовлечены в регуляцию сердечной деятельности [3]. Ее активность, определяющая формирование гидроскелета и, следовательно, работы всей мышечной системы, является одной из причин установления нового физиологического статуса организма (включая степень выраженности оборонительного, локомоторного и дыхательного поведения), в том числе и в зависимости от степени активации пищедобычи [4], т. е. при модификации уровня глюкозы в гемолимфе [5].

Тем не менее механизмы нейрогенной регуляции и модуляции работы сердца, опосредующие реализацию сердечных рефлексов, остаются относительно неполно исследованными, особенно в сравнительно-физиологическом аспекте. В этой связи цель данной работы – изучить быстрые нейротропные эффекты инсулина и высоких концентраций глюкозы на электрические характеристики ряда нейронов кардиореспираторной сети *Lymnaea stagnalis*.

Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) лабораторного разведения, обладающих слабопигментированной раковинной. Их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре 20 ± 1 °C. Смену воды проводили каждую неделю. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*). Опыты проводились на животных одинакового размерного класса с высотой раковины от 2,5 до 3 см и массой $1,0 \pm 0,2$ г.

Электрофизиологические исследования. Эксперименты были выполнены на препаратах изолированной ЦНС. Нейроны R.Pa.D.1 и клетки пары V.D.1 и R.Pa.D.2 идентифицировали по расположению

в пределах ЦНС, размеру и окраске сомы. Для размягчения периневральной оболочки и облегчения проникновения микроэлектродов в нейроны препараты предварительно обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV, *Sigma*, США) в концентрации 1 мг/мл, приготовленным на нормальном физиологическом растворе для *Lymnaea stagnalis* в течение 5 мин при температуре 20 °С. Электрическую активность нейронов регистрировали после промывки обработанного препарата свежим физиологическим раствором в течение 30 мин. Препараты ЦНС помещали в нормальный физиологический раствор состава (концентрация указана в миллимолях): NaCl – 44,0; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4,0; MgCl₂ · 6H₂O – 1,5; HEPES – 10,0; pH 7,5 ± 0,03. Внутриклеточную регистрацию электрических параметров нейронов осуществляли с помощью Ag/AgCl-электродов и микроэлектродного усилителя MC-01M (ООО «Линтех», Беларусь). Микропипетки заполняли 2,5-молярным раствором KCl (сопротивление микроэлектрода составляло 10–20 МОм). В качестве индифферентного электрода использовали хлорированную серебряную проволоку. Частотные характеристики спонтанной импульсной активности определяли для последовательных 30-секундных участков нейронограммы общей длительностью 6 мин, записанные с шагом квантования 5 мс и обработанные при помощи специальной программы электронного осциллографа *InputWin* [6] или записанные на ленте чернильного самописца.

Исследование сердечной деятельности, использованные вещества и их аппликация. Моллюсков помещали в освещенную чашку Петри, что позволяло рассмотреть механическую работу внутренних органов через слабопигментированную раковину, и при помощи бинокулярной лупы (×10) визуально наблюдали за работой сердца, подсчитывая число сокращений.

Для создания гипергликемии моллюсков опытной группы помещали в высококонцентрированный (100 ммоль/л) раствор глюкозы на 2 ч, а животные контрольной группы в это время находились в равновеликих по объему аквариумах с «чистой» (отстоявшейся водопроводной) водой [7]. Оценка частоты сердечных сокращений (ЧСС) проводили сразу после окончания инкубации, а затем умеренной тактильной стимуляцией подошвы ноги моллюска вызывали реакцию полного втягивания тела в раковину, инициируя выброс части гемолимфы для последующего определения концентрации глюкозы глюкозо-оксидазным методом (набор реагентов «Анализ Х», Беларусь). Оптическую плотность измеряли при длине волны 520 нм (длина оптического пути 1 см) и температуре 20 °С посредством спектрофотометра Cary 50 (*Variant Inc.*, Австралия). Объем материала для анализа составил 100 мкл, инкубация с реагентом (1 мл) длилась 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежеприготовленного 1 ммоль/л раствора глюкозы.

Инъекцию инсулина (свиной, высокоочищенный; РУП «Белмедпрепараты», Беларусь) в дозе 0,05 МЕ/г массы тела (расчетная конечная концентрация $7,028 \cdot 10^{-7}$ моль/л) проводили в полость цефалопедалного синуса моллюсков при помощи инсулинового шприца в объеме 50 мкл. Контрольная группа получала инъекцию равновеликого по объему нормального физиологического раствора. Оценка ЧСС проводили через 10 мин после указанной процедуры. Аппликацию инсулина осуществляли на поверхность ЦНС в конечных концентрациях 0,02 МЕ (расчетная концентрация $7,028 \cdot 10^{-7}$ моль/л) и 0,2 МЕ (расчетная концентрация $7,028 \cdot 10^{-6}$ моль/л), аппликацию глюкозы – в концентрациях 1 и 10 ммоль/л после предварительной контрольной 2-минутной регистрации электрической активности. Оценка изменений частоты импульсации нейронов проводили в течение первых 30 с, на 2-й и 4-й минутах после нанесения веществ.

Статистическая обработка. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [8]. Нормальность распределения для каждого ряда данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро – Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей (оценка ЧСС) использовали параметрические методы оценки (*t*-критерий Стьюдента для независимых пар). Если нормальность распределения показателей не была подтверждена для всех без исключения групп данных (импульсация нервных клеток, уровень глюкозы в гемолимфе), использовали непараметрические методы: ранговый дисперсионный анализ (*Friedman*_{ANOVA}), множественное (критерий Уилкоксона, *z*) и попарное (*U*-критерий Манна – Уитни, *z*) сравнение для зависимых и независимых выборок соответственно. В случае нормального распределения данные представлялись в виде «среднее ± ошибка среднего», а при его непараметрическом характере – как медиана (25-й процентиль; 75-й процентиль). Число наблюдений *n* указано для каждого массива данных отдельно. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Инкубация животных в высококонцентрированном растворе глюкозы вызывает умеренное (в 1,1 раза), но статистически значимое возрастание ЧСС у моллюсков опытной группы по сравнению

с контрольной (рис. 1, а), что ассоциируется с многократным (в 6 раз) увеличением концентрации глюкозы в их гемолимфе – с 0,09 (0,08; 0,10) до 0,54 (0,44; 0,69) ммоль/л соответственно ($z = 3,75$; $p = 0,0002$, критерий Манна – Уитни). Инъекция инсулина приводит к схожим по направленности изменениям ЧСС – к 1,2-кратному статистически достоверному ее возрастанию по сравнению с контролем (рис. 1, б).

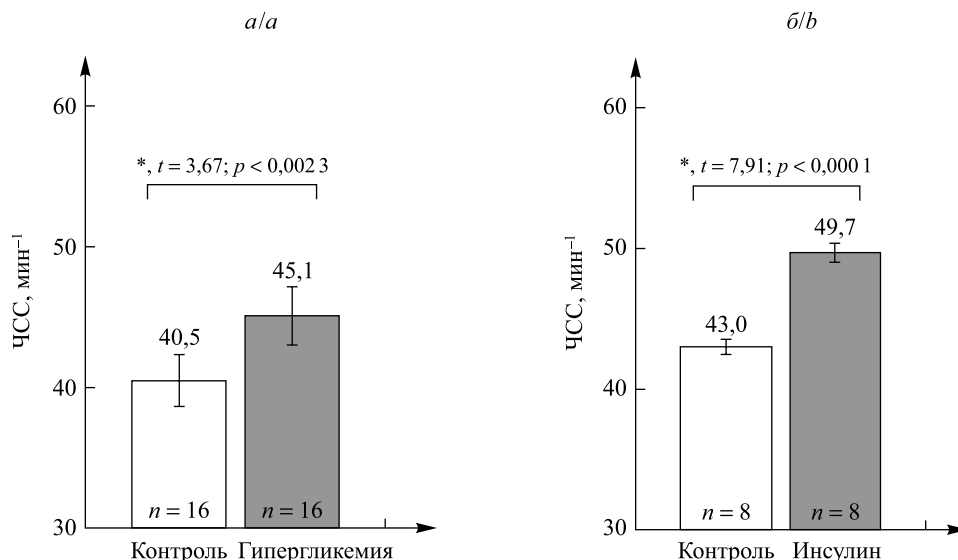


Рис. 1. Частота сердечных сокращений *Lymnaea stagnalis* в условиях экспериментальной гипергликемии (а) и после введения инсулина (б). Представлены среднее значение показателя (числа над столбиками) и ошибка среднего (планки погрешностей). Квадратная скобка и астериск отмечают статистически достоверные пары сравнения, для которых даны значения t -критерия Стьюдента и соответствующего ему уровня значимости p

Fig. 1. Heart rate of *Lymnaea stagnalis* at conditions of experimental hyperglycemia (a) and after insulin injection (b). Experimental meaning – numbers above the columns (mean) and error bars (mean error). Bracket and asterisk – significant for the experimental groups. Student's t -test meaning and corresponding significance level (p) are presented

Нейротропные влияния были отмечены как для глюкозы, так и для растворов инсулина. В ходе первичных экспериментов было установлено, что приложение рассматриваемых веществ в концентрации 1 ммоль/л (глюкоза) и 0,02 МЕ (инсулин) не вызывает видимых быстрых (непосредственно сразу и(или) в течение нескольких последующих после аппликации минут) изменений характеристик электрической активности нейронов пары V.D.1 и R.Pa.D.2 ($n = 4$ для каждой клетки) и клетки R.Pa.D.1 ($n = 4$). Десятикратное увеличение действующих концентраций глюкозы и инсулина влечет незамедлительную реакцию со стороны исследованных клеток.

В отношении пары V.D.1 и R.Pa.D.2 добавление глюкозы приводит к быстрому (уже в течение 30 с после аппликации) 1,6-кратному статистически значимому ($z = 2,02$; $p = 0,0431$) увеличению частоты импульсации, происходящей на фоне прогрессирующей умеренной деполяризации (на 5–10 мВ) мембраны клеток. Наблюдаемые различия имели статистическую достоверность и в последующие периоды наблюдения – на 2-й и 4-й минутах ($z = 2,52$; $p = 0,0117$ для обеих групп данных) – по-прежнему сохраняли повышенные по сравнению с контролем значения (рис. 2, а, и рис. 3).

Аппликация инсулина на поверхность центральных ганглиев вызывала эффекты противоположной направленности в отношении частотных характеристик нейронов V.D.1 и R.Pa.D.2. В частности, согласно данным дисперсионного анализа, речь идет о прогрессивном снижении частоты генерации потенциалов действия, отмечаемом на фоне быстрой деполяризации мембран, которая наблюдалась уже в течение первых 30 с после добавления препарата (на $5,2 \pm 1,8$ мВ) и достигала в последующем $11,0 \pm 3,1$ мВ. Статистически значимые изменения частоты отмечены на 2-й и 4-й минутах наблюдения ($z = 2,38$; $p = 0,0173$ и $z = 1,99$; $p = 0,0464$ соответственно), когда спайковая активность снижалась более чем в 2 раза по сравнению с исходной (контрольной) величиной (рис. 2, б, и рис. 3).

В двух из девяти препаратов было зарегистрировано полное прекращение импульсации V.D.1 и R.Pa.D.2, хотя отмывание препарата ЦНС нормальным физиологическим раствором приводило к частичному восстановлению исходной спайковой активности (рис. 4).

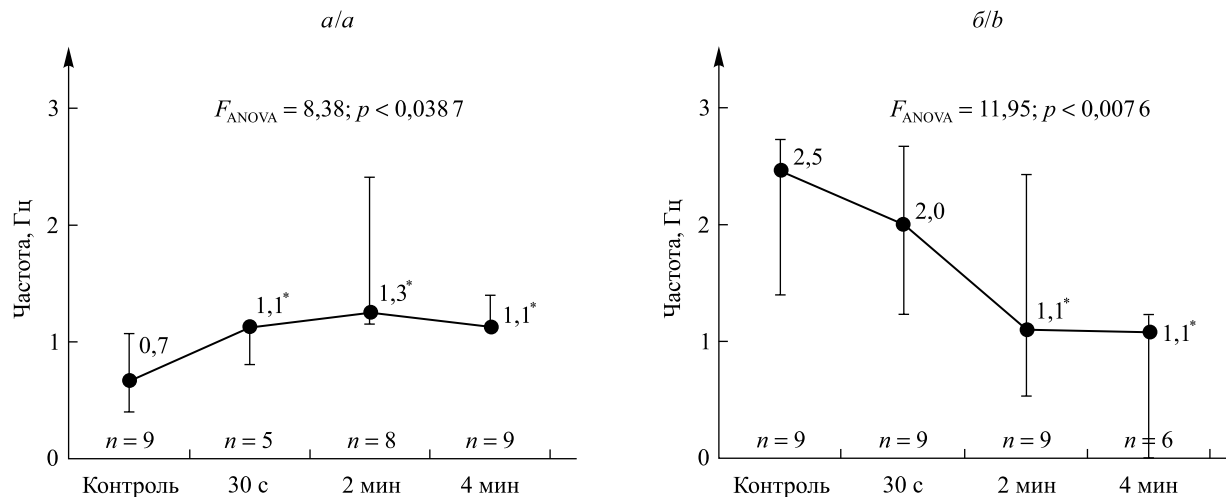


Рис. 2. Частота генерации потенциалов действия парой электрически связанных нейронов V.D.1 и R.Pa.D.2 нервной системы *Lymnaea stagnalis* при действии глюкозы (а) и инсулина (б).

Представлены медиана показателя (числа рядом с точками графика) и интерквартильный размах (планки погрешностей).

Астериск указывает на статистически значимые ($p < 0,05$) массивы данных по сравнению с контролем (парный критерий Уилкоксона).

Приведено число наблюдений (n) для каждого временного периода, значение критерия Фридмана (F_{ANOVA}) и соответствующего ему уровня значимости (p)

Fig. 2. Action potentials frequency in electrically coupled neurons V.D.1 and R.Pa.D.2 within CNS of *Lymnaea stagnalis* in response to glucose (a) or insulin (b) bath application.

Experimental meaning – numbers near dots (median) and error bars (lower and upper quartiles). Asterisk is significant ($p < 0,05$) for the data in comparison with control (Wilcoxon matched pairs test).

Number of observations (n) for each period of time, the Friedman ANOVA by ranks test (F_{ANOVA}) and the corresponding significance level (p) are presented

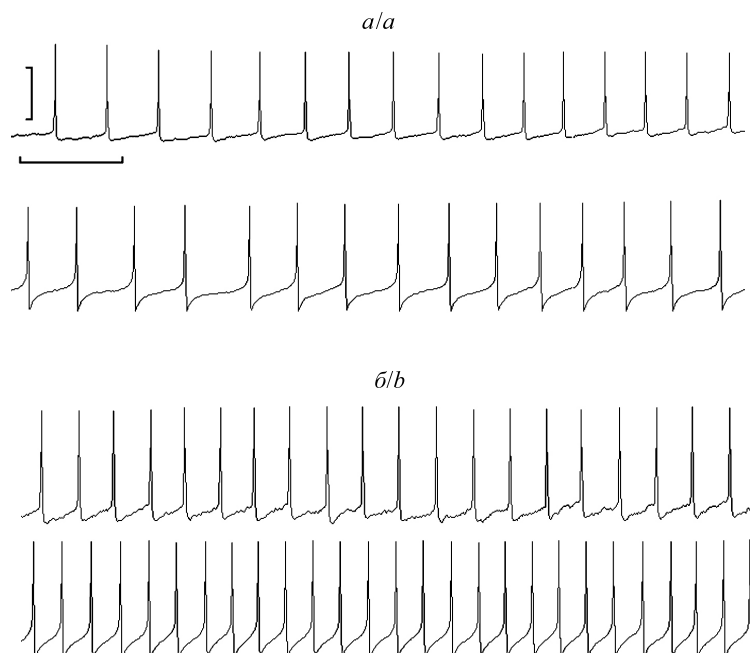


Рис. 3. Электрическая активность нейронов R.Pa.D.1 и R.Pa.D.2 в условиях действия глюкозы: а – контроль; б (продолжение регистрации) – на 4-й минуте после аппликации глюкозы (10 ммоль/л). Одновременная регистрация R.Pa.D.1 (верхняя линия записи) и R.Pa.D.2 (нижняя линия записи).

Калибровка: 2,5 с (по времени), 50 мВ (по амплитуде)

Fig. 3. Electrical activity of R.Pa.D.1 and R.Pa.D.2 after glucose bath application: а – control conditions; б (continuous registration) – on the 4th minute after glucose application.

Simultaneous recording: R.Pa.D.1 – top trace, R.Pa.D.2 – bottom trace.

Calibration: 2.5 s (time), 50 mV (amplitude)

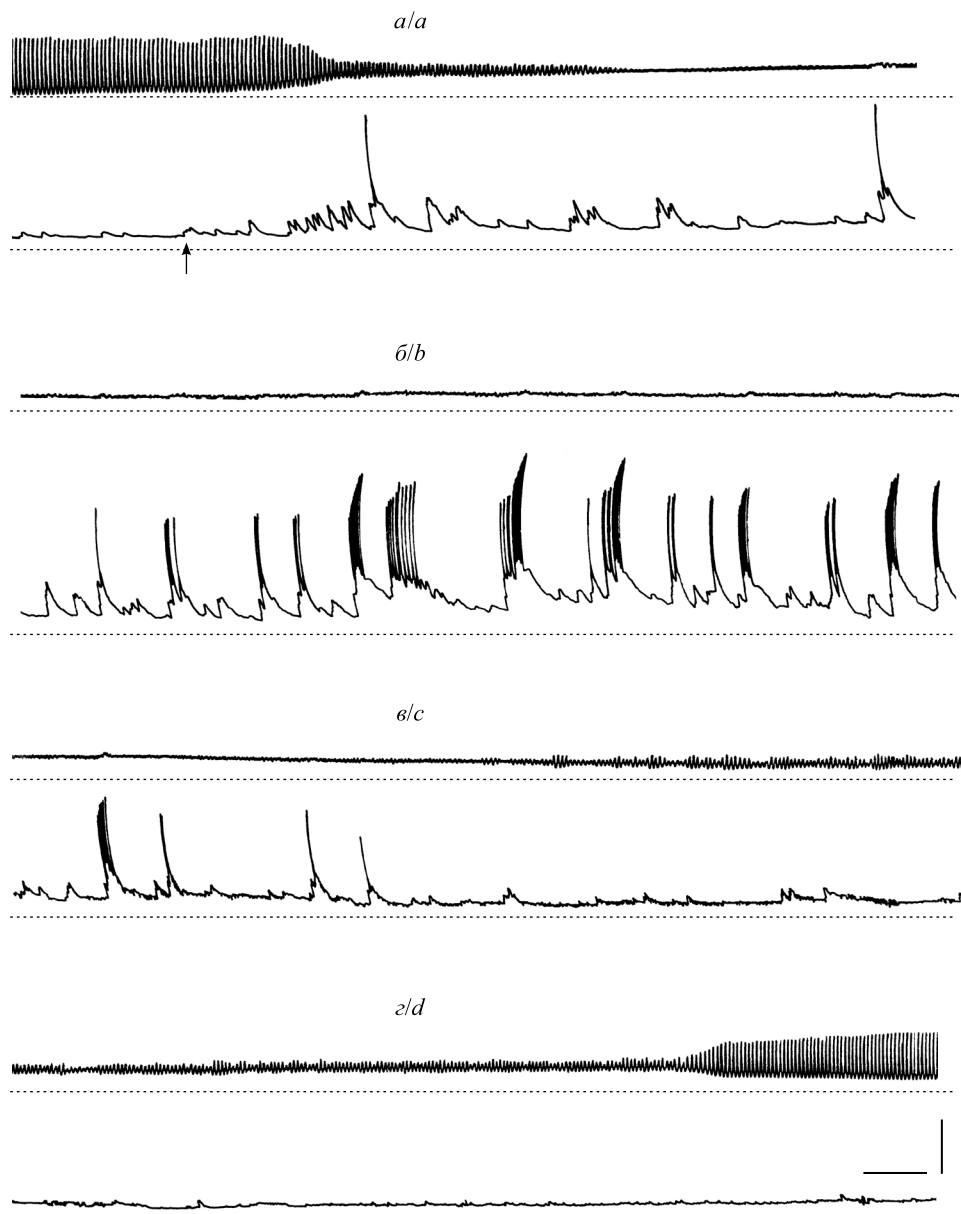


Рис. 4. Влияние инсулина на спонтанную электрическую активность (а–г) нейронов V.D.1 и R.Pa.D.1. Одновременная регистрация V.D.1 (верхняя линия записи) и R.Pa.D.1 (нижняя линия записи). Момент аппликации инсулина отмечен стрелкой. Части в и г – через 5 мин после начала отмывки препарата. Пунктирная линия приведена для наглядности изменения уровня мембранного потенциала. Калибровка: 5,5 с (по времени), 70 мВ (по амплитуде)

Fig. 4. Insulin action on spontaneous electrical activity (a–d) of the V.D.1 and R.Pa.D.1 neurons. Simultaneous recording: V.D.1 – top trace, R.Pa.D.1 – bottom trace. Insulin application is marked by an arrow. Parts c and d – 5 min after washing. Dashed line is presented for visualization of membrane potential level changes. Calibration: 5.5 s (time), 70 mV (amplitude)

В случаях с нейроном R.Pa.D.1 при наличии у данной клетки исходной спонтанной электрической активности (ситуация, характерная для половины исследованных препаратов ЦНС) аппликации глюкозы или инсулина не приводили к статистически значимому, согласно данным дисперсионного анализа, изменению частоты импульсации или мембранного потенциала R.Pa.D.1 (рис. 5). Тем не менее нанесение указанных веществ ассоциируется с появлением регистрируемых на мембране этой клетки внешних синаптических входов (притоков), что сопровождалось генерацией серии импульсов в случае исходно молчащих структур (добавление инсулина, см. рис. 4) на фоне умеренной (около 5 мВ) деполяризации клетки (нейрон переходит на фазовый режим электрической активности).

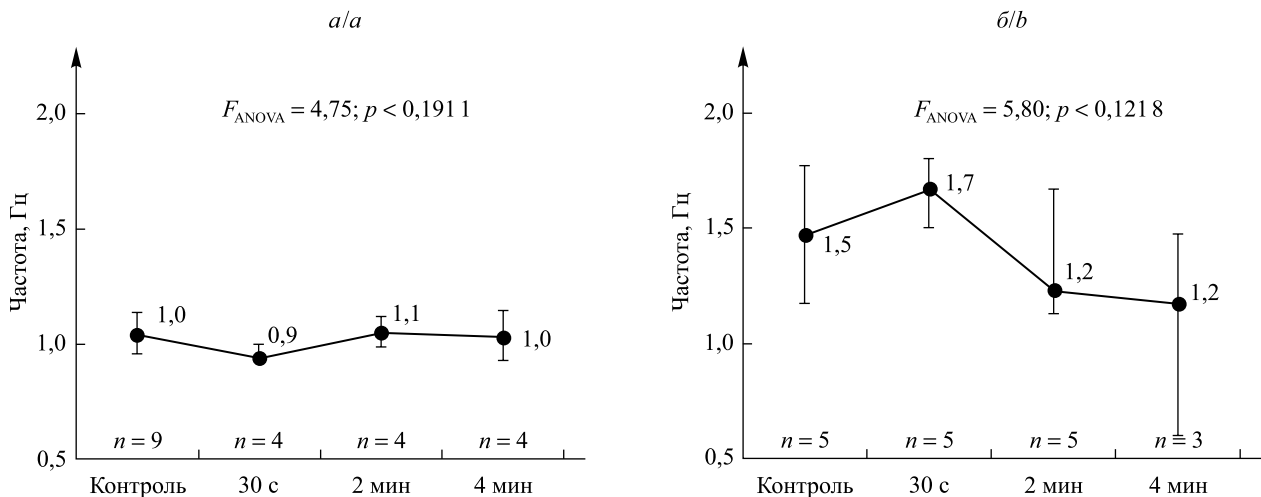


Рис. 5. Частота генерации потенциалов действия нейроном R.Па.D.1 нервной системы *Lymnaea stagnalis* при действии глюкозы (а) и инсулина (б). Представлены медиана показателя (числа рядом с точками графика) и интерквартильный размах (планки погрешностей). Приведены число наблюдений (*n*) для каждого временного периода, значения критерия Фридмана (F_{ANOVA}) и соответствующего ему уровня значимости (*p*)

Fig. 5. Action potentials frequency in neuron R.Pa.D.1 within CNS of *Lymnaea stagnalis* in response to glucose (a) or insulin (b) bath application.

Experimental meaning – numbers near dots (median) and error bars (lower and upper quartiles). Number of observations (*n*) for each period of time, the Friedman ANOVA by ranks test (F_{ANOVA}) and the corresponding significance level (*p*) are presented

При аппликации глюкозы указанный эффект отмечен и для спонтанно активных нейронов. Он сопровождается появлением высокоамплитудных спайков при суммации амплитуд синаптического потенциала и собственного потенциала действия друг с другом (рис. 6).

У легочных моллюсков сердце относится к камерному типу, состоит из предсердия и желудочка, обеспечивает продвижение крови по системе капилляров висцеральной массы и крыши мантийной полости (легкого), а также создание гидроскелета [9]. Несмотря на миогенную природу сердечной автоматии, координация ритмов предсердия и желудочка осуществляется также посредством нервных влияний. Кардиорегуляторные клетки найдены у целого ряда наземных легочных моллюсков: *Helix pomatia*, *Achatina fulica*, *Limax maximus*, *Lymnaea stagnalis* [3].

В нервной системе прудовика известные к настоящему времени «сердечные» нейроны сосредоточены в пределах правого париетального и висцерального ганглиев [9]. Для R.Па.D.1 отмечена синхронизация пачек его потенциалов действия с систолой сердца, а отдельные спайки и(или) постсинаптические потенциалы синхронизованы с отдельными постсинаптическими потенциалами в сердце, однако прямая стимуляция данного нейрона не влияет на работу сердца. Это указывает на взаимосвязь R.Па.D.1 с истинным эндогенным нейронным генератором в ЦНС *Lymnaea*, активация которого приводит к навязыванию ритма сердечных сокращений [9; 10]. С этих позиций появление синаптических входов на мембране R.Па.D.1 при аппликации глюкозы и инсулина можно рассматривать как отражение стимулирующего влияния данных веществ в отношении истинных активирующих нейронов

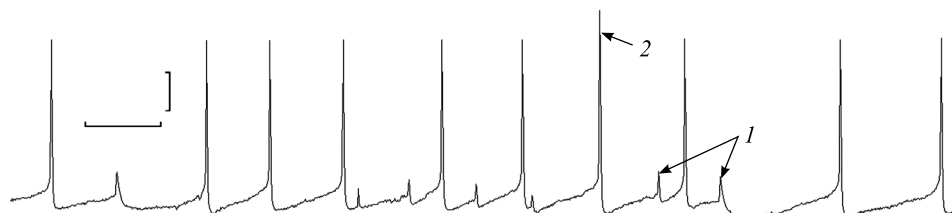


Рис. 6. Электрическая активность нейрона R.Па.D.1 в условиях действия глюкозы: 1 – синаптические входы (возбуждающие постсинаптические потенциалы); 2 – высокоамплитудный спайк. Калибровка: 1 с (по времени), 25 мВ (по амплитуде)

Fig. 6. Electrical activity of R.Pa.D.1 neuron after glucose bath application: 1 – synaptic inputs (excitatory postsynaptic potentials); 2 – high-amplitude spike. Calibration: 1 s (time), 25 mV (amplitude)

сердца, приводящего к увеличению ЧСС, что подтверждено в ходе прямых наблюдений (см. рис. 1). Однонаправленность таких изменений может быть связана с индукцией выброса инсулинподобных пептидов (molluscan insulin-related peptide) в ответ на возрастание концентрации глюкозы в гемолимфе, выступающей также в качестве самостоятельного сигнального агента. Основным источником указанных пептидов у *Lymnaea stagnalis* являются нейроэндокринные светло-зеленые клетки (light-green cells) [11], четыре кластера которых включают около 150 пептидсодержащих нейронов. Усиление электрической активности таких нейронов и увеличение выброса нейромедиатора в обрванных синаптических контактах зависят от поступления глюкозы в клетки за счет активации электрогенного Na⁺-глюкозного транспортера [12]. Кроме того, нельзя исключить и прямого влияния рассматриваемых веществ (глюкоза, инсулин) в отношении сердца моллюсков. На это косвенно указывает факт увеличения ЧСС при действии глюкозы и инсулина в интактном организме в дозах, которые на порядок меньше доз, опосредующих нейротропные эффекты в препаратах изолированной ЦНС.

Электрически связанные нейроны V.D.1 и R.Pa.D.2 относятся к пептидсодержащим клеткам, выделяющим комплекс нейропептидов (более 10 форм), которые синтезируются благодаря альтернативному сплайсингу мРНК [13]. Некоторые из них схожи с пептидом альфа-1 нейрона R15 *Aplysia*, стимулирующим сокращение сердца этого моллюска [14; 15], а отростки V.D.1 и R.Pa.D.2 обнаружены в предсердии у прудовика [16]. Эффекты приложения глюкозы и инсулина к этим клеткам носят разнонаправленный характер, что может отражать полимодальность и полифункциональность данной пары нейронов. Известно, что они вовлечены в регуляцию активности дыхательной сети легочной респирации и связанных с ней органов дыхания [4; 17], ультрафильтрации, а следовательно, участвуют в поддержании водного обмена. Его уровень у *Lymnaea* чрезвычайно высок [18] и лежит в основе одного из механизмов поддержания гомеостаза внутренней среды при накоплении в ней тех или иных продуктов (например, глюкозы при инициации и усилении потребления пищи) [5]. В свою очередь изменения в работе сердца являются основополагающими для формирования гидроскелета [9], определяющего движения тела моллюсков и обслуживающего проявления моторных форм жизнедеятельности. Например, известно, что температура, действие которой приводит к изменению ЧСС и у прудовика [19], выражено модифицирует другие виды его активности, связанные с движением стенки тела, – локомоцию [20] и оборонительные реакции [21]. Такие реакции требуют тонкой кардиорегуляторной составляющей, которая не может быть сведена исключительно к on- или off-ответу со стороны V.D.1 и R.Pa.D.2. При этом их разнонаправленность, как в случае с реакциями на приложение глюкозы и инсулина, существенно повышает степень свободы этих клеток и число возможных регуляторных схем в ответ на действие нейротропного агента (например, ингибирование эффектов гипергликемии, в том числе напрямую не связанных с ее кардиостимулирующим действием, под влиянием инсулинподобных пептидов).

Таким образом, изменение глюкозного гомеостаза выступает триггером ответных реакций со стороны центральных нейронов *Lymnaea stagnalis* за счет как прямого действия глюкозы, так и опосредованного продукцией инсулинподобных пептидов, изменения электрической активности полифункциональных клеток кардиорегуляторной сети ЦНС.

Библиографические ссылки

1. Svensson E, Apergis-Schoute J, Burnstock G, Nusbaum MP, Parker D., Schiöth HB. General principles of neuronal co-transmission: insights from multiple model systems. *Frontiers in Neural Circuits*. 2018;12:117. DOI: 10.3389/fncir.2018.00117.
2. Bilotta F, Lauretta MP, Tewari A, Haque M, Hara N, Uchino H, et al. Insulin and the brain: a sweet relationship with intensive care. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2017;32(1):48–58. DOI: 10.1177/0885066615594341.
3. Журавлев ВЛ. Механизмы нейрогуморального контроля сердца гастропод. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 1999;35(2):65–77.
4. Сидоров АВ. *Функциональная активность нервных центров беспозвоночных*. Минск: БГУ; 2011. 247 с.
5. Veldhuijzen JP. Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*. 1975;25(1):89–102. DOI: 10.1163/002829675X00146.
6. Солтанов ВВ, Бурко ВЕ. Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных. *Новости медико-биологических наук*. 2005;1:91–95.
7. Шаденко ВН, Сидоров АВ. Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска *Lymnaea stagnalis* при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:79–84. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.
8. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1994.
9. Сафонова ТА, Журавлев ВЛ, Ноздрачев АД. *Кардиореспираторная система моллюсков: структура, функции, механизмы регуляции*. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского университета; 2008. 244 с.

10. Журавлев ВЛ, Сафонова ТА, Кадырова КК. Синхронизация нейрональной активности и сокращений сердца прудовика *Lymnaea stagnalis*. Вестник Ленинградского государственного университета. Серия 3. 1989;2:61–68.
11. Smit AB, Vreugenhil E, Ebberink RHM, Geraerts WPM, Klootwijk J, Joosse J. Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*. 1988;331:535–538. DOI: 10.1038/331535a0.
12. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/bf00372957.
13. Bogerd J, Geraerts WP, Van Heerikhuizen H, Kerkhoven RM, Joosse J. Characterization and evolutionary aspects of a transcript encoding a neuropeptide precursor of *Lymnaea* neurons, VD1 and RPD2. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 1991;11:47–54. DOI: 10.1016/0169-328x(91)90020-x.
14. Buck LB, Bigelow JM, Axel R. Alternative splicing in individual Aplysia neurons generates neuropeptide diversity. *Cell*. 1987;51(1):127–133. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90017-1.
15. Kerkhoven RM, Ramkema MD, Van Minnen J, Croll RP, Pin T, Boer HH. Neurons in a variety of molluscs react to antibodies raised against the VD₁/RPD₂ α -neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research*. 1993;273(2):371–379. DOI: 10.1007/bf00312840.
16. Kononenko NL, Zhukov VV. Neuroanatomical and immunocytochemical studies of the head retractor muscle innervation in the pond snail, *Lymnaea stagnalis* L. *Zoology (Jena)*. 2005;108(3):217–237. DOI: 10.1016/j.zool.2005.04.003.
17. Sidorov AV. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurones. *Invertebrate Neuroscience*. 2012;12(1):63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
18. Van Aardt WJ. Quantitative aspects of the water balance in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*. 1967;18(3):253–312. DOI: 10.1163/002829668X00018.
19. Сидоров АВ, Казакевич ВБ. Температурная зависимость центральной регуляции сердечной деятельности моллюска *Lymnaea stagnalis*. В: Улащик ВС, редактор. Проблемы регуляции висцеральных функций. Книга 1. Минск: РИВШ; 2008. с. 212–216.
20. Sidorov AV, Kazakevich VB. Dependence of electric activity of motoneurons and locomotor behavior of *Lymnaea stagnalis* on environmental temperature. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2001;37(3):252–257. DOI: 10.1023/A:1012667206908.
21. Сидоров АВ. Влияние температуры на легочное дыхание, оборонительные реакции и локомоторное поведение пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis*. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2003;53(4):513–517.

References

1. Svensson E, Apergis-Schoute J, Burnstock G, Nusbaum MP, Parker D, Schiöth HB. General principles of neuronal co-transmission: insights from multiple model systems. *Frontiers in Neural Circuits*. 2018;12:117. DOI: 10.3389/fncir.2018.00117.
2. Bilotta F, Lauretta MP, Tewari A, Haque M, Hara N, Uchino H, et al. Insulin and the brain: a sweet relationship with intensive care. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2017;32(1):48–58. DOI: 10.1177/0885066615594341.
3. Zhuravlev VL. [Mechanisms of neurohumoral control of gastropods heart]. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 1999;35(2):65–77. Russian.
4. Sidorov AV. *Funktsional'naya aktivnost' nervnykh tsentrov bespozvonochnykh* [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk: Belarusian State University; 2011. 247 p. Russian.
5. Veldhuijzen JP. Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*. 1975;25(1):89–102. DOI: 10.1163/002829675X00146.
6. Soltanov VV, Burko VE. [Computer programs for electrophysiological data-processing]. *News of biomedical sciences*. 2005;1:91–95. Russian.
7. Shadenko VN, Sidorov AV. Induction of experimental hyperglycemia in mollusc *Lymnaea stagnalis* after animal's incubation in high-concentrated glucose solution. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:79–84. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.
8. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1994.
9. Safonova TA, Zhuravlev VL, Nozdrachev AD. *Kardiorespiratornaya sistema mollyuskov: struktura, funktsii, mekhanizmy regulatsii* [Cardiorespiratory system of molluscs: structure, functions, regulatory mechanisms]. Saint Petersburg: Publishing House of Saint Petersburg University; 2008. 244 p. Russian.
10. Zhuravlev VL, Safonova TA, Kadyrova KK. [Synchronization of neuronal activity and heart beating in pond snail *Lymnaea stagnalis*]. *Vestnik Leningradskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 3*. 1989;2:61–68. Russian.
11. Smit AB, Vreugenhil E, Ebberink RHM, Geraerts WPM, Klootwijk J, Joosse J. Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*. 1988;331:535–538. DOI: 10.1038/331535a0.
12. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/bf00372957.
13. Bogerd J, Geraerts WP, Van Heerikhuizen H, Kerkhoven RM, Joosse J. Characterization and evolutionary aspects of a transcript encoding a neuropeptide precursor of *Lymnaea* neurons, VD1 and RPD2. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 1991;11:47–54. DOI: 10.1016/0169-328x(91)90020-x.
14. Buck LB, Bigelow JM, Axel R. Alternative splicing in individual Aplysia neurons generates neuropeptide diversity. *Cell*. 1987;51(1):127–133. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90017-1.
15. Kerkhoven RM, Ramkema MD, Van Minnen J, Croll RP, Pin T, Boer HH. Neurons in a variety of molluscs react to antibodies raised against the VD₁/RPD₂ α -neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research*. 1993;273(2):371–379. DOI: 10.1007/bf00312840.

16. Kononenko NL, Zhukov VV. Neuroanatomical and immunocytochemical studies of the head retractor muscle innervation in the pond snail, *Lymnaea stagnalis* L. *Zoology (Jena)*. 2005;108(3):217–237. DOI: 10.1016/j.zool.2005.04.003.
17. Sidorov AV. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurones. *Invertebrate Neuroscience*. 2012;12(1):63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
18. Van Aardt WJ. Quantitative aspects of the water balance in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*. 1967;18(3):253–312. DOI: 10.1163/002829668X00018.
19. Sidorov AV, Kazakevich VB. Temperature dependence of the central regulation of cardiac activity of mollusk *Lymnaea stagnalis*. In: Ulaschuk VS, editor. *Problemy regulyatsii vistseral'nykh funktsii. Kniga 1* [Problems of regulation of visceral functions. Book 1]. Minsk: RIVSh; 2008. p. 212–216. Russian.
20. Sidorov AV, Kazakevich VB. Dependence of electric activity of motoneurons and locomotor behavior of *Lymnaea stagnalis* on environmental temperature. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2001;37(3):252–257. DOI:10.1023/A:1012667206908.
21. Sidorov AV. Effects of temperature on respiration, defensive behavior and locomotion of fresh water snail *Lymnaea stagnalis*. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti im. I. P. Pavlova*. 2003;53(4):513–517. Russian.

Статья поступила в редколлегию 16.10.2019.
Received by editorial board 16.10.2019.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.66

КЛОНИРОВАНИЕ КДНК ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *ASPERGILLUS AWAMORI* В ДРОЖЖЕВОЙ ИНТЕГРАТИВНЫЙ ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР

Е. В. КУЛИК¹⁾, О. Б. РУСЬ¹⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

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

На основе дрожжевого вектора рKLAC2 сконструирована плазмида рKGLA-1 с кДНК глюкоамилазы гриба *Aspergillus awamori* 466. В результате проведенного клонирования нуклеотидной последовательности гена *glaA* в клетках *Kluyveromyces lactis* GG799 синтезируется рекомбинантный фермент с нативным N-концом. С помощью реакции амплификации целевого гена и рестрикционного анализа генетической конструкции подтверждено успешное создание плазмиды рKGLA-1. Эффективность экспрессии целевого гена в дрожжевых клетках, обусловленной интеграцией экспрессионной кассеты в область промотора LAC4 геномной ДНК вследствие гомологичной рекомбинации, доказана чашечным методом. Рекомбинантные клетки *K. lactis* росли на селективной минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида и секретируют глюкоамилазу, о чем свидетельствовали зоны гидролиза крахмала вокруг колоний. Практическое применение сконструированной плазмиды может быть реализовано при создании различных дрожжевых штаммов-продуцентов глюкоамилаз гриба *A. awamori* с определенными промышленно значимыми свойствами.

Ключевые слова: клонирование; глюкоамилаза; интегративный экспрессионный вектор; *Kluyveromyces lactis*.

Образец цитирования:

Кулик ЕВ, Русь ОБ, Евтушенко АН. Клонирование кДНК глюкоамилазы *Aspergillus awamori* в дрожжевой интегративный экспрессионный вектор. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;3:59–66. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-59-66>

For citation:

Kulik AV, Rus OB, Evtushenkov AN. Cloning of cDNA glucoamylase *Aspergillus awamori* into yeast integrative expression vector. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019; 3:59–66. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-59-66>

Авторы:

Елена Вячеславовна Кулик – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Ольга Борисовна Русь – кандидат химических наук, доцент; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Анатолий Николаевич Евтушенко – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Alena V. Kulik, PhD (biology); head of the laboratory of transgenic plants at the department of molecular biology, faculty of biology.

alena.kulik31@gmail.com

Olga B. Rus, PhD (chemistry), docent; associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology.

zrbio@mail.ru

Anatoliy N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; head of the department of molecular biology, faculty of biology.

evtushenkov@bsu.by

CLONING OF cDNA GLUCOAMYLASE *ASPERGILLUS AWAMORI* INTO YEAST INTEGRATIVE EXPRESSION VECTOR

A. V. KULIK^a, O. B. RUS^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. V. Kulik (alena.kulik31@gmail.com)

We constructed pKLAC2-based integrative expression plasmid pKGLA-1 with *glaA* gene from *Aspergillus awamori* 466. The PCR amplification of the target gene *glaA* and restriction analysis proved pKGLA-1 construction. Linearised plasmid was used for the integrative transformation of chemically competent *Kluyveromyces lactis* GG799 cells. Colonies of cells transformed with pKGLA-1 plasmid were selected by growth on agar plates containing 5 mmol/L acetamide. Expression of the heterologous gene in *K. lactis* cells was visually assessed using medium containing 2 % starch. *K. lactis* cells containing integrated pKGLA-1 DNA secreted recombinant protein glucoamylase with a native N-terminus.

Keywords: cloning; glucoamylase; integrative expression vector; *Kluyveromyces lactis*.

Введение

На протяжении длительного времени дрожжи *Kluyveromyces lactis* используются при производстве коммерческих препаратов белков в промышленном масштабе [1; 2]. Этот вид дрожжей внесен Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (FDA) в список «организмов, признанных безопасными» (generally regarded as safe, GRAS). Биотехнологический процесс получения белков с помощью клеток *K. lactis* детально разработан, а особый статус GRAS подтверждает, что синтезированные препараты могут использоваться в качестве пищевых добавок [3].

Дрожжи *K. lactis* обладают рядом свойств, привлекательных для биотехнологии, в частности, они характеризуются быстрым ростом. Их способность секретировать рекомбинантные белки за пределы клетки позволяет получать стабильный белковый продукт с посттрансляционными модификациями, что значительно повышает рентабельность его производства благодаря снижению затрат на очистку. Возможность простого проведения с дрожжевыми клетками генетических манипуляций обуславливает использование этого эукариотического организма для экспрессии модифицированных генов, детерминирующих синтез белков с определенными характеристиками.

В целях получения дрожжевых штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, накапливающихся за пределами клетки, используется интегративный вектор pKLAC2 [4]. Его конструкция позволяет клонировать целевой ген в область полилинкера, расположенную после нуклеотидной последовательности лидерного пептида α -фактора спаривания (α -MF) *K. lactis*. В этом случае под контролем сильного дрожжевого промотора P_{LAC4} происходит экспрессия гена в виде химерной молекулы с доменом α -фактора. Поскольку рекомбинантные белки, кодируемые генами, клонированными в вектор, подвергаются процессингу Кех-протеазой в аппарате Гольджи, существуют две стратегии для образования химерных белковых молекул с доменом фактора спаривания. В результате реализации первого подхода синтезируется рекомбинантный белок с нативным N-концом, а второго – белок, содержащий на N-конце дополнительные аминокислотные остатки, кодируемые определенным участком вектора. В клонировании по первой модели используется уникальный сайт *XhoI*, который расположен перед областью, детерминирующей аминокислотную последовательность, распознаваемую Кех-протеазой. Ген, клонированный с помощью *XhoI* рестриктазы, должен содержать нуклеотидную последовательность, которая восстанавливает сайт Кех-протеазы для обеспечения процессинга предшественника протеина. В случае когда целевой ген содержит сайт *XhoI* или когда нативный N-конец рекомбинантного белка может быть удален, образование химерного белкового продукта с фактором спаривания достигается путем клонирования целевого гена в любой сайт полилинкера. Рекомбинантный белок, синтезированный таким способом, будет содержать дополнительные аминокислотные остатки, кодируемые нуклеотидной последовательностью векторной ДНК, расположенной между Кех-сайтом и полилинкером.

Для осуществления процесса интеграции экспрессионной кассеты с клонированным геном в локус LAC4 генома *K. lactis* в результате гомологичной рекомбинации необходимо линейаризировать рекомбинантный вектор с помощью рестриктазы *SacII* или *BstXI*. Селективный отбор дрожжевых трансформантов на минимальной среде с ацетамидом обеспечивает ген *amdS*, кодирующий ацетамидазу *A. nidulans* и расположенный в интегрируемой экспрессионной кассете вектора под контролем дрожжевого промотора P_{ADHI}.

Цель работы – создание генетической конструкции с кДНК глюкоамилазы мицелиального гриба *Aspergillus awamori* на основе интегративного дрожжевого вектора рKLAC2. Препараты глюкоамилазы (α -1,4-глюкан-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.3) широко используются для ферментативной обработки крахмалсодержащего сырья в различных отраслях пищевой промышленности, таких как спиртовая, пивоваренная, крахмало-паточная и хлебопекарная. Созданная рекомбинантная конструкция может найти применение для получения различных дрожжевых штаммов-продуцентов глюкоамилаз с определенными свойствами.

Материалы и методы исследования

Эндонуклеазные реакции выполнялись в объеме 20 мкл для рестрикции 1–2 мкг ДНК в соответствующем рестрикционном буфере (*Fermentas*, США). Рестрикционный фермент добавлялся в концентрации 1 единица на 1 мкг ДНК. Реакционные смеси доводились до конечного объема дистиллированной водой и инкубировались при температуре, рекомендуемой для конкретного фермента, в течение 3 ч.

Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции проводили в 0,8 % агарозном геле в ТАЕ-буфере с добавлением бромистого этидия в камере для горизонтального электрофореза (*BioRad*, США), их визуализацию осуществляли с помощью трансиллюминатора.

Выделение из агарозного геля кДНК глюкоамилазы, полученной после рестрикции плазмиды рBGLA-1, осуществляли с использованием коммерческого набора Silica Bead DNA Gel extraction Kit (*Fermentas*).

Для проведения процедуры электротрансформации клеток бактерий готовили электрокомпетентные клетки. Ночную культуру бактерий разводили в соотношении 1 : 25 свежим LB-бульоном и выращивали в условиях аэрации (180 об/мин) при 37 °С до достижения оптической плотности ОП₆₀₀ значения 0,4–0,6. Культуру переносили в центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане в течение 15 мин. Клетки осаждали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 4 °С). Осадок бактерий ресуспендировали в половине исходного объема дистиллированной воды, охлажденной до 4 °С, клетки собирали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 4 °С). Процедуру отмывания клеток повторяли дважды, в каждом последующем случае вдвое уменьшая объем воды. Клетки ресуспендировали в примерно равном объему осадка количестве охлажденного 15 % раствора глицерина в воде, замораживали при –70 °С и использовали по необходимости. Электропорацию проводили на приборе MicroPulser (*BioRad*). Применяли электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 1 или 2 мм. К суспензии компетентных клеток в объеме 20 мкл (при использовании 1-миллиметровой кюветы) или 40 мкл (при использовании 2-миллиметровой кюветы) добавляли раствор ДНК, перемешивали. Смесь вносили в предварительно охлажденную кювету, которую помещали в электропоратор, и подавали импульс тока с соответствующим кювете напряжением. После кювету извлекали и добавляли к клеткам 1 мл LB-бульона, содержащего 0,2 % глюкозы. Клетки инкубировали в течение часа при соответствующей температуре, затем высевали на селективные среды.

Трансформацию клеток *K. lactis* проводили согласно протоколу, представленному в [5]. Отбор трансформантов осуществляли в чашках Петри на минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида.

Чашечный тест на глюкоамилазную активность рекомбинантных клеток дрожжей *K. lactis* проводили в чашках Петри с агаризованной средой Чапека и 2 % крахмалом.

Смесь для амплификации одного образца объемом 15 мкл имела следующий состав: 100–200 нг ДНК, 1,5 мкл 10х-буфера, 0,3 мкл 10 ммоль/л смеси нуклеотидов (*Fermentas*), 0,5 мкмоль/л каждого из праймеров (glaAF cccctcgagaaaagagcgaccttggttcgtggtgag, glaAR cccgaattcctaccgccaggtgtcagtcacc), 0,25 единиц Taq ДНК-полимеразы (*Fermentas*), дистиллированная вода до конечного объема 15 мкл. ПЦР проводили в амплификаторе (*BioRad*) с использованием следующих профилей: предварительная денатурация – 94 °С, 5 мин; денатурация – 94 °С, 30 с, отжиг праймеров – 61 °С, 30 с, элонгация – 72 °С, 2 мин, 35 циклов; ренатурация – 72 °С, 10 мин; 4 °С, до изъятия проб.

Результаты и их обсуждение

В мировом биотехнологическом производстве белковых коммерческих препаратов широко используются дрожжи *K. lactis* благодаря их способности в процессе культивирования на простых по химическому составу средах быстро достигать высокой плотности и эффективно секретируют большие количества гетерологичного белка [6–13]. Для создания штаммов *K. lactis*, синтезирующих определенные белки, необходимо конструирование интегративной плазмиды с клонированным целевым геном и ее введение в дрожжевые клетки. Высокий уровень экспрессии гетерологичных генов в дрожжах, как одна из важных характеристик штаммов, может обеспечиваться различными промоторами

собственных генов *K. lactis* или промоторами из дрожжей других видов [1; 2; 13–17]. Однако наиболее часто используемым является сильный *LAC4*-промотор *K. lactis*, который регулирует экспрессию β -галактозидазы, необходимую для утилизации клеткой лактозы [18]. Этот промотор содержится в составе коммерческого интегративного вектора pKLAC2, применяемого для обеспечения секреции гетерологичных белков клетками *K. lactis* [4]. Встраивание экспрессионной кассеты pKLAC2 с целевым геном в область *LAC4*-промотора дрожжевой хромосомной ДНК обеспечивает генетическую стабильность промышленных штаммов в течение их длительного культивирования в биореакторе [1].

Один из важных аспектов конструирования штаммов с биотехнологическим потенциалом – возможность эффективной экспрессии функционально активных целевых белков в клетках неродственного организма. Это обусловлено явлением неравных частот встречаемости синонимичных кодонов в кодирующих областях генома у различных организмов [19–22]. Популяционно-генетические исследования показали, что синонимичные сайты находятся под слабым селекционным отбором и кодонное предпочтение поддерживается благодаря балансу между процессом естественного отбора, мутациями и дрейфом генов [19].

С использованием компьютерной программы [23] нами был определен индекс адаптации кодонов (codon adaptation index, CAI) гена *glaA* *A. awamori*, экспрессирующегося в клетках *K. lactis*. Его значение составило 0,662, что указывает на весьма вероятную эффективную экспрессию грибной глюкоамилазы в дрожжевых клетках.

Субклонирование кДНК глюкоамилазы *A. awamori* 466 в интегративный вектор pKLAC2 проводилось из плазмидной ДНК pBGLA-1, созданной на основе вектора pBluescript II SK(-), в который по тупым концам была встроена предварительно амплифицированная кДНК (рис. 1).

Особым образом сконструированные праймеры позволили получить в результате ПЦР продукт целевого гена *glaA*, который на 5'-конце содержал нуклеотидную последовательность для рестрицирующей эндонуклеазы *XhoI* и рядом расположенный участок, детерминирующий восстановление области, распознаваемой Kex-протеазой. На 3'-конце ампликона синтезировался сайт для рестриктазы *EcoRI*. В результате обработки плазмиды pBGLA-1 ферментами *EcoRI* и *XhoI* образовавшиеся продукты гидролиза разделяли в агарозном геле и выделяли необходимую для клонирования кДНК. Вектор pKLAC2 был также подвержен рестрикции этими же ферментами.

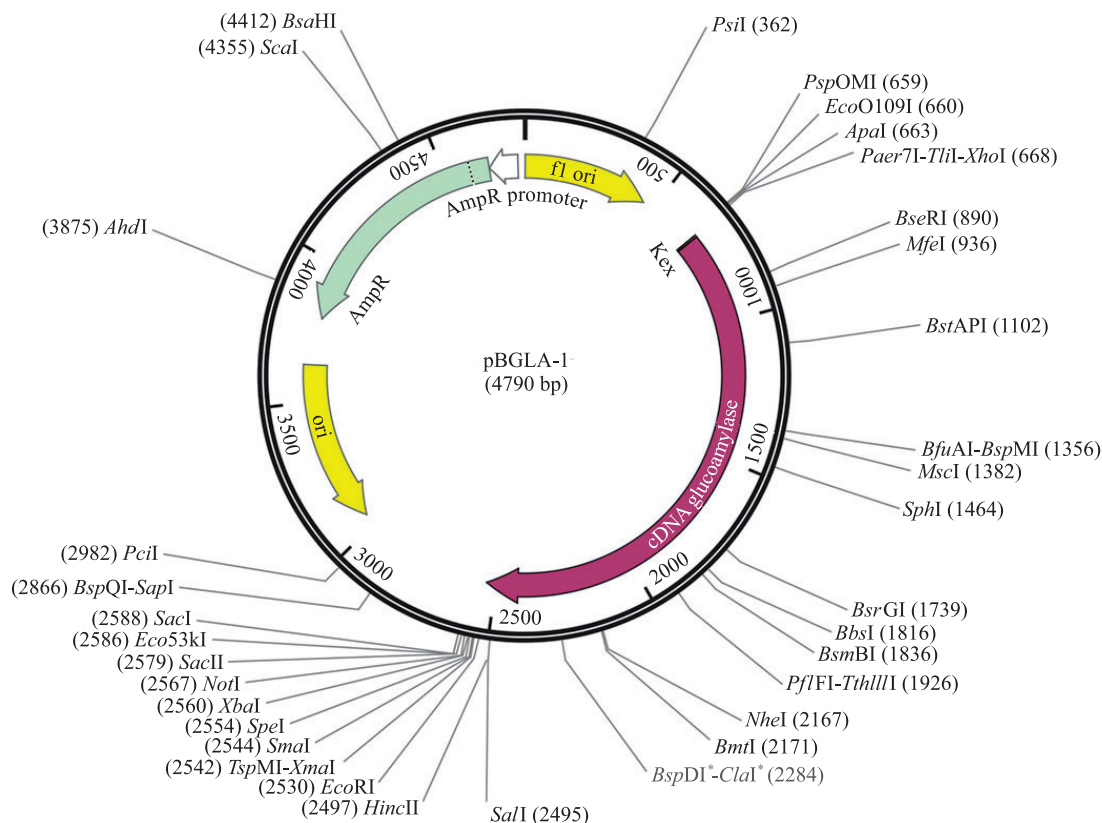


Рис. 1. Генетическая карта плазмиды pBGLA-1

Fig. 1. Genetic map of the pBGLA-1 plasmid

После проведения реакции лигирования рестрицированных дрожжевого вектора и кДНК в компетентные клетки *E. coli* XL-10 Gold вводилась созданная генетическая конструкция с использованием электропорации. Применение методически простой системы клонирования в клетках *E. coli* обусловлено наличием в рKLAC2 репликона рМВ1 *E. coli*.

Отбор рекомбинантов осуществлялся с помощью диагностической ПЦР с праймерами к целевому гену. На рис. 2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации, полученных при использовании колоний трансформантов.

Из клеток колоний, в результате ПЦР с которыми был получен ампликон, выделялись плазмидные ДНК. Для определения наличия кДНК глюкоамилазы в составе созданной конструкции рKGLA-1 проводился рестрикционный анализ с помощью рестрицирующей эндонуклеазы *EcoRI*. Анализ продуктов рестрикции подтвердил присутствие вставки кДНК в сконструированной плазмиде (рис. 3). В частности, обработка ферментом всех анализируемых образцов плазмид рKGLA-1 приводила к образованию продукта, размер которого превышал таковой исходного вектора без вставки.

Другим методическим подходом, подтверждающим наличие вставки кДНК глюкоамилазы в составе сконструированной плазмиды рKGLA-1, являлась реакция амплификации с праймерами к гену *glaA*. В качестве матрицы использовали выделенную из рекомбинантов генетическую конструкцию. Результаты проведенной ПЦР показывают (рис. 4), что сконструированная плазмида рKGLA-1 содержит вставку – кДНК глюкоамилазы *A. awamori*.

Таким образом, на основе интегративного вектора для дрожжей создана генетическая конструкция, содержащая кДНК глюкоамилазы *A. awamori* (рис. 5).

В целях оценки эффективности функционирования созданной интегративной плазмиды в дрожжевых клетках была проведена трансформация компетентных клеток *K. lactis* GG799. Отбор рекомбинантов осуществлялся с использованием ацетамидазного селективного маркера (*amdS*), экспрессия которого находится под дрожжевым промотором *ADHI*. В трансформированных дрожжевых клетках

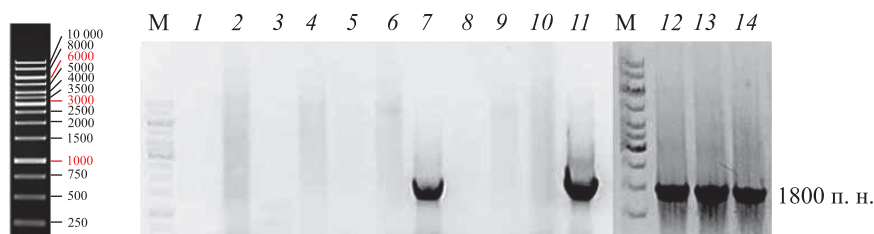


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных с использованием колоний трансформантов *E. coli* XL-10 Gold. Матрицей являлись: 1 – вектор рKLAC2 (отрицательный контроль); 2–10, 12–14 – колонии трансформантов; 11 – плазмида рBGLA-1 (положительный контроль). М – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 2. Agarose electrophoresis of PCR amplicons obtained by PCR from *E. coli* XL-10 Gold transformants. 1 – plasmid pKLAC2 (negative control); 2–10, 12–14 – colonies; 11 – plasmid pBGLA-1 (positive control); M – marker DNA, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

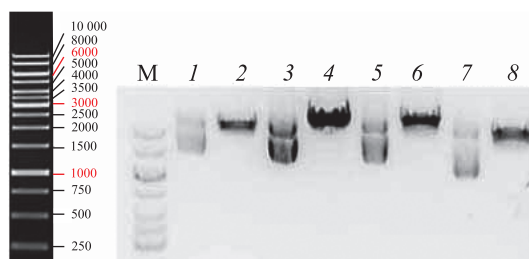


Рис. 3. Электрофореграмма рестрикционных фрагментов ДНК рKGLA-1 и рKLAC2: 1, 3, 5 – исходная плазмида рKGLA-1; 2, 4, 6 – продукт рестрикции плазмиды рKGLA-1; 7 – исходный вектор рKLAC2; 8 – продукт рестрикции вектора рKLAC2; М – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 3. Agarose gel illustrating the *EcoRI* digestion of the pKGLA-1 and pKLAC2 plasmids: 1, 3, 5 – pKGLA-1 without digestion; 2, 4, 6 – *EcoRI* digestion of pKGLA-1; 7 – pKLAC2 without digestion; 8 – *EcoRI* digestion of pKLAC2; M – marker DNA, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

в отличие от исходных должна происходить экспрессия ацетамидазы, что позволяет им утилизировать ацетамид в качестве единственного источника азота и расти на минимальной среде с этим химическим соединением. Для проверки глюкоамилазной активности чашечным методом дрожжевые колонии, отобранные на минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида, пересеивались на питательную среду с субстратом для глюкоамилазы – крахмалом. Как показано на рис. 6, зоны гидролиза крахмала наблюдались у 24 из 32 клонов.

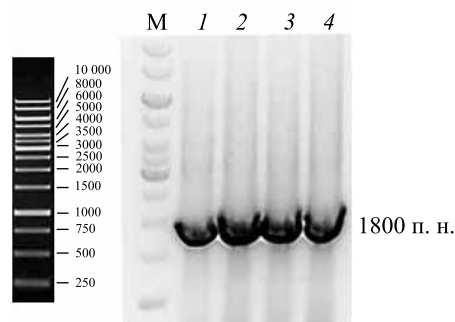


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к гену *glaA* *A. awamori* и плазмидной ДНК pKGLA-1 рекомбинантов (1–4).

М – маркерная ДНК GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Fig. 4. Agarose electrophoresis of PCR amplicons obtained by PCR with plasmid DNA pKGLA-1 (1–4) and gene-specific primers for *glaA* from *A. awamori*.

М – marker DNA, GeneRuler 1 kb DNA Ladder

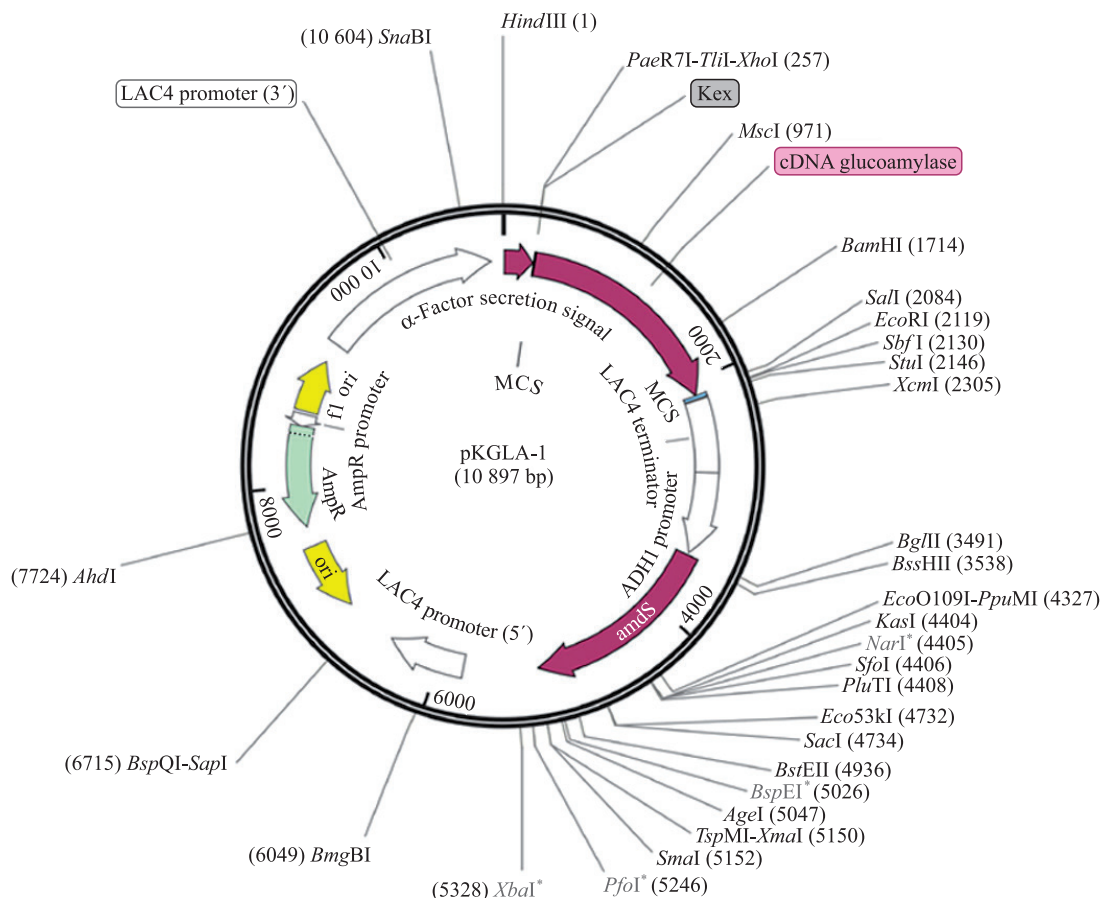


Рис. 5. Генетическая карта плазмиды pKGLA-1

Fig. 5. Genetic map of the pKGLA-1 plasmid

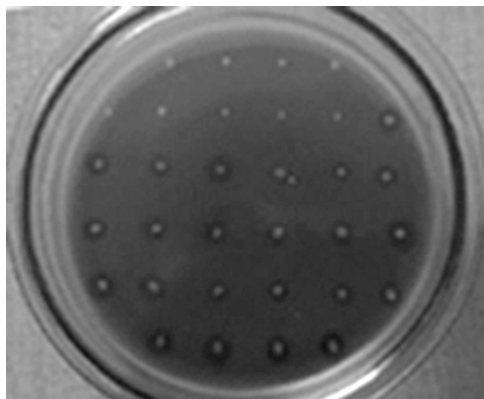


Рис. 6. Чашечный тест на глюкоамилазную активность рекомбинантных клеток дрожжей *K. lactis* с плазмидой pKGLA-1, выросших на агаризованной среде с добавлением крахмала

Fig. 6. Analysis of the glucoamylase expression in *K. lactis* cells with the pKGLA-1 plasmid. The cells were grown on the starch agar

Наличие зон гидролиза крахмала вокруг 24 колоний свидетельствует о секреции рекомбинантными клетками дрожжей глюкоамилазы грибов *A. awamori*, что подтверждает интеграцию экспрессионной кассеты в область промотора LAC4 геномной ДНК вследствие гомологичной рекомбинации и функциональную активность созданной конструкции pKGLA-1 в *K. lactis*.

Заключение

Создана генетическая конструкция pKGLA-1 с кДНК глюкоамилазы гриба *A. awamori* 466 на основе интегративного вектора для дрожжей pKLAC2. В результате клонирования нуклеотидной последовательности гена *glaA* в клетках *K. lactis* GG799 синтезируется рекомбинантный фермент с нативным N-концом. Подтверждением успешного создания конструкции pKGLA-1 служат амплификация целого гена и рестрикционный анализ ДНК плазмиды.

Эффективность экспрессии целевого гена в дрожжевых клетках, обусловленной интеграцией экспрессионной кассеты в область промотора LAC4 геномной ДНК вследствие гомологичной рекомбинации, доказана чашечным методом. Рекомбинантные клетки *K. lactis* росли на селективной минимальной среде с добавлением 5 ммоль/л ацетамида и секретиовали глюкоамилазу, о чем свидетельствовали зоны гидролиза крахмала вокруг колоний.

Практическое применение сконструированной плазмиды может быть реализовано при создании различных дрожжевых штаммов-продуцентов глюкоамилаз гриба *A. awamori* с определенными промышленно значимыми свойствами.

Библиографические ссылки / References

1. Swinkels BW, van Ooyen AJ, Bonekamp FJ. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993;64(2):187–201. DOI: 10.1007/bf00873027.
2. van den Berg JA, van der Laken KJ, van Ooyen AJ, Renniers TC, Rietveld K, Schaap A, et al. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (N Y)*. 1990;8(2):135–139. DOI: 10.1038/nbt0290-135.
3. Breunig KD, de Steensma HY. *Kluyveromyces lactis*: genetics, physiology, and application. In: de Winde JH, editor. *Functional genetics of industrial yeast. Topics in Current Genetics. Volume 2*. Berlin: Springer; 2003. DOI: 10.1007/3-540-37003-X_6.
4. Read JD, Colussi PA, Ganatra MB, Taron CH. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(16):5088–5096. DOI: 10.1128/AEM.02253-06.
5. Yeast Protocols Handbook [Internet]. S. a.: Clontech; 2009 [cited 2019 March 10]. Available from: <http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3024-1.pdf>.
6. De Silva C, Dhanapala P, King S, Doran T, Tang M, Suphioglu C. Immunological Comparison of Native and Recombinant Hen's Egg Yolk Allergen, Chicken Serum Albumin (Gal d 5), Produced in *Kluyveromyces lactis*. *Nutrients*. 2018;10(6):E757. DOI: 10.3390/nut10060757.
7. Stressler T, Leisibach D, Lutz-Wahl S, Kuhn A, Fischer L. Homologous expression and biochemical characterization of the arylsulfatase from *Kluyveromyces lactis* and its relevance in milk processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(12):5401–5414. DOI: 10.1007/s00253-016-7366-2.
8. Jiménez JJ, Borrero J, Diep DB, Gútiez L, Nes IF, Herranz C, et al. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2013;40(9):977–993. DOI: 10.1007/s10295-013-1302-6.

9. Jo HJ, Noh JS, Kong KH. Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expression Purification*. 2013;90(2):84–89. DOI: 10.1016/j.pep.2013.05.001.
10. Rodicio R, Heinisch JJ. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 2013;30(5):165–177. DOI: 10.1002/yea.2954.
11. Bui DM, Kunze I, Horstmann C, Schmidt T, Breunig KD, Kunze G. Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996;45(1–2):102–106. DOI: 10.1007/s002530050655.
12. Fleer R, Chen XJ, Amellal N, Yeh P, Fournier A, Guinet F, et al. High-level secretion of correctly processed recombinant interleukin-1 β in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*. 1991;107(2):285–295. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90329-a.
13. Saliola M, Mazzoni C, Solimando N, Crisa A, Falcone C, Jung G, Fleer R. Use of the KlADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;65(1):53–60. PMID: PMC90982.
14. Fleer R, Yeh P, Amellal N, Maury I, Fournier A, Bacchetta F, et al. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology (N Y)*. 1991;9(10):968–975. DOI: 10.1038/nbt1091-968.
15. Rossoloini GM, Riccio ML, Gallo E, Galeotti CL. *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination. *Gene*. 1992;119(1):75–81. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90068-z.
16. Tanaka R, Ishibashi M, Tokunaga H, Tokunaga M. Secretion of hen egg white lysozyme from *Kluyveromyces lactis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2000;64(12):2716–2718. DOI: 10.1271/bbb.64.2716.
17. Walsh DJ, Bergquist PL. Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(8):3297–3300.
18. Colussi PA, Taron CH. *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(11):7092–7098. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7092-7098.2005.
19. Hershberg R, Petrov DA. Selection on codon bias. *Annual Review of Genetics*. 2008;42:287–299. DOI: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091442.
20. Lloyd AT, Sharp PM. Synonymous codon usage in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 1993;9(11):1219–1228. DOI: 10.1002/yea.320091109.
21. Freire-Picos MA, González-Siso MI, Rodríguez-Belmonte E, Rodríguez-Torres AM, Ramil E, Cerdán ME. Codon usage in *Kluyveromyces lactis* and in yeast cytochrome *c*-encoding genes. *Gene*. 1994;139(1):43–49. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90521-5.
22. Cripwell RA, Rose SH, van Zyl WH. Expression and comparison of codon optimized *Aspergillus tubingensis* amylase variants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2017;17(4):1–12. DOI: 10.1093/femsyr/fox040.
23. Puigbo P, Bravo IG, García-Vallve S. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*. [Internet] 2008 [cited 2019 August 24];3:38. Available from: <http://genomes.urv.es/CAIcal>.

Статья поступила в редколлегию 04.09.2019.
Received by editorial board 04.09.2019.

УДК 575.858:582.998.1(476)

ВНУТРИ- И МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *SOLIDAGO CANADENSIS* L. s. l. В БЕЛАРУСИ

В. Н. ТИХОМИРОВ¹⁾, И. А. РОВЕНСКАЯ²⁾

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

²⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Изучена изменчивость 22 морфологических признаков в 5 популяциях *Solidago canadensis* L. s. l., произрастающих в г. Минске и его окрестностях. Сравнение полученных данных с ранее опубликованной информацией по характеру и диапазону изменчивости североамериканских таксонов *Solidago* subsect. *Triplinerviae* показало, что обитающие на территории Республики Беларусь растения по совокупности морфологических признаков не могут быть однозначно отнесены ни к одному из североамериканских видов. По сравнению с последними представители белорусских популяций имеют существенно более мощный габитус (большие средняя высота растения, длина и во многих популяциях ширина средних стеблевых листьев, чаще всего более крупное соцветие), промежуточные по сравнению с *S. canadensis* s. str. и *S. altissima* s. str. и достоверно отличающиеся от обоих североамериканских видов длину корзинки и длину трубчатых цветков, у них значительно длиннее наружные листочки обертки, короче отгибы ложноязычковых цветков, крупнее завязи ложноязычковых цветков (но короче их хохолки), заметно меньшее число трубчатых цветков в корзинке. Зубцы трубчатых цветков в корзинке крупнее по сравнению с *S. canadensis* s. str. и *S. altissima* s. str. Полученные данные подтверждают точку зрения Х. Шольца, согласно которой инвазивные золотарники, широко распространяющиеся в настоящее время по всей территории Европы, имеют европейское происхождение. Вероятнее всего, они либо являются стабилизировавшимися гибридами, возникшими в ходе селекции благодаря скрещиванию нескольких североамериканских видов, либо образовались в результате спонтанной мутации и дальнейшего отбора в природных условиях.

Ключевые слова: *Solidago canadensis*; Беларусь; изменчивость; морфометрия.

Образец цитирования:

Тихомиров ВН, Ровенская ИА. Внутри- и межпопуляционная изменчивость *Solidago canadensis* L. s. l. в Беларуси. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;3:67–78.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-67-78>

For citation:

Tikhomirov VN, Ravenskaya IA. Intra- and interpopulation variability of *Solidago canadensis* L. s. l. in Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:67–78. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-67-78>

Авторы:

Валерий Николаевич Тихомиров – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой ботаники биологического факультета.

Ирина Александровна Ровенская – кандидат биологических наук; доцент кафедры экологического мониторинга и менеджмента факультета мониторинга окружающей среды.

Authors:

Valery N. Tikhomirov, PhD (biology), docent; head of the department of botany, faculty of biology.

tikhomirov_v_n@list.ru; tikhomvn@bsu.by
<http://orcid.org/0000-0003-1822-0557>

Iryna A. Ravenskaya, PhD (biology); associate professor at the department of environmental monitoring and management, faculty of environmental monitoring.

<http://orcid.org/0000-0003-1813-7817>

INTRA- AND INTERPOPULATION VARIABILITY OF *SOLIDAGO CANADENSIS* L. s. l. IN BELARUS

V. N. TIKHOMIROV^a, I. A. RAVENSKAYA^b

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

Corresponding author: V. N. Tikhomirov (tikhomirov_v_n@list.ru; tikhomvn@bsu.by)

The study of the variability of 22 morphological characters in 5 populations of *Solidago canadensis* L. s. l., growing in the city of Minsk and its environs, was carried out. Comparison of the obtained data with previously published information on the nature and range of variability of the North American taxa *Solidago* subsect. *Triplinerviae* showed that plants growing on the territory of the Republic of Belarus cannot be unambiguously assigned to any of the North American species by the combination of morphological characters. Compared to North American taxa, the plants of the studied populations have a significantly more powerful habitus (a large average plant height, longer and in many populations broader mid stem leaves, most often a larger inflorescence), intermediate in comparison with *S. canadensis* s. str. and *S. altissima* s. str. and significantly different from both North American species, the length of involucres and the length of tubular flowers, significantly longer outer phyllaries, shorter straps of ray florets, larger ovaries of ray florets, but their shorter pappus, a significantly smaller number of disc florets. The disc florets have significantly larger teeth compared to *S. canadensis* s. str. and *S. altissima* s. str. The data obtained confirm the point of view of Hildemar Scholz, according to which the invasive goldenrod, which is currently widely distributed throughout Europe, are of European origin. Most likely, they are either stabilized hybrids that arose during breeding due to the crossing of several North American species, or arose as a result of spontaneous mutation and further selection under natural conditions.

Keywords: *Solidago canadensis*; Belarus; variability; morphometric analysis.

Введение

Solidago subsect. *Triplinerviae* (Torr. & A. Gray) G. L. Nesom включает в себя 17–18 видов [1]. Данная подсекция объединяет виды золотарников, в естественных условиях широко распространенные в умеренной зоне Северной Америки. В свою очередь, они могут быть разделены на несколько более мелких комплексов, из которых наиболее часто встречается так называемый комплекс *Solidago altissima* L. s. l., включающий 4 близкородственных вида: *Solidago altiplanities* Taylor & Taylor, *Solidago juliae* G. L. Nesom, *Solidago altissima* L. и *Solidago canadensis* L.

Solidago altissima L. и *Solidago canadensis* L. – одно из самых старых растений, которые были интродуцированы в Европу из Северной Америки как декоративные [2]. Предполагается, что многие из популяций данных видов в Европе являются результатом «бегства из культуры» из ботанических садов, питомников декоративных растений или из старых усадеб [3]. Впервые как культивируемое растение *S. canadensis* L. s. l. был отмечен в Англии в 1645 г. [4]. Натурализация вида в Европе началась в середине XIX в., однако активно внедряться в естественные сообщества он стал только в конце XX в. [5]. Известно, что в Беларуси вид выращивается уже более 100 лет, однако в одичавшем состоянии достоверно был отмечен только в 1975 г. [6]. Для второго вида, дичающего в Европе, в ряде источников использовалось название *S. altissima* [2; 7; 8], однако, как было недавно установлено, типичный *S. altissima* L. s. str. в Европе является крайне редким растением и достоверно отмечен только в Бельгии [9].

Одновременно с интродукцией дикорастущих видов в течение XIX и XX вв. велась довольно активная работа по селекции золотарников и их гибридизации. Так, на рубеже веков в каталогах ботанических садов и фирм Англии и Германии появились сорта Golden Wings (вероятно, самый старый европейский сорт [10]), Goldkind, Goldstrahl, Strahlenkrone. Примечательно, что в большинстве каталогов эти сорта указаны совместно с *S. canadensis* L. s. str., но под другими видовыми названиями: чаще всего либо *Solidago hybrida* hort., либо *Solidago cultorum* hort. Этим подчеркивается отличие данных сортов от типичного *S. canadensis* и их гибридное происхождение. Однако уже к 1930-м гг. названия *S. hybrida* и *S. cultorum* практически исчезли из обихода, а большинство сортов золотарников стали рассматриваться как принадлежащие *S. canadensis*. Особо следует подчеркнуть, что примерно в это время начала отмечаться натурализация *S. canadensis* в Европе [2].

Изучение морфологических признаков и характера их изменчивости в инвазивных популяциях *S. canadensis* s. l. в разных европейских регионах [7; 11–13] показало ряд существенных отличий от таковых, приводимых в различных справочных изданиях для североамериканских растений. Поэтому было

высказано предположение, что в настоящее время в Европе распространен и широко дичает не исходный североамериканский вид, а гибридогенные таксоны неясного происхождения [11]. К сожалению, до недавнего времени не было возможности провести корректное сравнение европейских и североамериканских растений ввиду отсутствия достоверной статистически значимой информации о характере и пределах варьирования морфологических признаков исходного вида. Только в 2015 г. появилась работа с очень детальным анализом североамериканских популяций комплекса *S. altissima* L. s. l. [14].

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть предположение о наличии существенных различий между европейскими и североамериканскими видами *S. canadensis* s. l., мы проанализировали морфологическую изменчивость инвазивных золотарников, встречающихся на территории г. Минска и его окрестностей. Были изучены выборки из 5 популяций *S. canadensis* L. s. l. и проведено сравнение полученных результатов с недавно опубликованными данными по изменчивости морфологических признаков *S. altissima* L. s. l. (*S. altissima* var. *altissima*, *S. altissima* var. *gilyocanescens*, *S. altissima* var. *pluricephala*) и *S. canadensis* L. s. l. (*S. canadensis* var. *canadensis* и *S. canadensis* var. *hargerii*) в пределах их естественного ареала в Северной Америке [14].

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 5 популяций *S. canadensis* L. s. l., собранных в Минске и его окрестностях:

- поп_1 – Минская область, граница Минского и Дзержинского районов, в 100 м северо-западнее от трассы Минск – Дзержинск. Вдоль проселочной дороги с трассы к садовому товариществу «Радист», по краю поля. 16.08.2014 г. В. Н. Тихомиров, И. А. Ровенская;
- поп_2 – г. Минск, микрорайон Запад-3, лесопарк «Медвежино». 09.09.2014 г. А. К. Храмцов;
- поп_3 – г. Минск, микрорайон Уручье, на опушке леса. 25.07.2014 г. С. В. Костюк;
- поп_4 – г. Минск, между автовокзалом Юго-Запад и забором Минского комбината силикатных изделий. По склону оврага. 01.09.2014 г. В. Н. Тихомиров, И. А. Ровенская;
- поп_5 – г. Минск, микрорайон Брилевицы-1. Пустырь на стройке у станции метро «Малиновка». 01.09.2014 г. В. Н. Тихомиров, И. А. Ровенская.

Растения собирались в фазе полного цветения и начала плодоношения. С куста брался один хорошо развитый неповрежденный побег. Расстояние между растениями не менее 1 м для исключения вероятности сбора образцов из одного вегетативного клона.

В основе морфологического анализа – комплекс признаков, использованный в работе по изменчивости *S. canadensis* s. l. и *S. altissima* s. l. в Северной Америке [14], так как с результатами указанного исследования в дальнейшем проводилось сравнение полученных нами данных. Анализировались 22 признака вегетативной и генеративной сферы:

- STMHT (height of the stem from base to the top of the inflorescence) – высота растения, см;
- MLFLN (mid stem leaf length) – длина среднего стеблевого листа, мм;
- MLFLW (mid stem leaf width) – ширина среднего стеблевого листа, мм;
- MLFSERNUM (number of serrations on one side of a mid stem leaf, side with the most) – число зубцов с одной стороны среднего стеблевого листа, шт.;
- ULFLN (upper stem leaf length) – длина верхнего стеблевого листа, мм;
- ULFW (upper stem leaf width) – ширина верхнего стеблевого листа, мм;
- ULFSERNUM (number of serrations on one side of a upper stem leaf, side with the most) – число зубцов с одной стороны верхнего стеблевого листа, шт.;
- CAPL (length of inflorescence from tip to base of lowest branch) – длина соцветия от места отхождения нижней ветви до верхушки, см;
- CAPW (width of pressed and dried inflorescence at widest point) – ширина соцветия, см;
- INVOLHT (height of involucre from base to tip of longest phyllary) – высота обертки от основания до верхушки самых длинных листочков обертки, мм;
- OPHYLL (length of outer phyllary) – длина наружных листочков обертки, мм;
- IPHYLL (length of inner phyllary) – длина внутренних листочков обертки, мм;
- RAYNUM (number of ray florets) – число ложноязычковых цветков в корзинке, шт.;
- RSTRAPL (length of the ray strap, lamina) – длина отгиба ложноязычкового цветка, мм;
- RSTRAPW (width of the ray strap, lamina) – ширина отгиба ложноязычкового цветка, мм;
- RACHBL (length of the ray floret ovary at anthesis) – длина завязи ложноязычковых цветков, мм;
- RPAPL (length of the ray floret pappus at anthesis) – длина хохолка ложноязычковых цветков, мм;
- DISCNUM (number of disc florets) – число трубчатых цветков в корзинке, шт.;
- DCORL (length of the disc floret corolla in total) – длина околоцветника трубчатого цветка, мм;

DLOBL (length of the disc floret lobes) – длина зубцов трубчатого цветка, мм;
DACHBL (length of the ray floret ovary at anthesis) – длина завязи трубчатого цветка, мм;
DPAPL (length of the ray floret pappus at anthesis) – длина хохолка трубчатого цветка, мм.

Высоту растения и размеры соцветия определяли с точностью до 1 см, размеры листьев – с точностью до 0,5 мм. Величину корзинки и цветков находили при помощи стереомикроскопа Carl Zeiss (Германия) и автоматической системы обработки изображений *Altami Studio 3.0* с точностью до 0,01 мм. На побеге измерялось по 3 листа в средней и верхней его части непосредственно под соцветием. Корзинки и цветки измеряли в 10-кратной повторности, полученные данные усредняли и вовлекали в дальнейший анализ.

Ввиду того что для североамериканских таксонов нам были известны только средние значения признаков и ошибка среднего, апостериорный анализ полученных данных и выделение однородных подмножеств проводились с использованием рангового критерия Дункана [15; 16].

Результаты и их обсуждение

Анализ изменчивости изученных морфологических признаков вегетативной и генеративной сферы растения показал, что наиболее надежными показателями, которые могут быть использованы при разграничении *S. altissima* L. и *S. canadensis* L., являются ширина средних и верхних стеблевых листьев, размеры соцветия, длина обертки и внутренних листочков обертки, длина и ширина язычка у ложноязычковых цветков, длина трубчатых цветков в корзинке, длина хохолка у ложноязычковых и трубчатых цветков [14]. Сравнительный анализ морфологической изменчивости белорусских популяций выявил их существенные отличия по ряду признаков от обоих североамериканских таксонов (таблица).

Групповые средние значения признаков всех изученных популяций, включенных в анализ
Group means of the means of feature of all studied populations included in the analysis

Признак	Pop_1 (n = 23)	Pop_2 (n = 26)	Pop_3 (n = 21)	Pop_4 (n = 27)	Pop_5 (n = 21)
STMHT	$\frac{132,13 \pm 17,64}{94,70-161,00}$	$\frac{105,25 \pm 24,21}{64,50-142,50}$	$\frac{154,93 \pm 15,23}{124,00-181,5}$	$\frac{108,72 \pm 19,57}{77,50-154,50}$	$\frac{102,40 \pm 14,02}{81,00-124,00}$
MLFLN	$\frac{96,91 \pm 15,06}{57,00-123,00}$	$\frac{87,54 \pm 18,00}{51,00-117,00}$	$\frac{103,76 \pm 15,13}{65,00-130,00}$	$\frac{93,43 \pm 16,54}{70,00-140,00}$	$\frac{122,33 \pm 29,58}{77,00-172,00}$
MLFLW	$\frac{12,15 \pm 1,96}{8,50-16,00}$	$\frac{12,85 \pm 3,59}{7,00-19,00}$	$\frac{14,90 \pm 2,66}{11,00-21,00}$	$\frac{14,19 \pm 2,79}{9,00-20,00}$	$\frac{19,90 \pm 5,53}{11,00-28,00}$
MLFSERNUM	$\frac{8,13 \pm 3,32}{1,00-13,00}$	$\frac{8,58 \pm 4,21}{3,00-17,00}$	$\frac{3,43 \pm 3,08}{0-8,00}$	$\frac{7,22 \pm 2,31}{4,00-13,00}$	$\frac{6,64 \pm 1,50}{4,00-9,00}$
ULFLN	$\frac{67,87 \pm 18,17}{35,00-103,00}$	$\frac{58,92 \pm 15,23}{33,00-103,00}$	$\frac{79,95 \pm 16,09}{52,00-110,00}$	$\frac{69,04 \pm 19,41}{43,00-115,00}$	$\frac{63,67 \pm 15,59}{32,00-95,00}$
ULFW	$\frac{10,26 \pm 2,28}{6,00-15,00}$	$\frac{9,38 \pm 2,94}{5,00-16,00}$	$\frac{12,43 \pm 2,54}{7,00-18,00}$	$\frac{10,93 \pm 2,42}{7,00-17,00}$	$\frac{12,29 \pm 2,87}{6,00-17,00}$
ULFSERNUM	$\frac{5,17 \pm 3,79}{0,00-17,00}$	$\frac{4,42 \pm 2,94}{0-9,00}$	$\frac{1,33 \pm 2,03}{0-7,00}$	$\frac{3,74 \pm 1,93}{0-8,00}$	$\frac{2,26 \pm 1,55}{0,00-5,00}$
CAPL	$\frac{27,32 \pm 7,26}{11,00-40,00}$	$\frac{20,06 \pm 7,90}{11,5-39,00}$	$\frac{29,88 \pm 9,12}{15,50-47,00}$	$\frac{22,04 \pm 5,73}{11,00-34,00}$	$\frac{23,67 \pm 7,55}{12,00-43,00}$
CAPW	$\frac{19,18 \pm 4,32}{8,50-26,00}$	$\frac{14,38 \pm 6,56}{5,50-30,00}$	$\frac{14,10 \pm 3,58}{8,50-20,00}$	$\frac{15,43 \pm 3,96}{9,00-23,00}$	$\frac{15,40 \pm 5,63}{5,00-27,00}$
INVOLHT	$\frac{2,61 \pm 0,24}{2,33-3,05}$	$\frac{2,60 \pm 0,41}{1,84-3,33}$	$\frac{2,34 \pm 0,33}{1,62-2,81}$	$\frac{2,52 \pm 0,29}{1,71-2,97}$	$\frac{3,07 \pm 0,30}{2,50-3,60}$
OPHYLL	$\frac{1,09 \pm 0,28}{0,58-1,75}$	$\frac{1,12 \pm 0,22}{0,79-1,53}$	$\frac{1,18 \pm 0,26}{0,78-1,82}$	$\frac{1,23 \pm 0,23}{0,75-1,62}$	$\frac{1,09 \pm 0,16}{0,80-1,30}$
IPHYLL	$\frac{1,87 \pm 0,32}{1,17-2,33}$	$\frac{2,03 \pm 0,33}{1,40-2,68}$	$\frac{1,96 \pm 0,34}{1,37-2,82}$	$\frac{2,04 \pm 0,27}{1,46-2,49}$	$\frac{2,65 \pm 0,22}{2,30-3,10}$
RAYNUM	$\frac{11,09 \pm 1,59}{7,00-14,00}$	$\frac{9,80 \pm 1,89}{6,00-14,00}$	$\frac{11,00 \pm 1,90}{8,00-15,00}$	$\frac{11,15 \pm 2,33}{8,00-17,00}$	$\frac{11,62 \pm 1,83}{8,00-15,00}$
RSTRAPL	$\frac{0,76 \pm 0,17}{0,45-1,04}$	$\frac{1,09 \pm 0,26}{0,61-1,58}$	$\frac{1,09 \pm 0,27}{0,57-1,78}$	$\frac{1,07 \pm 0,17}{0,69-1,37}$	$\frac{1,12 \pm 0,10}{1,00-1,40}$

Окончание таблицы
Ending table

Признак	Pop_1 (n = 23)	Pop_2 (n = 26)	Pop_3 (n = 21)	Pop_4 (n = 27)	Pop_5 (n = 21)
RSTRAPW	$\frac{0,19 \pm 0,06}{0,11-0,37}$	$\frac{0,19 \pm 0,06}{0,11-0,33}$	$\frac{0,18 \pm 0,05}{0,06-0,26}$	$\frac{0,23 \pm 0,07}{0,13-0,38}$	$\frac{0,27 \pm 0,03}{0,20-0,30}$
RACHBL	$\frac{0,75 \pm 0,29}{0,35-1,67}$	$\frac{0,69 \pm 0,19}{0,40-1,05}$	$\frac{0,71 \pm 0,22}{0,39-1,11}$	$\frac{0,68 \pm 0,19}{0,30-1,06}$	$\frac{0,78 \pm 0,13}{0,60-1,00}$
RPAPL	$\frac{1,68 \pm 0,35}{0,47-2,22}$	$\frac{1,94 \pm 0,30}{1,40-2,52}$	$\frac{1,61 \pm 0,26}{1,09-2,12}$	$\frac{1,75 \pm 0,22}{1,20-2,20}$	$\frac{1,97 \pm 0,19}{1,60-2,30}$
DISCNUM	$\frac{4,70 \pm 1,29}{3,00-7,00}$	$\frac{4,24 \pm 1,16}{3,00-7,00}$	$\frac{4,05 \pm 1,24}{2,00-7,00}$	$\frac{4,33 \pm 1,27}{2,00-8,00}$	$\frac{5,71 \pm 1,23}{4,00-8,00}$
DCORL	$\frac{2,57 \pm 0,25}{2,21-3,04}$	$\frac{2,57 \pm 0,27}{1,92-3,19}$	$\frac{2,53 \pm 0,29}{2,07-3,16}$	$\frac{2,49 \pm 0,20}{2,00-2,89}$	$\frac{2,70 \pm 0,21}{2,30-3,10}$
DLOBL	$\frac{0,64 \pm 0,16}{0,45-1,11}$	$\frac{0,74 \pm 0,18}{0,42-1,22}$	$\frac{0,74 \pm 0,17}{0,52-1,15}$	$\frac{0,74 \pm 0,19}{0,32-1,12}$	$\frac{0,81 \pm 0,11}{0,50-1,00}$
DACHBL	$\frac{0,66 \pm 0,15}{0,42-0,99}$	$\frac{0,62 \pm 0,17}{0,33-1,05}$	$\frac{0,67 \pm 0,18}{0,41-1,21}$	$\frac{0,77 \pm 0,20}{0,43-1,29}$	$\frac{0,80 \pm 0,09}{0,60-0,90}$
DPAPL	$\frac{1,99 \pm 0,15}{1,69-2,26}$	$\frac{2,17 \pm 0,36}{1,35-3,02}$	$\frac{1,80 \pm 0,30}{1,28-2,63}$	$\frac{1,92 \pm 0,26}{1,45-2,44}$	$\frac{2,16 \pm 0,22}{1,70-2,50}$

Примечание. В числителе – среднее значение и стандартное отклонение, в знаменателе – интервал варьирования.

Высота растения (STMHT). Ранговый критерий Дункана показывает, что по данному показателю анализируемые выборки разбиваются на 5 достоверно различающихся подмножеств. Первое подмножество представлено разновидностями *S. altissima* и *S. canadensis* var. *canadensis*. Средние значения в данной группе колеблются от 80,1 см для *S. altissima* var. *gilvocanescens* до 93,0 см у *S. altissima* var. *pluricephala*. В состав второго подмножества, полностью пересекающегося с первым и третьим, входят *S. canadensis* var. *canadensis*, *S. altissima* var. *pluricephala* и pop_5. Третье подмножество включает pop_5, pop_2, pop_4 и *S. canadensis* var. *hargeri*. Средние значения в этой группе колеблются от 102,40 см у pop_5 до 110,5 см у *S. canadensis* var. *hargeri*. Четвертое и пятое подмножества образованы pop_1 (средняя высота стебля 132,13 см) и pop_3 (средняя высота стебля 154,93 см) соответственно. Как видно из представленных данных, белорусские популяции золотарников имеют более высокие средние значения высоты стебля по сравнению с североамериканскими таксонами. Эта же особенность была отмечена Е. Вебером при изучении 23 европейских популяций [7]. Однако анализ диапазона варьирования данного признака показывает, что в целом наблюдаемая разница формируется в первую очередь за счет уменьшения диапазона варьирования высоты, а также за счет больших минимальных значений данного признака у белорусских растений по сравнению с североамериканскими. Максимальная высота при этом у североамериканских и белорусских растений различается не столь сильно.

Длина среднего стеблевого листа (MLFLN). По данному показателю в соответствии с ранговым критерием Дункана анализируемые выборки разбиваются на 5 частично пересекающихся подмножеств. Первое подмножество представлено разновидностями *S. altissima* и *S. canadensis* var. *canadensis*. Средние значения в этой группе колеблются от 62,6 мм для *S. altissima* var. *gilvocanescens* до 74,1 мм у *S. altissima* var. *altissima*. В состав второго подмножества входят pop_2, *S. canadensis* var. *hargeri*, pop_4, pop_1 и pop_3. Средние величины варьируют от 87,54 мм у pop_2 до 103,76 мм у pop_3. В состав третьего подмножества входит только pop_5 со средним значением 122,33 мм. Как видно из представленных результатов, белорусские популяции золотарников в целом имеют значительно более длинные средние стеблевые листья, что согласуется с данными Е. Вебера для центральноевропейских популяций (в среднем $(126,0 \pm 23,2)$ мм с диапазоном варьирования 65–207 мм).

Ширина среднего стеблевого листа (MLFLW). Ранговый критерий Дункана показывает, что по указанному показателю анализируемые выборки разбиваются на 4 подмножества. Первое подмножество представлено *S. canadensis* var. *canadensis*, которая имеет самые узкие средние стеблевые листья (средняя ширина 8,4 мм при размахе варьирования 3,4–12,2 мм) и по этому показателю достоверно отличается от других анализируемых групп. В состав второго подмножества входят все остальные североамериканские таксоны, а также pop_1 и pop_2. Средние значения в данной группе колеблются от 11,0 мм у *S. altissima* var. *altissima* до 13,3 мм у *S. canadensis* var. *hargeri*. Третье подмножество включает pop_4 и pop_3 со

средними величинами признака 14,19 и 14,90 мм соответственно. В состав четвертого подмножества входит только *por_5* со средним значением 19,90 мм. Таким образом, белорусские популяции золотарников по этому признаку либо не отличаются от *S. altissima* L. и *S. canadensis* var. *hargeri*, либо имеют еще более широкие листья. Популяций с узкими листьями, которые характерны для *S. canadensis* var. *canadensis*, нами обнаружено не было. Для центральноевропейских популяций также характерны очень широкие листья ($(19,0 \pm 4,2)$ мм при диапазоне варьирования от 8 до 35 мм) [7].

Число зубцов с одной стороны среднего стеблевого листа (MLFSERNUM). По этому показателю исследуемые выборки разбиваются на 3 подмножества. Первое подмножество представлено только *por_3*, которая имеет наименее зубчатые листья (в среднем 3,43 зубца при диапазоне варьирования 0–8 зубцов). Во второе подмножество вошли все разновидности *S. altissima*, *S. canadensis* var. *canadensis*, а также *por_5* и *por_4*. Их средние значения варьируют от 5,9 зубца у *S. altissima* var. *gilvocanescens* до 7,22 зубца у *por_4*. Третье подмножество, слабо отграниченное от второго, образуют разновидности *S. canadensis*, а также *por_4*, *por_1* и *por_2*. Диапазон варьирования в этом подмножестве – от 7,0 зубца у *S. canadensis* var. *canadensis* до 8,7 зубца у *S. canadensis* var. *hargeri*.

Длина верхнего стеблевого листа (ULFLN). По данному показателю в соответствии с ранговым критерием Дункана исследуемые выборки разбиваются на 4 подмножества. Первое подмножество представлено североамериканскими таксонами. Средние значения в данной группе колеблются от 41,7 мм для *S. altissima* var. *gilvocanescens* до 49,8 мм у *S. canadensis* var. *hargeri*. В состав второго подмножества входят *por_2* и *por_5* со средними величинами 58,92 и 63,67 мм соответственно. Третье подмножество, частично пересекающееся со вторым, включает *por_5*, *por_1* и *por_4*. Средние значения в данной группе колеблются от 63,67 мм у *por_5* до 69,04 мм у *por_4*. В состав четвертого подмножества входит только *por_3* со средним значением 79,95 мм. Как видно из представленных данных, белорусские популяции золотарников имеют значительно более длинные верхние стеблевые листья и достоверно отличаются по этому признаку от североамериканских таксонов.

Ширина верхнего стеблевого листа (ULFW). По рассматриваемому признаку исследуемые выборки разбиваются на 7 подмножеств. Первое подмножество представлено *S. canadensis* var. *canadensis* (5,7 мм). Во второе подмножество вошли остальные североамериканские таксоны. Средние значения в данной группе колеблются от 7,2 мм у *S. altissima* var. *altissima* до 8,4 мм у *S. altissima* var. *gilvocanescens*. Третье подмножество представлено *S. altissima* var. *gilvocanescens* и *por_2* и является связующим между североамериканскими таксонами и белорусскими популяциями. Подмножества с четвертого по седьмое представлены белорусскими популяциями и последовательно связаны друг с другом. Их средние значения колеблются от 9,38 мм у *por_2* до 12,43 мм у *por_3*. Так же как и для предыдущего признака, белорусские популяции имеют большую ширину верхнего стеблевого листа и достоверно отличаются от большинства североамериканских таксонов (особенно от *S. canadensis* var. *canadensis*).

Число зубцов с одной стороны верхнего стеблевого листа (ULFSERNUM). Признак ранее считался одним из видоспецифичных при разграничении *S. canadensis* и *S. altissima* [1]. При этом для *S. canadensis* указываются сильно зубчатые верхние стеблевые листья, а у *S. altissima* – от слабозубчатых до цельнокрайных. В то же время приведенные в более поздней работе [7] данные показывают, что по указанному признаку отсутствуют достоверные различия между североамериканскими таксонами этой группы (за исключением *S. altissima* var. *altissima*, которая достоверно отличается от остальных разновидностей *S. altissima* и от *S. canadensis* var. *hargeri*). Белорусские растения по рассматриваемому признаку варьируют от очень сильно зубчатых (средние значения – 4,42 зубца у *por_2* и 5,17 зубца у *por_1*) до почти цельнокрайных (в среднем 1,33 зубца на лист в *por_3* и 2,26 зубца у *por_5*). Такое постепенное изменение значения признака обеспечивает формирование континуума, при котором крайние значения достоверно различаются между собой, однако связаны серией промежуточных вариантов.

Длина соцветия от места отхождения нижней ветви до верхушки (CAPL). По данному показателю в соответствии с ранговым критерием Дункана анализируемые выборки разбиваются на 4 частично пересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено *S. canadensis* var. *canadensis*, которая имеет самые короткие соцветия (12,7 см). Второе подмножество включает остальные североамериканские таксоны, а также *por_2* и *por_4* (средние значения – от 17,2 см у *S. altissima* var. *gilvocanescens* до 22,04 см у *por_4*). Третье подмножество, частично пересекающееся со вторым, включает *por_2*, *por_4* и *por_5* (20,06; 22,04 и 23,67 см соответственно). Четвертое подмножество представлено *por_1* и *por_3* (27,32 и 29,88 см соответственно). Как видно, белорусские популяции золотарников в целом имеют более длинные соцветия по сравнению с североамериканскими таксонами, что согласуется с данными из [7].

Ширина соцветия (CAPW). По этому признаку исследуемые выборки разбиваются на 4 связанных подмножества, которые сильно пересекаются друг с другом. Первое подмножество включает североамериканские таксоны (за исключением *S. canadensis* var. *hargeri*). Средние значения в данной группе

колеблются от 9,2 см у *S. canadensis* var. *canadensis* до 12,6 см у *S. altissima* var. *altissima*. Второе подмножество, сильно пересекающееся с первым, представлено *S. altissima* var. *pluricephala*, *S. altissima* var. *gilvocanescens*, *S. altissima* var. *altissima*, *por_3* и *por_2*. Средние значения в группе колеблются от 11,1 см у *S. altissima* var. *pluricephala* до 14,38 см у *por_2*. Третье подмножество, сильно пересекающееся со вторым и частично с первым, включает *S. altissima* var. *altissima*, *por_3*, *por_2*, *por_5*, *por_4* и *S. canadensis* var. *hargeri*. Средние значения колеблются от 12,6 см у *S. altissima* var. *altissima* до 16,0 см у *S. canadensis* var. *hargeri*. Четвертое подмножество содержит только *por_1*, имеющую самые широкие соцветия (19,18 см). Так же как и для предыдущего признака, белорусские популяции в целом имеют более высокие значения ширины соцветия по сравнению с североамериканскими таксонами (за исключением *S. canadensis* var. *hargeri*). Согласно Е. Веберу [7], центральноевропейские популяции в среднем обладают еще более широкими соцветиями ((22 ± 8) см с размахом варьирования 3–54 см).

Высота обертки от основания до верхушки самых длинных листочков обертки (INVOLHT). Признак является одним из видоспецифичных и позволяет надежно разграничить *S. canadensis* и *S. altissima* [14]. По данному признаку исследуемые выборки разбиваются на 6 подмножеств, частично связанных между собой. Первое подмножество включает *S. canadensis* var. *canadensis* и *por_3*, имеющие обертки в 2,10 и 2,34 мм соответственно. Второе подмножество, пересекающееся с первым, представлено *por_3*, *S. canadensis* var. *hargeri* и *por_4* (2,34; 2,40 и 2,52 мм соответственно). В третье подмножество, пересекающееся со вторым, входят *S. canadensis* var. *hargeri*, *por_4*, *por_2* и *por_1*. Средние значения в данной группе колеблются от 2,4 мм у *S. canadensis* var. *hargeri* до 2,61 мм у *por_1*. Четвертое подмножество содержит только *S. altissima* var. *gilvocanescens* с обертками 2,9 мм высотой. Пятое подмножество включает *por_5* с обертками в 3,07 мм. Шестое подмножество с самыми крупными обертками содержит *S. altissima* var. *altissima* и *S. altissima* var. *pluricephala* (по 3,5 мм). Как видно из представленных данных, большинство белорусских популяций золотарников имеют обертки, по размерам занимающие промежуточное положение между типичными *S. canadensis* и *S. altissima*. Такая же картина изменчивости характерна и для центральноевропейских популяций (средняя высота корзинки – $(2,9 \pm 0,25)$ мм с размахом варьирования 2,3–3,5 мм).

Длина наружных листочков обертки (OPHYLL). По данному признаку исследуемые выборки разбиваются на 2 практически полностью пересекающихся подмножества. Достоверные различия отмечены только между *S. canadensis* var. *hargeri* и *por_5* (длина наружных листочков обертки 1,06 и 1,09 мм соответственно), с одной стороны, и *S. altissima* var. *altissima* и *por_4* (1,2 и 1,23 мм соответственно) – с другой.

Длина внутренних листочков обертки (IPHYLL). Признак является одним из видоспецифичных при разграничении типовых разновидностей *S. canadensis* и *S. altissima* [14]. По этому признаку исследуемые выборки разбиваются на 2 непересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено разновидностями *S. canadensis*, *por_1* – *por_4* и *S. altissima* var. *gilvocanescens*. Средние значения в данной группе колеблются от 1,8 мм у *S. canadensis* var. *canadensis* до 2,1 мм у *S. altissima* var. *gilvocanescens*. В состав второго подмножества входят *S. altissima* var. *altissima*, *S. altissima* var. *pluricephala* (средние значения признака – по 2,6 мм) и *por_5* (2,65 мм).

Число ложноязычковых цветков в корзинке (RAYNUM). По данному признаку исследуемые выборки разбиваются на 3 частично пересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено североамериканскими таксонами. Средние значения в данной группе колеблются от 7,6 цветка у *S. altissima* var. *pluricephala* до 9,7 цветка у *S. altissima* var. *altissima*. В состав второго подмножества входят *S. altissima* var. *altissima*, *por_2* (в среднем 9,8 цветка) и *por_3* (в среднем 11,00 цветка). Третье подмножество включает исключительно белорусские выборки (в среднем от 11,00 цветка у *por_3* до 11,62 цветка у *por_5*). Как видно из представленных данных, белорусские популяции золотарников имеют большее количество ложноязычковых цветков в корзинке по сравнению с североамериканскими таксонами, причем существенно различаются не только средние величины признака, но и его диапазон варьирования. Так, минимальные значения у североамериканских таксонов варьируют от 2 ложноязычковых цветков в корзинке у *S. altissima* var. *pluricephala* до 6 цветков у *S. canadensis* var. *canadensis*, максимальные – от 11,8 цветка у *S. altissima* var. *pluricephala* и *S. altissima* var. *gilvocanescens* до 13,8 цветка у *S. altissima* var. *pluricephala*. В белорусских популяциях минимальное число варьирует от 6 цветков в *por_2* до 8 цветков в *por_3*, *por_4* и *por_5*. Диапазон варьирования максимального значения признака – от 14 цветков в *por_1* и *por_2* до 17 цветков в *por_4*. В центральноевропейских популяциях наблюдается такая же картина: среднее число ложноязычковых цветков $10,4 \pm 1,66$ с диапазоном варьирования 5–15 цветков [7].

Длина отгиба ложноязычкового цветка (RSTRAPL). По рассматриваемому признаку исследуемые выборки разбиваются на 6 частично пересекающихся подмножеств. Первое подмножество представлено *por_1* (длина отгиба 0,76 мм). Второе подмножество содержит разновидности *S. canadensis*

(0,87 мм у *var. canadensis* и 0,9 мм у *var. hargeri*). В третье подмножество входят оставшиеся белорусские выборки: длина отгиба в среднем от 1,07 мм у *por_4* до 1,12 мм у *por_5*. Четвертое подмножество практически полностью пересекается с третьим и отличается от него отсутствием *por_4* и наличием *S. altissima var. gilvocanescens* (длина отгиба 1,2 мм). Пятое и шестое подмножества включают разновидности *S. altissima* (*var. gilvocanescens* и *var. altissima* в пятом подмножестве; *var. altissima* и *var. pluricephala* с длиной отгиба 1,3 и 1,4 мм соответственно в шестом подмножестве). Как видно из представленных данных, белорусские популяции золотарников имеют отгиб ложноязычковых цветков либо достоверно более короткий по сравнению с *S. canadensis*, либо промежуточный по длине между *S. canadensis* и *S. altissima* и при этом достоверно отличающийся от североамериканских таксонов.

Ширина отгиба ложноязычкового цветка (RSTRAPW). По указанному признаку исследуемые выборки разбиваются на 4 частично пересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено *por_3*, *por_1*, *por_2* и *S. canadensis var. canadensis*. Средние значения в данной группе колеблются от 0,18 мм у *por_3* до 0,19 мм у *por_1* и *por_2*. Второе подмножество включает *por_4*, *S. canadensis var. hargeri*, *S. altissima var. pluricephala* и *por_5*. Средние значения в этой группе изменяются от 0,23 мм у *por_4* до 0,27 мм у *S. altissima var. pluricephala* и *por_5*. Третье подмножество представлено *S. canadensis var. hargeri*, *S. altissima var. altissima*, *por_5*, *S. altissima var. pluricephala* и полностью пересекается со вторым и четвертым подмножествами. Четвертое подмножество включает *S. altissima var. pluricephala* и *S. altissima var. gilvocanescens* со средними значениями 0,29 и 0,31 мм соответственно. Таким образом, белорусские популяции золотарников по рассматриваемому признаку либо неотличимы от *S. canadensis var. canadensis*, либо близки к *S. canadensis var. hargeri* и *S. altissima var. altissima*.

Длина завязи ложноязычковых цветков (RACHBL). По данному признаку все изученные выборки достоверно не отличаются друг от друга.

Длина хохолка ложноязычковых цветков (RPAPL). По этому признаку исследованные выборки разделяются на 4 непересекающихся подмножества. Первое подмножество включает *S. canadensis var. canadensis*, *por_3*, *S. canadensis var. hargeri*, *por_1* и *por_4*. Средние значения в данной группе колеблются от 1,6 мм у *S. canadensis var. canadensis* до 1,75 мм у *por_4*. Второе подмножество представлено *por_2* и *por_5* со средними значениями 1,94 и 1,97 мм соответственно. Третье подмножество содержит только *S. altissima var. gilvocanescens* со средним значением 2,4 мм. В четвертое подмножество входят *S. altissima var. altissima* и *S. altissima var. pluricephala* со средними значениями признака 2,8 и 2,9 мм соответственно. Как видно, белорусские популяции золотарников по данному признаку либо близки к *S. canadensis*, либо занимают промежуточное положение между этим таксоном и *S. altissima*.

Число трубчатых цветков в корзинке (DISCNUM). По рассматриваемому признаку исследуемые выборки разделяются на 2 непересекающихся подмножества. Первое подмножество включает все североамериканские таксоны, а также *por_1* – *por_4*. Средние значения в этой группе колеблются от 3,9 шт. у *S. canadensis var. hargeri* до 4,7 шт. у *S. altissima var. gilvocanescens*. Второе подмножество включает только *por_5* со средним значением 5,71 трубчатого цветка в корзинке.

Длина околоцветника трубчатого цветка (DCORL). Признак является одним из видоспецифичных для разграничения *S. canadensis* и *S. altissima* [14]. По этому признаку исследуемые выборки разбиваются на 4 частично пересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено *S. canadensis var. canadensis*, *por_4*, *S. canadensis var. hargeri*, *por_3*, *por_1* и *por_2*. Средние значения в данной группе колеблются от 2,3 мм у *S. canadensis var. canadensis* до 2,57 мм у *por_2*. Второе подмножество практически полностью пересекается с первым и отличается от него отсутствием *S. canadensis var. canadensis* и наличием *por_5* (длина трубчатого цветка 2,70 мм). Третье подмножество включает только *S. altissima var. gilvocanescens* со средним значением 3,1 мм. В состав четвертого подмножества входят остальные разновидности *S. altissima* (3,7 мм у *var. altissima* и 3,9 мм у *var. pluricephala*). Как видно из представленных данных, растения белорусских популяций по рассматриваемому признаку занимают промежуточное положение между *S. canadensis* и *S. altissima*, в большей степени уклоняясь в сторону *S. canadensis*. Стоит отметить, что, согласно Е. Веберу [7], центральноевропейские популяции по этому признаку еще более близки к *S. altissima* ($(3,6 \pm 0,33)$ мм с диапазоном варьирования 2,6–4,8 мм).

Длина зубцов трубчатого цветка (DLOBL). Признак является одним из видоспецифичных для разграничения *S. canadensis* и *S. altissima* [14]. По указанному признаку все изученные выборки разбиваются на 4 частично пересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено *S. canadensis var. canadensis*, которая имеет самые короткие зубцы трубчатых цветков (в среднем 0,53 мм). В состав второго подмножества входят *por_1*, *S. canadensis var. hargeri*, *por_2*, *por_4* и *por_3* (средние значения – от 0,64 мм у *por_1* до 0,74 мм у *por_3*). Третье подмножество, пересекающееся со вторым и четвертым, включает *por_2*, *por_4*, *por_3*, *S. altissima var. altissima*, *por_5* и *S. altissima var. pluricephala* (средние значения – от 0,74 мм у *por_2* до 0,83 мм у *S. altissima var. pluricephala*). Четвертое подмножество содержит разновидности *S. altissima* и *por_5*. Средняя длина зубцов трубчатого цветка в данной группе

колеблется от 0,77 мм у *S. altissima* var. *altissima* до 0,85 мм у *S. altissima* var. *gilvocanescens*. Таким образом, по данному признаку белорусские популяции достоверно отличаются от *S. canadensis* var. *canadensis* и близки к *S. altissima*, достоверно не отличаясь от *S. altissima* var. *altissima* и *S. altissima* var. *pluricephala*.

Длина завязи трубчатого цветка (DACHBL). По этому признаку исследуемые выборки разбиваются на 3 существенно пересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено pop_2, pop_1, pop_3, *S. canadensis* var. *hageri*, *S. altissima* var. *gilvocanescens*, *S. altissima* var. *altissima* и *S. canadensis* var. *canadensis*. Средние значения признака в данной группе колеблются от 0,62 мм у pop_2 до 0,74 мм у *S. canadensis* var. *canadensis*. Второе подмножество включает pop_1, pop_3, все североамериканские таксоны, а также pop_4, *S. gilvocanescens*, *S. altissima* var. *altissima* и *S. canadensis* var. *canadensis*. Средние значения признака колеблются от 0,66 мм у pop_1 до 0,77 мм у pop_4. Третье подмножество представлено разновидностями *S. altissima*, *S. canadensis* (var. *canadensis* и var. *pluricephala*), pop_4 и pop_5. Средняя длина завязи трубчатого цветка колеблется от 0,72 мм у *S. altissima* var. *gilvocanescens* до 0,80 мм у pop_5. Как видно из представленных данных, растения белорусских популяций по указанному признаку занимают крайние положения по отношению к *S. canadensis* и *S. altissima*, имея либо слишком мелкие, либо слишком крупные завязи, хотя и в одном, и в другом случае достоверно не отличаются от североамериканских таксонов. Анализ диапазонов варьирования этого признака в белорусских и североамериканских выборках также свидетельствует о их сходстве.

Длина хохолка трубчатого цветка (DPAPL). Признак является одним из видоспецифичных для разграничения *S. canadensis* и *S. altissima* [14]. По рассматриваемому признаку исследуемые выборки разбиваются на 4 частично пересекающихся подмножества. Первое подмножество представлено *S. canadensis* var. *hageri*, pop_3, *S. canadensis* var. *canadensis*, pop_4 и pop_1. Средние значения в данной группе колеблются от 1,79 мм у *S. canadensis* var. *hageri* до 1,99 мм у pop_1. Второе подмножество частично пересекается с первым и содержит белорусские популяции (pop_4, pop_1, pop_5 и pop_2). Средние величины в группе варьируют от 1,92 мм у pop_4 до 2,17 мм у pop_2. Третье и четвертое подмножества, включающие только разновидности *S. altissima*, не пересекаются со вторым подмножеством, но частично пересекаются между собой. Средние значения в них колеблются от 2,6 мм у var. *gilvocanescens* до 3,3 мм у var. *pluricephala*. *S. altissima* var. *altissima* с длиной хохолка трубчатых цветков, в среднем равной 3,0 мм, занимает промежуточное положение и входит в состав как третьего, так и четвертого подмножества. Исходя из представленных результатов, можно заключить, что растения белорусских популяций по данному признаку занимают промежуточное положение между *S. canadensis* и *S. altissima*, в большей степени уклоняясь в сторону *S. canadensis*.

Проведенный анализ изменчивости морфологических признаков растений золотарника в популяциях, произрастающих в окрестностях г. Минска, показал их значительный полиморфизм. Сравнение морфологических показателей белорусских растений с данными по изменчивости североамериканских видов *S. canadensis* L. и *S. altissima* L. свидетельствует о том, что обитающие на территории Беларуси растения совмещают в себе признаки как одного, так и другого вида. Так, от *S. altissima* L. все белорусские популяции не отличались по таким видоспецифичным признакам, как ширина среднего стеблевого листа, ширина верхнего стеблевого листа, длина внутренних листочков обертки, а значительная их часть – по длине соцветия от места отхождения нижней ветви до верхушки и его ширине. Признаками, общими для произрастающих в нашей стране популяций и *S. canadensis* L., являются ширина отгиба ложноязычкового цветка, длина хохолка трубчатого цветка и (частично) длина трубчатого цветка.

Помимо сходства с *S. canadensis* и *S. altissima*, нами были выявлены значительные отличия белорусских золотарников как от одного, так и от другого вида. Так, растения, обитающие в г. Минске, по сравнению с североамериканскими имеют существенно более мощный габитус (большая средняя высота растения, более длинные и во многих популяциях более широкие средние стеблевые листья, чаще всего более крупное соцветие), промежуточные и достоверно отличающиеся от обоих североамериканских видов длины корзинки и трубчатых цветков. У белорусских растений значительно длиннее наружные листочки обертки, короче отгибы ложноязычковых цветков, крупнее завязи ложноязычковых цветков, но короче их хохолки, намного меньшее число трубчатых цветков в корзинке. Трубчатые цветки в корзинке имеют существенно более крупные зубцы по сравнению с таковыми у *S. canadensis* s. str. и *S. altissima* s. str.

Таким образом, произрастающие на территории Республики Беларусь популяции, традиционно относимые к *S. canadensis* или *S. altissima*, по совокупности морфологических признаков не могут быть отнесены ни к одному, ни к другому североамериканскому виду. Это подтверждает точку зрения Х. Шольца [11], согласно которой инвазивные золотарники, широко распространяющиеся в настоящее время по

всей территории Европы, имеют европейское происхождение. При этом высокоустойчивые формы, которые в дальнейшем стали распространяться самостоятельно, вероятнее всего, либо являются стабилизированными гибридами, образовавшимися в результате селекции благодаря скрещиванию нескольких североамериканских видов, либо возникли в ходе спонтанного мутационного процесса и дальнейшего отбора в природных условиях.

Заключение

Вопросы более высокой инвазивности гибридов, по сравнению с родительскими видами, давно обсуждаются учеными (см., например, [17–22]). В настоящее время накоплена обширная информация о большей инвазивной активности гибридов различных рангов по сравнению с родительскими таксонами. Так, инвазионные популяции печально известного борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) представляют собой сорта, либо отселектированные из исходного вида, например Успех и Северянин [23], либо полученные в результате межвидовой гибридизации [24–26]. Гибридное происхождение имеют большинство инвазивных таксонов рода *Helianthus* [27–29]. Изучение видов рода *Tamarix*, проведенное в США и Канаде, показало, что *T. chinensis* и *T. ramosissima*, которые, как предполагалось ранее, являются наиболее широко распространенными инвазивными видами этого рода в Северной Америке, на самом деле имеют ограниченное распространение, а роль основного инвайдера выполняет их гибрид [30]. Изучение инвазии *Myriophyllum spicatum* L. в Северной Америке также показало, что спонтанный гибрид, образовавшийся в результате гибридизации с аборигенным *M. sibiricum* Kom., имеет гораздо более высокую степень инвазивности [31; 32]. Все это, а также достоверно подтвержденное наличие морфологических различий между *Solidago canadensis* в пределах его естественного ареала и европейскими популяциями позволяют нам рассматривать европейские высокоинвазивные растения золотарников из группы *S. canadensis* s. l. в качестве самостоятельного таксона, в настоящее время практически не взаимодействующего с родительским видом. Необходимо дальнейшее изучение изменчивости данной группы не только на морфологическом, но и на молекулярно-генетическом уровне для определения таксономического статуса европейских популяций, их происхождения и степени обособленности от североамериканского *S. canadensis* s. str.

Библиографические ссылки

1. Semple JC, Cook RE. *Solidago* Linnaeus. In: *Flora of North America Editorial Committee. Flora of North America. Volume 20, Magnoliophyta: Asteridae. Part 2, Asterales and Seneciales*. New York: Oxford University Press; 2006. p. 107–166.
2. Weber E. The dynamics of plant invasions: a case study of three exotic goldenrod species (*Solidago* L.) in Europe. *Journal of Biogeography*. 1998;25(1):147–154. DOI: 10.1046/j.1365-2699.1998.251119.x.
3. Kurtto A, Helynranta L. *Helsingin kasvit. Kukkivilta kiviltä metsän syliin*. Helsinki: City of Helsinki Environment Centre and Helsinki University Press; 1998. 400 p.
4. Kowarik I. *Biologische invasionen: Neophyten und neozoen in mitteleuropa*. Stuttgart: Ulmer; 2003.
5. Виноградова ЮК, Майоров СР, Хорун ЛВ. Черная книга флоры Средней России. Чужеродные виды растений в экосистемах Средней России. Москва: ГЕОС; 2010. 505 с.
6. Дубовик ДВ, Саулов АО. Североамериканские виды рода *Solidago* L. (Asteraceae) во флоре Беларуси. В: Парфенов ВИ, Ламан НА, редакторы. *Ботаника (исследования). Выпуск 46*. Минск: Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси; 2017. с. 18–26.
7. Weber E. Morphological variation of the introduced perennial *Solidago canadensis* L. *sensu lato* (Asteraceae) in Europe. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1997;123(3):197–210. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1997.tb01413.x.
8. Weber E. Biological flora of Central Europe: *Solidago altissima* L. *Flora*. 2000;195(2):123–134. DOI: 10.1016/S0367-2530(17)30960-X.
9. Verloove F, Zonneveld BJM, Semple JC. First evidence for the presence of invasive *Solidago altissima* (Asteraceae) in Europe. *Willdenowia*. 2017;47(1):69–75. DOI: 10.3372/wi.47.47107.
10. Burrows RL. Goldenrod: Plants with Multipurpose potential. *HortTechnology*. 2002;12(4):711–716. DOI: 10.21273/HORTTECH.12.4.711.
11. Scholz H. Eine unbeschriebene anthropogene Goldrute (*Solidago*) aus Mitteleuropa. *Floristische Rundbriefe*. 1993;27(1):7–12.
12. Weber E, Schmid B. Latitudinal population differentiation in two species of *Solidago* (Asteraceae) introduced into Europe. *American Journal of Botany*. 1998;85(8):1110–1121. DOI: 10.2307/2446344.
13. Stoll P, Egli P, Schmid B. Plant foraging and rhizome growth patterns of *Solidago altissima* in response to mowing and fertilizer application. *Journal of Ecology*. 1998;86(2):341–354. DOI: 10.1046/j.1365-2745.1998.00263.x.
14. Semple JC, Rahman H, Bvosky S, Sorour MK, Kornobis K, Laphitz RL, et al. A multivariate morphometric study of the *Solidago altissima* complex and *S. canadensis* (Asteraceae: Asterales). *Phytoneuron*. 2015;10:1–31.
15. Duncan DB. Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*. 1955;11(1):1–42. DOI: 10.2307/3001478.
16. Saville DJ. Multiple Comparison Procedures: The Practical Solution. *The American Statistician*. 1990;44(2):174–180. DOI: 10.1080/00031305.1990.10475712.
17. Gray AJ. Do invading species have definable genetic characteristics? Philosophical. *Transactions of the Royal Society. B: Biological Sciences*. 1986;314(1167):655–672. DOI: 10.1098/rstb.1986.0079.

18. Arnold ML, Hodges SA. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution*. 1995;10(2): 67–71. DOI: 10.1016/S0169-5347(00)88979-X.
19. Whitham TG, Martinsen GD, Keim P, Floate KD, Dungey HS, Potts BM. Plant hybrid zones affect biodiversity: tools for a genetic-based understanding of community structure. *Ecology*. 1999;80(2):416–428. DOI: 10.1890/0012-9658(1999)080[0416:PHZA-BT]2.0.CO;2.
20. Ellstrand NC, Schierenbeck KA. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(13):7043–7050. DOI: 10.1073/pnas.97.13.7043.
21. Vilà M, Weber E, Antonio CMD. Conservation Implications of Invasion by Plant Hybridization. *Biological Invasions*. 2000; 2(3):207–217. DOI: 10.1023/A:1010003603310.
22. Prentis PJ, Wilson JR, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ. Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*. 2008;13(6):288–294. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.03.004.
23. Лунева НН, Конечная ГЮ, Смекалова ТН, Чухина ИГ. О статусе вида борщевик Сосновского *Heracleum sosnowskyi* Manden. на территории РФ. *Вестник защиты растений*. 2018;3(97):10–15.
24. Сацыперова ИФ. *Борщевик флоры СССР – новые кормовые растения: Перспективы использования в народном хозяйстве*. Ленинград: Наука; 1984. 223 с.
25. Демидов НМ, Сацыперова ИФ. Основные итоги селекционной работы с видами *Heracleum* L. *Растительные ресурсы*. 1989;25(4):504–512.
26. Jahodová Š, Trybush S, Pyšek P, Wade M, Karp A. Invasive species of *Heracleum* in Europe: an insight into genetic relationships and invasion history. *Diversity and Distributions*. 2007;13(1):99–114. DOI: 10.1111/j.1366-9516.2006.00305.x.
27. Rieseberg LH, Kim S-C, Randall RA, Whitney KD, Gross BL, Lexer C, et al. Hybridization and the colonization of novel habitats by annual sunflowers. *Genetica*. 2007;129(2):149–165. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9011-y>.
28. Bock DG, Kane NC, Ebert DP, Rieseberg LH. Genome skimming reveals the origin of the Jerusalem Artichoke tuber crop species: neither from Jerusalem nor an artichoke. *New Phytologist*. 2014;201(3):1021–1030. DOI: 10.1111/nph.12560.
29. Breton C, Киру СД, Bervillé A, Анушкевич НЮ. Селекция топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) для нетрадиционного использования: ретроспектива, подходы и перспективы (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(5):940–951. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.940rus.
30. Gaskin JF, Schaal BA. Hybrid *Tamarix* widespread in U. S. invasion and undetected in native Asian range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(17):11256–11259. DOI: 10.1073/pnas.132403299.
31. Moody ML, Les DH. Geographic distribution and genotypic composition of invasive hybrid watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* × *M. sibiricum*) populations in North America. *Biological Invasions*. 2007;9(5):559–570. DOI: 10.1007/s10530-006-9058-9.
32. Grafe SF, Boutin C, Pick FR, Bull RD. A PCR-RFLP method to detect hybridization between the invasive Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) and the native northern watermilfoil (*Myriophyllum sibiricum*), and its application in Ontario lakes. *Botany*. 2015;93(2):117–121. DOI: 10.1139/cjb-2014-0135.

References

1. Semple JC, Cook RE. *Solidago* Linnaeus. In: *Flora of North America Editorial Committee. Flora of North America. Volume 20, Magnoliophyta: Asteridae. Part 2, Asterales and Seneciales*. New York: Oxford University Press; 2006. p. 107–166.
2. Weber E. The dynamics of plant invasions: a case study of three exotic goldenrod species (*Solidago* L.) in Europe. *Journal of Biogeography*. 1998;25(1):147–154. DOI: 10.1046/j.1365-2699.1998.251119.x.
3. Kurto A, Helyntanta L. *Helsingin kasvit. Kukkilta kiviltä metsän syliin*. Helsinki: City of Helsinki Environment Centre and Helsinki University Press; 1998. 400 p.
4. Kowarik I. *Biologische invasjonen: Neophyten und neozoen in mitteleuropa*. Stuttgart: Ulmer; 2003.
5. Vinogradova YU, Mayorov SR, Khorun LV. *Chernaya kniga flory Srednei Rossii. Chuzherodnye vidy rastenii v ekosistemakh Srednei Rossii* [Black book of flora of Central Russia. Alien plants in ecosystems of Central Russia]. Moscow: GEOS; 2010. 505 p. Russian.
6. Dubovik DV, Saulov AO. [North American species of the genus *Solidago* L. (Asteraceae) in the flora of Belarus]. In: Parfenov VI, Laman NA, editors. *Botanika (issledovaniya). Vypusk 46* [Botany (research). Issue 46]. Minsk: Institut eksperimental'noi botaniki NAN Belarusi; 2017. p. 18–26. Russian.
7. Weber E. Morphological variation of the introduced perennial *Solidago canadensis* L. *sensu lato* (Asteraceae) in Europe. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1997;123(3):197–210. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1997.tb01413.x.
8. Weber E. Biological flora of Central Europe: *Solidago altissima* L. *Flora*. 2000;195(2):123–134. DOI: 10.1016/S0367-2530(17)30960-X.
9. Verloove F, Zonneveld BJM, Semple JC. First evidence for the presence of invasive *Solidago altissima* (Asteraceae) in Europe. *Willdenowia*. 2017;47(1):69–75. DOI: 10.3372/wi.47.47107.
10. Burrows RL. Goldenrod: Plants with Multipurpose potential. *HortTechnology*. 2002;12(4):711–716. DOI: 10.21273/HORTTECH.12.4.711.
11. Scholz H. Eine unbeschriebene anthropogene Goldrute (*Solidago*) aus Mitteleuropa. *Floristische Rundbriefe*. 1993;27(1):7–12.
12. Weber E, Schmid B. Latitudinal population differentiation in two species of *Solidago* (Asteraceae) introduced into Europe. *American Journal of Botany*. 1998;85(8):1110–1121. DOI: 10.2307/2446344.
13. Stoll P, Egli P, Schmid B. Plant foraging and rhizome growth patterns of *Solidago altissima* in response to mowing and fertilizer application. *Journal of Ecology*. 1998;86(2):341–354. DOI: 10.1046/j.1365-2745.1998.00263.x.
14. Semple JC, Rahman H, Bvosky S, Sorour MK, Kornobis K, Laphitz RL, et al. A multivariate morphometric study of the *Solidago altissima* complex and *S. canadensis* (Asteraceae: Astereae). *Phytoneuron*. 2015;10:1–31.
15. Duncan DB. Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*. 1955;11(1):1–42. DOI: 10.2307/3001478.
16. Saville DJ. Multiple Comparison Procedures: The Practical Solution. *The American Statistician*. 1990;44(2):174–180. DOI: 10.1080/00031305.1990.10475712.
17. Gray AJ. Do invading species have definable genetic characteristics? *Philosophical Transactions of the Royal Society. B: Biological Sciences*. 1986;314(1167):655–672. DOI: 10.1098/rstb.1986.0079.

18. Arnold ML, Hodges SA. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution*. 1995;10(2): 67–71. DOI: 10.1016/S0169-5347(00)88979-X.
19. Whitham TG, Martinsen GD, Keim P, Floate KD, Dungey HS, Potts BM. Plant hybrid zones affect biodiversity: tools for a genetic-based understanding of community structure. *Ecology*. 1999;80(2):416–428. DOI: 10.1890/0012-9658(1999)080[0416:PHZA-BT]2.0.CO;2.
20. Ellstrand NC, Schierenbeck KA. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(13):7043–7050. DOI: 10.1073/pnas.97.13.7043.
21. Vilà M, Weber E, Antonio CMD. Conservation Implications of Invasion by Plant Hybridization. *Biological Invasions*. 2000; 2(3):207–217. DOI: 10.1023/A:1010003603310.
22. Prentis PJ, Wilson JR, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ. Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*. 2008;13(6):288–294. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.03.004.
23. Luneva NN, Konechnaya GYu, Smekalova TN, Chukhina IG. [On status of *Heracleum sosnowskyi* Manden. on the territory of Russian Federation]. *Vestnik zashchity rastenii*. 2018;3(97):10–15. Russian.
24. Satzyperova IF. *Borshcheviki flory SSSR – novye kormovye rasteniya: Perspektivy ispol'zovaniya v narodnom khozyaistve* [*Heracleum* species of the USSR – new fodder plants: Prospects for use in the national economy]. Leningrad: Nauka; 1984. 223 p. Russian.
25. Demidov NM, Satzyperova IF. [Main results of breeding work with species of *Heracleum* L.]. *Rastitel'nye resursy*. 1989;25(4): 504–512. Russian.
26. Jahodová Š, Trybush S, Pyšek P, Wade M, Karp A. Invasive species of *Heracleum* in Europe: an insight into genetic relationships and invasion history. *Diversity and Distributions*. 2007;13(1):99–114. DOI: 10.1111/j.1366-9516.2006.00305.x.
27. Rieseberg LH, Kim S-C, Randell RA, Whitney KD, Gross BL, Lexer C, et al. Hybridization and the colonization of novel habitats by annual sunflowers. *Genetica*. 2007;129(2):149–165. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9011-y>.
28. Bock DG, Kane NC, Ebert DP, Rieseberg LH. Genome skimming reveals the origin of the Jerusalem Artichoke tuber crop species: neither from Jerusalem nor an artichoke. *New Phytologist*. 2014;201(3):1021–1030. DOI: 10.1111/nph.12560.
29. Breton C, Kiru SD, Bervillé A, Anushkevich NYu. [Breeding of Jerusalem artichoke with the desired traits for different directions of use: retrospective, approaches, and prospects (review)]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2017;52(5):940–951. Russian. DOI: 10.15389/agrobiol.2017.5.940rus.
30. Gaskin JF, Schaal BA. Hybrid *Tamarix* widespread in U. S. invasion and undetected in native Asian range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(17):11256–11259. DOI: 10.1073/pnas.132403299.
31. Moody ML, Les DH. Geographic distribution and genotypic composition of invasive hybrid watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* × *M. sibiricum*) populations in North America. *Biological Invasions*. 2007;9(5):559–570. DOI: 10.1007/s10530-006-9058-9.
32. Grafe SF, Boutin C, Pick FR, Bull RD. A PCR-RFLP method to detect hybridization between the invasive Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) and the native northern watermilfoil (*Myriophyllum sibiricum*), and its application in Ontario lakes. *Botany*. 2015;93(2):117–121. DOI: 10.1139/cjb-2014-0135.

Статья поступила в редколлегию 06.10.2019.
Received by editorial board 06.10.2019.

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

ECOLOGY AND CONSERVANCY

УДК 579.64

ОПТИМИЗАЦИЯ АЛЬГОФЛОРЫ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПЕСЧАНОЙ ПОЧВЫ В УСЛОВИЯХ ЕЕ ОКУЛЬТУРИВАНИЯ

Е. Е. ГАЕВСКИЙ¹⁾, Я. К. КУЛИКОВ¹⁾

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

В результате исследований таксономического состава и количественного развития на дерново-подзолистой песчаной почве разной степени оптимизации выявлено 45 видов почвенных водорослей, принадлежащих в основном к четырем отделам: Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Xanthophyta. Также отмечены единичные представители отделов Euglenophyta и Rhodophyta. Разные отделы представлены неравнозначно. Большинство обнаруженных представителей – эдафотрофные водоросли, участие гидрофильных водорослей в формировании альгогруппировок исследуемых участков незначительно (представлены одним видом – *Cosmarium undulatum* var. *minutum* Wittr.), амфибиальных водорослей не найдено. Видовой состав и спектр жизненных форм в вариантах опыта различаются. Контрольный вариант представлен наименьшим количеством видов, также в нем отсутствуют азотфиксирующие цианобактерии.

Ключевые слова: почвенные водоросли; песчаная почва; окультуривание; эколобиоморфы.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам биологического факультета БГУ: доктору биологических наук главному научному сотруднику НИЛ гидроэкологии Т. М. Михеевой и кандидату биологических наук доценту кафедры общей экологии и методики преподавания биологии Т. А. Макаревич – за консультации и помощь при определении и идентификации видовой принадлежности водорослей.

Образец цитирования:

Гаевский ЕЕ, Куликов ЯК. Оптимизация альгофлоры дерново-подзолистой песчаной почвы в условиях ее окультурирования. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:79–91.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-79-91>

For citation:

Gaevskii EE, Kulikov YK. Optimization of algaeflora of sod-podzolic sand soil in the conditions of its cultivation. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:79–91. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-79-91>

Авторы:

Евгений Евгеньевич Гаевский – старший преподаватель кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.

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

Authors:

Eugene E. Gaevskii, senior lecturer at the department of ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.

gaevskii@rambler.ru

Yaroslav K. Kulikov, doctor of science (biology), docent; professor at the department of ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.

ecodept@tut.by

OPTIMIZATION OF ALGOFLORA OF SOD-PODZOLIC SAND SOIL IN THE CONDITIONS OF ITS CULTIVATION

E. E. GAEVSKII^a, Y. K. KULIKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: E. E. Gaevskii (gaevski@rambler.ru)

As a result of studies of the taxonomic composition and quantitative development of soil algae on sod-podzolic sandy soil of varying degrees of optimization 45 species of soil algae were identified that belong mainly to four divisions: Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Xanthophyta. Also in the soil were found not numerous representatives of divisions Euglenophyta and Rhodophyta. Different departments are represented unequally. Most of the found representatives we edaphophilic algae, the participation of hydrophilic algae in the formation of algogroups at the studied sites was insignificant (represented by one species of *Cosmarium undulatum* var. *minutum* Wittr.). No amphibial algae were found. The species composition and the spectrum of life forms in different versions of the experiment varied. The control variant of the experiment was represented by the smallest number of species; there are also no nitrogen-fixing cyanobacteria in the soil.

Keywords: soil algae; sandy soil; cultivation; ecobiomorphs.

Acknowledgements. The author expresses sincere gratitude to T. M. Mikheyeva, doctor of biological sciences, chief researcher at the research laboratory of hydroecology of the Belarusian State University, and T. A. Makarevich, associate professor at the department of general ecology and methods of biology teaching, Belarusian State University for consulting and assistance in determining and identifying the algae species.

Введение

Экологические функции почв очень динамичны и обладают высокой степенью изменчивости в зависимости от свойств и состава этой важнейшей для биосферных процессов субстанции, что делает ее чрезвычайно чувствительной к влиянию хозяйственной деятельности человека. На сегодняшний день актуальна задача сохранения существующего разнообразия почвенного покрова и механизмов, поддерживающих почвенное плодородие. Основным показателем экологического состояния почв является их биологическая составляющая, и прежде всего альгофлора [1].

Антропогенно-преобразованные почвы рассматриваются как определенный этап их естественно-антропогенной эволюции, сопровождающейся генетически обусловленным изменением режимов, процессов, строения и свойств на всех стадиях преобразований. Степень антропогенных трансформаций весьма различна, затрагивает любые части профиля и зависит как от интенсивности и длительности воздействий, так и от свойств исходных почв. Классификационная оценка антропогенно-преобразованных почв не связана с целью и механизмами антропогенных воздействий и учитывает исключительно их результаты, так или иначе отраженные в профиле почв и его свойствах [2].

Среди антропогенно-преобразованных наиболее широко распространены агрогенные почвы разных стадий трансформаций. Систему горизонтов этих почв в большинстве случаев определяет наличие нового поверхностного агрогенно-преобразованного горизонта (агрогоризонта), гомогенного, сформировавшегося при долговременных регулярных механических перемещениях почвенной массы и внесении различных органических и минеральных веществ. В результате горизонт приобретает отличную от естественных почв организацию почвенной массы, характеризуется изменением вещественного состава и особыми водно-физическими, физико-химическими и биологическими показателями [3].

При длительном сельскохозяйственном использовании земель наблюдается глубокая трансформация почвенного биоценоза, проявляющаяся в снижении общей численности, биомассы и видового разнообразия водорослей [4]. Их количество в почвах зависит от условий среды, особенно от водного и солевого режимов, типа наземной растительности, а в окультуренных почвах – от агротехнических приемов [5].

При трансформации экосистем происходит агроэкологическая дифференциация альгофлоры, проявляющаяся в резком снижении разнообразия цианобактерий и изменении систематической структуры по полям севооборотов. По градиенту уменьшения интенсивности агротехнического воздействия на почву от паровых полей до посевов многолетних трав отмечается увеличение доли цианобактерий [6].

Система севооборота, удобрений и обработки почвы, изменяя стабильность и экологическую емкость местообитания, оказывает влияние на структуру и устойчивость альгоценозов почвы, а также

на количественные характеристики отдельных популяций. Формирование и функционирование альгоценозов в большей мере зависят от проективного покрытия растениями, обеспечивающего быстроту затенения поверхности почвы растущими культурами [7; 8].

После агромелиоративных приемов, в частности осушения и глубокого рыхления, формируется структура агроценозов окультуренных пахотных почв. Она сохраняется в течение длительного времени и отличается высоким видовым разнообразием водорослей, в основном за счет желтозеленых водорослей, которые являются основными показателями состояния окультуренности почв [9].

Таким образом, основными факторами, которые оказывают влияние на развитие цианобактерий и водорослей в окультуренных (агрогенно-преобразованных) почвах, являются агротехнические и агрохимические мероприятия. Особенно это актуально для дерново-подзолистых песчаных почв, отличающихся преобладанием аэробных процессов над анаэробными, высокой биологической активностью, низким содержанием органического вещества и минеральных питательных веществ, невысокой емкостью поглощения, слабой буферной способностью, а также неустойчивым водным режимом.

В этой связи целью нашей работы являлось изучение влияния землевания и торфования дерново-подзолистой песчаной почвы на структурную организацию альгофлоры.

Материалы и методы исследования

Полевой опыт был заложен в 2006 г. на базе хозяйства ОАО «ПМК-16-АГРО» около агрогородка Пересады Борисовского района Минской области на дерново-подзолистой связнопесчаной почве. Схема полевого опыта включала 5 вариантов. На делянки площадью 50 м² в четырехкратной повторности вносили суглинок из расчета 100; 200; 300 и 400 т/га, а также торфонавозный компост в дозе 200 т/га при соотношении навоза и торфа 1 : 1. Суглинок вносили с целью изменить гранулометрический состав почвы, повысить содержание в ней физической глины и превратить ее в связную супесь. Торфонавозный компост применяли не только для повышения содержания гумуса в почве, но и для активизации деятельности почвенной микробиоты. В восьмой год проведения оптимизации на полевом участке культивировалась зерновая культура овес (2013), в девятый год – кукуруза (2014). В 2015–2016 гг. выращивались ячмень и пшеница.

Отбор образцов проводили в июле и сентябре по общепринятой в почвенной альгологии методике. Видовой состав водорослей выявляли методами почвенных культур со стеклами обрастания, водных и агаровых культур [8; 10].

Идентификацию водорослей осуществляли с помощью микроскопа Carl Zeiss AxioStar (Германия) и определителей, таксономическое положение объектов приведено по каталогу Т. М. Михеевой [11].

Результаты и их обсуждение

При изучении альгофлоры дерново-подзолистой песчаной почвы после оптимизации под действием торфования и землевания выявлено 45 видов водорослей, относящихся в основном к трем отделам: Chlorophyta, Cyanophyta и Bacillariophyta. Ниже представлено таксономическое положение объектов по каталогу Т. М. Михеевой.

Отдел: **Cyanophyta**

Класс: **Chroococcophyceae**

Порядок: **Chroococcales**

Семейство: **Synechococcaceae**

Synechocystis aquatilis Sauv., Ch-форма

Семейство: **Microcystidaceae**

Microcystis pulverea f. *incerta* (Lemm.) Elenk., C-форма

Класс: **Chamaesiphonophyceae**

Порядок: **Dermocarpales**

Семейство: **Dermocarpaceae**

Dermocarpa Swirenkoi Shirshov, C-форма

Класс: **Hormogoniophyceae**

Порядок: **Oscillatoriales**

Семейство: **Oscillatoriaceae**

Oscillatoria angustissima W. et G. S. West, P-форма

O. brevis (Kütz.) Gom., P-форма

O. lacustris (Kleb.) Geitl., P-форма

O. pseudogeminata G. Schmid, P-форма

Phormidium foveolarum (Mont.) Gom., P-форма

Ph. laminosum f. *weedii* Fild, P-форма
Ph. molle (Kütz.) Gom. f. *molle*, P-форма
Lyngbya aerugineo-coerulea (Kütz.) Gom. f. *aerugineo-coerulea* (= *L. aerugineo-coerulea* (Kütz.) Gom.), P-форма

Порядок: **Nostocales**

Семейство: **Nostocaceae**

Nostoc punctiforme (Kütz.) Hariot f. *punctiforme* (= *Amorphonostoc punctiforme* (Kütz.) Elenk.), Cf-форма

Семейство: **Anabaenaceae**

Cylindrospermum majus Kütz., Cf-форма
Anabaena spiroides f. *crassa* (Lemm.) Elenk., Cf-форма
Anabaena variabilis Kütz. f. *variabilis*, Cf-форма

Семейство: **Scytonemataceae**

Tolypothrix tenuis Kütz. f. *tenuis*, M-форма

Отдел: **Bacillariophyta**

Класс: **Pennatophyceae**

Порядок: **Raphales**

Семейство: **Naviculaceae**

Pinnularia borealis Ehr. var. *borealis*, B-форма
P. microstauron var. *brebissonii* f. *diminuta* Grun., B-форма
P. viridis (Nitzsch.) Ehr. var. *viridis* (= *Navicula viridis* Kütz.; = *P. viridis* var. *clevei* Meist.), B-форма

Семейство: **Cymbellaceae**

Cymbella pusilla Grun., B-форма

Семейство: **Nitzschiaceae**

Hantzschia amphioxys (Ehr.) Grun. var. *amphioxys*, B-форма

Отдел: **Xanthophyta**

Класс: **Xanthococcophyceae**

Порядок: **Heterococcales**

Семейство: **Pleurochloridaceae**

Botrydiopsis arhiza Borzi, Ch-форма

Семейство: **Sciadaceae**

Bumilleriopsis biverucca Pascher, X-форма

Класс: **Xanthotrichophyceae**

Порядок: **Tribonematales**

Семейство: **Heterotrichaceae**

Heterothrix tribonemoides Pascher, H-форма

Отдел: **Euglenophyta**

Класс: **Euglenophyceae**

Порядок: **Euglenales**

Семейство: **Euglenaceae**

Euglena mutabilis Schmitz., X-форма

Отдел: **Chlorophyta**

Класс: **Volvocophyceae**

Порядок: **Chlamydomonadales**

Семейство: **Chlamydomonadaceae**

Chlamydomonas sp., Ch-форма
Chlamydomonas gelatinosa Korschik., Ch-форма

Класс: **Protococcophyceae**

Порядок: **Chlorococcales**

Семейство: **Chlorococcaceae**

Chlorococcum infusionum (Schrack) Menegh., Ch-форма

Семейство: **Oocystaceae**

Chlorella vulgaris Beyer., Ch-форма

Семейство: **Coelastraceae**

Coelastrum astroideum var. *rugosum* (Rich) Sodomkova, Ch-форма
Coelastrum microporum Näg., Ch-форма

Семейство: **Ankistrodesmaceae**
Pseudococcomyxa simplex (Mainx) Fott, Ch-форма
Класс: **Ulothrichophyceae**
Порядок: **Ulotrichales**
Семейство: **Elakatothrichaceae**
Koliella longiseta (Vischer) Hindak (= *Raphidonema longiseta* Vischer), H-форма
K. sempervirens (Chod.) Hindak (= *Raphidonema sempervirens* Vischer), H-форма
Stichococcus bacillaris Näg., H-форма
St. minor Näg., H-форма
St. variabilis W. et G. S. West, H-форма
Семейство: **Ulothrichaceae**
Ulothrix subtilissima Rabenh. (= *U. subtilis* (Un.) Hansg.), H-форма
U. tenerrima Kütz., H-форма
U. variabilis Kütz., H-форма
Geminella terricola Boye-Pet.
Chlorhormidium flaccidum var. *nitens* Menegh. em Klebs (= *Hormidium nitens* (Menegh.) em Klebs), H-форма
Fottea cylindrica Hindak, H-форма
Класс: **Conjugatophyceae**
Порядок: **Desmidiiales**
Семейство: **Desmidiaceae**
Cosmarium undulatum var. *minutum* Wittr., hydr-форма
Отдел: **Rhodophyta**
Класс: **Florideophyceae**
Порядок: **Nemaliales**
Семейство: **Batrachospermaceae**
Batrachospermum moniliforme Roth, H-форма

Таксономическая структура водорослей дерново-подзолистой песчаной почвы представлена в табл. 1.

Таблица 1

Таксономическая структура водорослей
дерново-подзолистой песчаной почвы за июль 2014 г.

Table 1

Taxonomic structure of algae of sod-podzolic sandy soil for July 2014

Отдел	Класс	Порядок	Семейство	Род	Вид
Cyanophyta	Chroococcophyceae	Chroococcales	1	1	1
	Hormogoniophyceae	Oscillatoriales	1	3	6
		Nostocales	2	3	3
Bacillariophyta	Pennatophyceae	Raphales	2	2	4
Xanthophyta	Xanthococcophyceae	Heterococcales	1	1	1
Chlorophyta	Volvocophyceae	Chlamydomonadales	1	1	1
	Protococcophyceae	Chlorococcales	1	1	1
	Ulothrichophyceae	Ulotrichales	2	4	6
Rhodophyta	Florideophyceae	Nemaliales	1	1	1

В формировании почвенной альгофлоры ведущую роль выполняют синезеленые водоросли (цианобактерии) (10 видов) и зеленые водоросли (8 видов), что составляет 75 % от общей численности. Долевое участие в альгофлоре диатомовых водорослей составило 17 % (4 вида), а красных и желтозеленых – по 4 % (по 1 виду). Окультивирование песчаной почвы на основе торфования и землевания сопровождается улучшением структурной организации альгофлоры, что проявляется в увеличении общей

численности видов зеленых и синезеленых водорослей с 8 до 12 (на 50 %), а также в появлении представителей диатомовых (2 вида) и желтозеленых водорослей (1 вид). При этом общая численность видов водорослей возрастает с 11 до 16 (табл. 2).

Таблица 2

Влияние окультуривания дерново-подзолистой песчаной почвы
на видовое богатство водорослей

Table 2

The influence of cultivation of sod-podzolic sandy soil
on the species richness of algae

Вариант	Общая численность видов водорослей	Численность видов зеленых водорослей	Численность видов цианобактерий	Общая численность видов зеленых водорослей и цианобактерий	Доля зеленых водорослей и цианобактерий по отношению к контролю
2014 г.					
1	11	4	4	8	100
2	14	6	5	11	125
3	16	5	7	12	150
4	14	5	7	12	150
5	14	4	6	10	125
2015 г.					
1	14	6	6	12	100
2	22	10	6	16	133
3	21	10	7	17	142
4	21	9	8	17	142
5	23	11	5	16	133
2016 г.					
1	12	5	4	9	100
2	18	10	7	17	189
3	19	8	8	16	178
4	19	9	6	15	167
5	20	9	7	16	178

Примечание. Вариант 1 – контроль. В вариантах 2–5 в почву вносили 200 т/га компоста, а также суглинок в количестве 100; 200; 300 или 400 т/га для вариантов 2, 3, 4 или 5 соответственно.

Анализ табл. 3 показывает, что и в 2015 г. ведущую роль в формировании альгофлоры песчаной почвы выполняют зеленые водоросли (37 %) и цианобактерии (33 %), а доля диатомовых и желтозеленых водорослей составляет 15 и 9 % соответственно.

Euglena mutabilis и *Batrachospermum moniliforme* являлись единственными представителями эвгленовых и красных водорослей соответственно. Важно отметить, что в контрольном варианте опыта альгофлора дерново-подзолистой песчаной почвы представлена только 14 видами водорослей, а под действием торфования и землевания этой почвы их разнообразие увеличилось до 23 видов (см. табл. 2). Следовательно, и в данном случае окультуривание песчаной почвы сопровождается улучшением структурной организации альгофлоры, главным образом за счет зеленых водорослей и цианобактерий, общая численность видов которых возросла с 12 до 17, или на 40 %. При этом биологическое разнообразие альгофлоры окультуренной песчаной почвы улучшалось также благодаря появлению 3 видов желтозеленых и 4 видов диатомовых водорослей.

Таблица 3

Таксономическая структура водорослей
дерново-подзолистой песчаной почвы в 2015 г.

Table 3

Taxonomic structure of algae of sod-podzolic sandy soil in 2015

Отдел	Класс	Порядок	Семейство	Род	Вид
Cyanophyta	Chroococcophyceae	Chroococcales	2	2	2
	Hormogoniophyceae	Oscillatoriales	1	2	6
		Nostocales	3	3	3
Bacillariophyta	Pennatophyceae	Raphales	3	3	5
Xanthophyta	Xanthococcophyceae	Heterococcales	2	2	2
	Xanthotrichophyceae	Tribonematales	1	1	1
Euglenophyta	Euglenophyceae	Euglenales	1	1	1
Chlorophyta	Volvocophyceae	Chlamydomonadales	1	1	1
	Protococcophyceae	Chlorococcales	2	2	2
	Ulotrichophyceae	Ulotrichales	2	4	9
Rhodophyta	Florideophyceae	Nemaliales	1	1	1

Как видно из таксономической структуры в июле 2016 г. (табл. 4), зеленые водоросли включали 15 видов, а цианобактерии – 11 видов, что составляет 84 % альгофлоры песчаной почвы. Желтозеленые, эвгленовые и красные водоросли представлены единичными видами (*Botrydiopsis arhiza*, *Euglena mutabilis* и *Batrachospermum moniliforme* соответственно). А разнообразие диатомовых водорослей ограничено двумя видами, относящимися к порядку Raphales.

Таблица 4

Таксономическая структура водорослей
дерново-подзолистой песчаной почвы в июле 2016 г.

Table 4

Taxonomic structure of algae of sod-podzolic sandy soil for July 2016

Отдел	Класс	Порядок	Семейство	Род	Вид
Cyanophyta	Chroococcophyceae	Chroococcales	2	2	2
	Chamaesiphonophyceae	Dermocarpales	1	1	1
	Hormogoniophyceae	Oscillatoriales	1	3	6
		Nostocales	2	2	2
Bacillariophyta	Pennatophyceae	Raphales	2	2	2
Xanthophyta	Xanthococcophyceae	Heterococcales	1	1	1
Euglenophyta	Euglenophyceae	Euglenales	1	1	1
Chlorophyta	Volvocophyceae	Chlamydomonadales	1	1	1
	Protococcophyceae	Chlorococcales	4	4	5
	Ulotrichophyceae	Ulotrichales	2	5	8
	Conjugatophyceae	Desmidiales	1	1	1
Rhodophyta	Florideophyceae	Nemaliales	1	1	1

В контрольном варианте опыта альгофлора дерново-подзолистой песчаной почвы представлена 12 видами водорослей, в то время как в условиях окультуривания этой почвы количество видов возрастало до 20 (см. табл. 2). При этом общая численность видов зеленых водорослей и цианобактерий в окультуренной песчаной почве увеличивалась с 9 до 17, или на 90 %. Следует отметить, что наиболее низким видовым разнообразием цианобактерий выделялась неокультуренная дерново-подзолистая песчаная почва, где количество их видов не превышало 6. В условиях окультуривания этой почвы численность видов цианобактерий возрастала до 8, а богатство зеленых водорослей увеличивалось с 4–6 до 11 видов. Таким образом, улучшение биологического разнообразия альгофлоры дерново-подзолистой песчаной почвы в условиях ее окультуривания под действием торфования и землевания обеспечивается за счет более активного развития зеленых водорослей и цианобактерий, видовое богатство которых возрастает на 40–90 %.

Распределение почвенных водорослей по экобиоморфам, или жизненным формам, характеризует экологические особенности водорослей независимо от их систематической принадлежности. Располагая индексы жизненных форм в порядке убывания числа видов, получим спектры жизненных форм (по годам):

2014	$H_7P_6B_4Ch_3Cf_3C_1$
2015	$H_{11}P_6B_5Ch_5X_2C_1N_1Cf_1M_1$
2016	$H_9Ch_8P_6B_2Cf_2C_2X_1hydr_1$

Большинство обнаруженных представителей альгофлоры – эдафотрофные водоросли (рис. 1). Участие гидрофильных водорослей в формировании альгогруппировок исследуемых участков незначительно (представлены одним видом – *Cosmarium undulatum* var. *minutum* Wittr.), амфибиальных водорослей не выявлено.

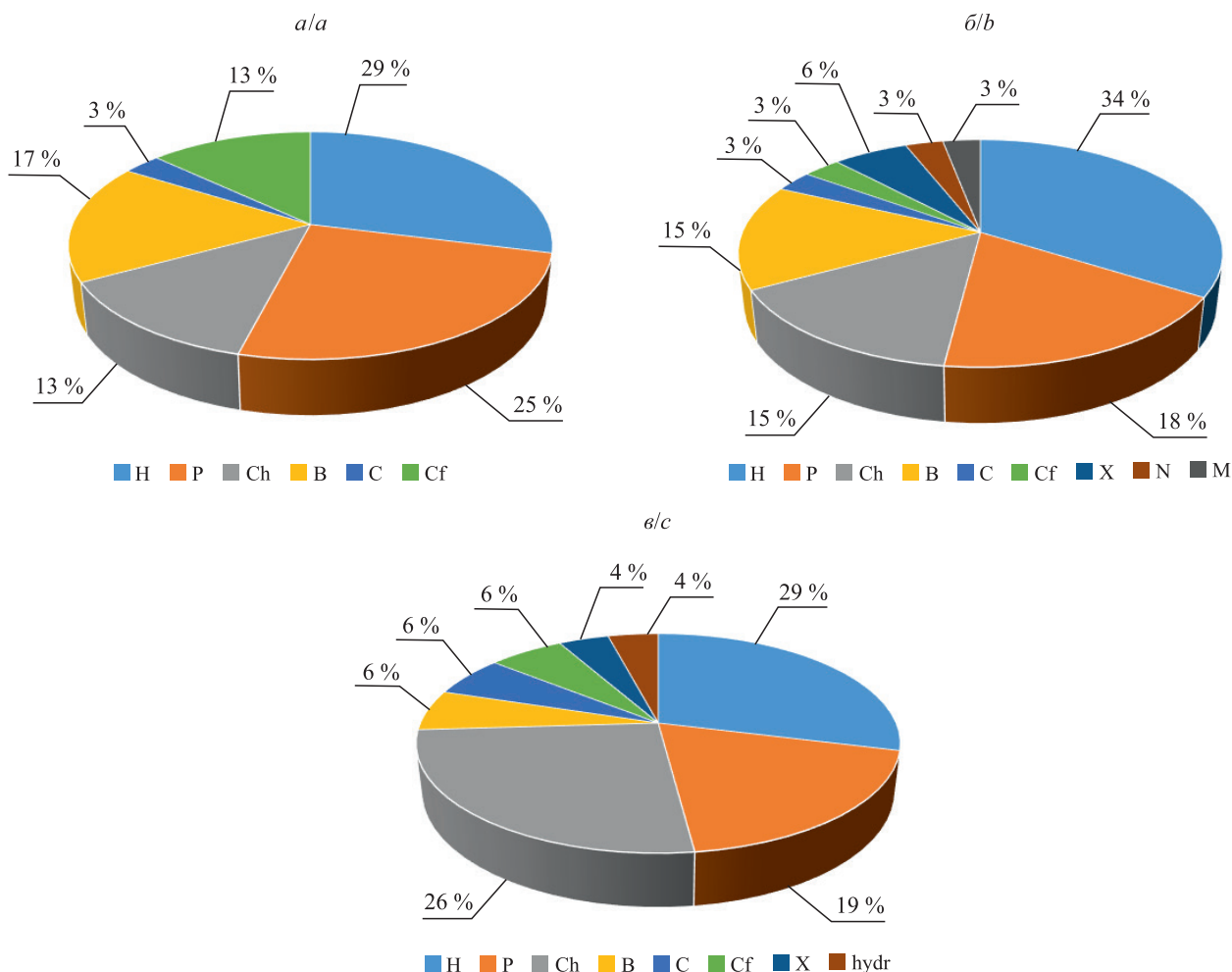


Рис. 1. Соотношение жизненных форм водорослей дерново-подзолистой песчаной почвы (по годам): а – 2014; б – 2015; в – 2016

Fig. 1. The ratio of the life forms of algae sod-podzolic sandy soil: а – 2014; б – 2015; в – 2016

Среди эдафильных водорослей доминирующее положение на протяжении трех лет занимали представители Н-жизненной формы (29; 34 и 29 %). Далее по убывающей расположились Р-жизненная форма, а также Ch- и В-жизненные формы (13–26 %). Незначительным количеством видов представлены водоросли С- и Х-жизненных форм. В 2014 г. выявлено наименьшее разнообразие жизненных форм водорослей, что объясняется чрезвычайно засушливым летом, особенно в июле.

Наиболее высоким разнообразием жизненных форм водорослей отличается альгофлора окультуренной дерново-подзолистой песчаной почвы, где выявлено 4 представителя азотфиксирующих форм цианобактерий: *Nostoc punctiforme*, *Anabaena variabilis*, *Anabaena spiroides* f. *crassa* и *Cylindrospermum majus* (рис. 2). Эти виды присутствуют только в окультуренной песчаной почве, поэтому их можно использовать в качестве индикаторов при разработке биологических методов диагностики экологического состояния дерново-подзолистых песчаных почв в процессе их окультурирования.

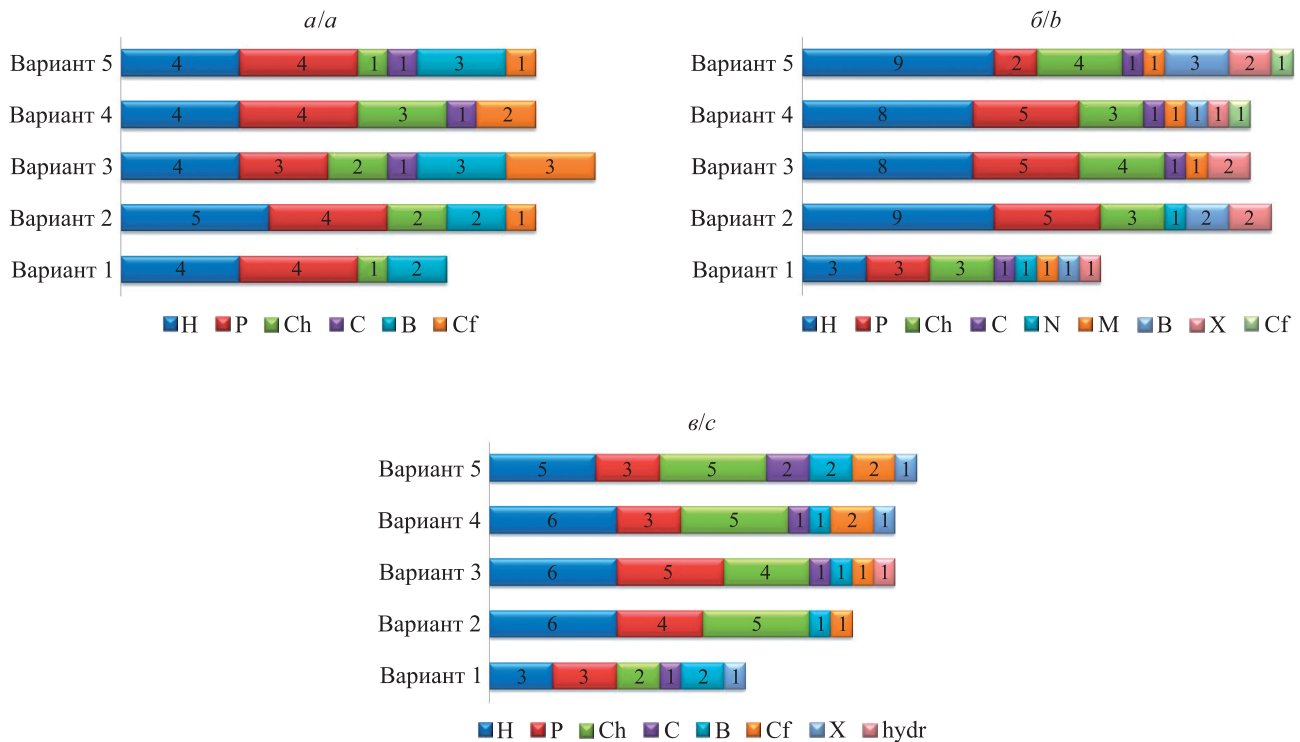


Рис. 2. Соотношение жизненных форм почвенных водорослей дерново-подзолистой песчаной почвы в условиях ее окультурирования (по годам): а – 2014; б – 2015; в – 2016

Fig. 2. The ratio of the life forms of soil algae of sod-podzolic sandy soil in the conditions of its cultivation: а – 2014; б – 2015; с – 2016

Таким образом, в результате окультурирования дерново-подзолистой песчаной почвы путем торфования и землевания значительно улучшается экологическая структура альгофлоры, что выражается в увеличении разнообразия экобиоморф водорослей, в том числе и за счет развития азотфиксирующих форм цианобактерий. Это имеет большое экологическое значение с точки зрения активизации биологических механизмов воспроизводства плодородия песчаной почвы в процессе ее окультурирования.

Данные, приведенные в табл. 1, 3 и 4, указывают на невысокое таксономическое разнообразие водорослей в дерново-подзолистой песчаной почве. Доминирующими по количеству видов являются порядки Ulotrichales, Oscillatoriales и Nostocales, входящие в отделы Cyanophyta и Chlorophyta. Красные и эвгленовые водоросли не играют заметной роли в формировании структуры альгофлоры, так как представлены одним видом.

В 2014 г. наибольшим видовым разнообразием водорослей характеризовался отдел Cyanophyta. Цианобактерии представлены 10 видами, которые относятся к 7 родам из 4 семейств, объединенных в 3 порядка. Среди цианобактерий преобладают водоросли порядка Oscillatoriales (60 %), а на долю порядка Nostocales приходится 30 %. Зеленые водоросли представлены 8 видами, объединяющими 6 родов, 4 семейства и 3 порядка, с преобладанием порядка Ulotrichales (75 %). Следует отметить, что в условиях окультурирования дерново-подзолистой песчаной почвы видовое разнообразие зеленых

водорослей возрастало главным образом за счет представителей порядка Ulotrichales, а в увеличении численности цианобактерий решающая роль принадлежала растениям порядков Oscillatoriales и Nostocales. Отделы Xanthophyta и Rhodophyta представлены каждый одним видом – *Botrydiopsis arhiza* и *Batrachospermum moniliforme* соответственно.

В 2015 г. среди зеленых водорослей, которые насчитывали 12 видов, численно преобладал порядок Ulotrichales (75 %), у цианобактерий (11 видов) на долю порядка Oscillatoriales приходилось 55 %, а долевого участия порядка Nostocales составило 27 %. Вклад эвгленовых и красных водорослей незначителен, присутствуют единичные представители. Диатомовые водоросли представлены одним порядком Raphales, включающим 2 вида.

В 2016 г. в составе цианобактерий (11 видов) также преобладал порядок Oscillatoriales (55 %), а в биоразнообразии зеленых водорослей определяющую роль играли порядки Ulotrichales (53 %) и Chlorococcales (33 %). Все виды водорослей порядка Oscillatoriales принадлежат к 1 семейству и 3 родам, а представители желтозеленых, эвгленовых и красных водорослей насчитывают по одному виду.

Таким образом, наибольшим видовым разнообразием водорослей в 2014 г. отличался отдел Cyanophyta, на долю которого приходилось 42 % видов (рис. 3). В 2015 и 2016 гг. в альгофлоре песчаной почвы преобладали зеленые водоросли, долевого участия которых составило 37–49 %. Удельный вес диатомовых водорослей в формировании альгофлоры песчаной почвы за весь период наблюдений колебался от 6 до 15–17 %. Красные водоросли представлены одним видом, долевого участия которого в альгофлоре составило от 3 до 5 %. Эвгленовые водоросли также представлены одним видом и выявлены только в 2015 и 2016 гг.

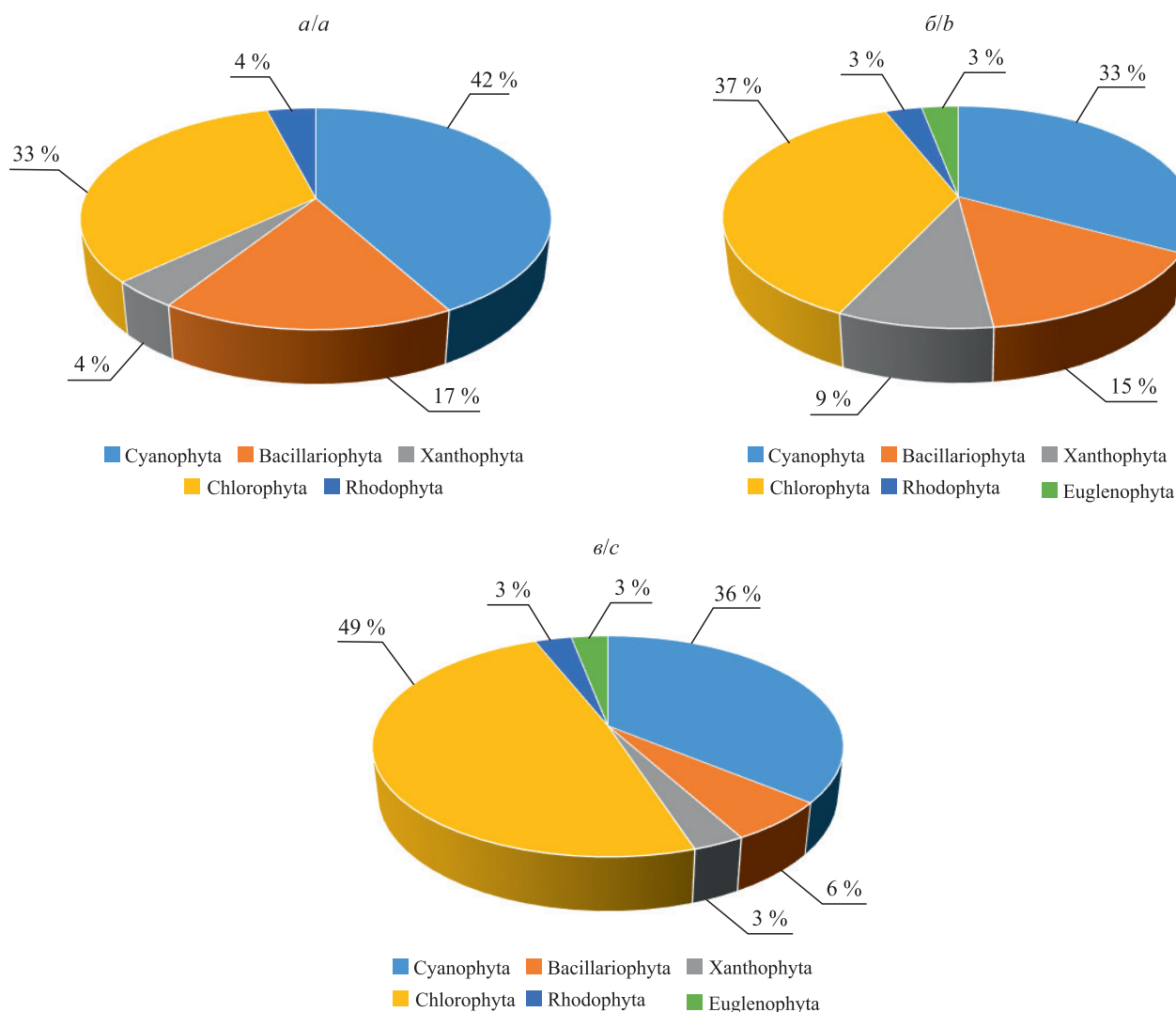


Рис. 3. Участие водорослей разных отделов в формировании видового богатства альгофлоры дерново-подзолистой песчаной почвы (по годам): а – 2014; б – 2015; в – 2016

Fig. 3. The participation of algae of different departments of algae in the formation of the species richness of alga flora of sod-podzolic sandy soil: а – 2014; б – 2015; в – 2016

Окультуривание дерново-подзолистой песчаной почвы под действием торфования и землевания сопровождается не только повышением видового разнообразия почвенных водорослей, но и усложнением их таксономической структуры (табл. 5). Например, в 2014 г. биоразнообразие альгофлоры дерново-подзолистой песчаной почвы в контрольном варианте опыта представлено 11 видами водорослей, относящимися к 4 отделам, 5 классам, 5 порядкам, 6 семействам и 7 родам. В результате окультуривания дерново-подзолистой песчаной почвы таксономическая структура альгофлоры значительно усложнилась и включала уже 5 отделов, 8 классов, 9 порядков, 11 семейств, 12 родов и 14 видов.

В 2015 г. выявленные в почве контрольного варианта 14 видов водорослей принадлежали к 4 отделам, 7 классам, 8 порядкам, 11 семействам и 12 родам. Торфование и землевание дерново-подзолистой песчаной почвы увеличило биоразнообразие альгофлоры до 23 видов, которые объединяли 6 отделов, 9 классов, 10 порядков, 15 семейств и 18 родов. Аналогичная закономерность в изменении таксономической структуры почвенных водорослей наблюдалась и в 2016 г.

Таблица 5

**Изменение таксономической структуры альгофлоры
дерново-подзолистой песчаной почвы в условиях ее окультуривания**

Table 5

**Changes in the taxonomic structure of algoflora
of sod-podzolic sandy soil under conditions of cultivation**

Вариант*	Отдел	Класс	Порядок	Семейство	Род	Вид
2014 г.						
1	4	5	5	6	7	11
2	4	6	7	9	11	14
3	5	7	8	10	12	16
4	5	7	8	10	12	14
5	5	8	9	11	12	14
2015 г.						
1	4	7	8	11	12	14
2	6	9	10	12	15	22
3	5	8	9	12	15	21
4	5	8	9	12	15	21
5	6	9	10	15	18	23
2016 г.						
1	5	7	8	10	11	12
2	5	8	8	11	15	18
3	5	8	8	12	15	19
4	6	8	10	13	16	19
5	6	9	10	16	18	20

*См. примечание к табл. 2.

Как видно из табл. 6, флористический состав почвенных водорослей по вариантам опыта существенно отличался, о чем свидетельствуют показатели индекса Жаккара. Наименьшее флористическое сходство наблюдалось между 1-м и 2-м вариантами в 2016 г. и составило 15 %, а в 2014 и 2015 гг. наименьшее флористическое сходство отмечалось между 1-м и 4-м вариантами опыта (22 и 30 % соответственно). Следовательно, в условиях окультуривания дерново-подзолистой песчаной почвы под действием торфования и землевания формируется альгофлора, которая по своей структурной организации на 70–85 % отличается от альгофлоры исходной неокультуренной почвы.

Таблица 6

Флористическое сходство почвенных водорослей дерново-подзолистой
песчаной почвы в различных вариантах* опыта (по индексу Жаккара)

Table 6

Floristic similarity of soil algae of sod-podzolic sandy soil
in different experimental variants (according to the Jacquard index)

2014 г.						2015 г.						2016 г.					
Вариант	Вариант					Вариант	Вариант					Вариант	Вариант				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1						1						1					
2	57					2	44					2	15				
3	33	36				3	52	54				3	35	32			
4	22	40	43			4	30	48	50			4	29	37	46		
5	37	40	50	47		5	42	45	63	57		5	52	41	39	44	

*См. примечание к табл. 2.

Таким образом, в условиях окультуривания дерново-подзолистой песчаной почвы под действием торфования и землевания происходят значительное улучшение экологической и таксономической структуры альгофлоры и увеличение видового разнообразия водорослей. Это обеспечивает активизацию биологических механизмов воспроизводства плодородия дерново-подзолистой песчаной почвы и повышение ее экологической устойчивости.

Заключение

На исследованных участках дерново-подзолистой песчаной почвы выявлено 45 видов водорослей, принадлежащих в основном к 4 отделам: Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Xanthophyta. В почве также встречаются единичные представители отделов Rhodophyta и Euglenophyta. Доминирующими по количеству видов являются порядки Ulotrichales, Oscillatoriales, Nostocales, относящиеся к отделам Chlorophyta и Cyanophyta. Большинство обнаруженных представителей альгофлоры – эдафотрофные водоросли. Участие гидрофильных водорослей в формировании альгогруппировок исследуемой почвы незначительно (представлено одним видом *Cosmarium undulatum* var. *minutum* Wittr.), амфибиальных водорослей не обнаружено.

В результате окультуривания дерново-подзолистой песчаной почвы под действием торфования и землевания численность видов водорослей увеличивается с 11 до 23. При этом наиболее активное развитие получают зеленые водоросли и цианобактерии, видовое богатство которых возрастает на 40–90 %. В улучшении видового разнообразия зеленых водорослей определяющая роль принадлежит представителям порядка Ulotrichales, а численность цианобактерий повышается главным образом за счет представителей порядков Oscillatoriales и Nostocales.

В условиях окультуривания также улучшается экологическая структура альгофлоры: увеличивается разнообразие экобиоморфов водорослей, происходит развитие азотфиксирующих форм цианобактерий. Это имеет большое экологическое значение с точки зрения активизации биологических механизмов воспроизводства плодородия почвы.

Процесс окультуривания дерново-подзолистой песчаной почвы на основе торфования и землевания обеспечивает формирование более сложной по своей таксономической структуре альгофлоры, которая в соответствии с индексом флористического сходства Жаккара на 70–85 % отличается от альгофлоры исходной неокulturенной почвы, что свидетельствует о повышении биологического разнообразия почвенных водорослей.

Присутствие в дерново-подзолистых песчаных почвах представителей азотфиксирующих форм цианобактерий *Nostoc punctiforme*, *Anabaena variabilis*, *Anabaena spiroides* f. *crassa* и *Cylindrospermum majus* можно использовать в качестве индикатора при разработке биологических методов диагностики экологического состояния этих почв в процессе их окультуривания.

Библиографические ссылки

1. Звягинцев ДГ, Бабьева ИП, Зенова ГМ. Биология почв. Москва: МГУ; 2005. 448 с.
2. Неходимова СЛ, Фомина НВ. Роль альгофлоры в экологической оценке антропогенно-преобразованных почв (обзорная статья). Вестник КрасГАУ. 2013;2:81–86.

3. Симакова МС. Некоторые проблемы классификации и диагностики почв России. *Бюллетень Почвенного института им. В. В. Докучаева*. 2016;82:88–109. DOI: 10.19047/0136-1694-2016-82-88-109.
4. Благодатская ЕВ, Семенов МВ, Якушев АВ. *Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды*. Москва: Товарищество научных изданий «КМК»; 2016. 243 с.
5. Домрачева ЛИ. *«Цветение» почвы и закономерности его развития*. Сыктывкар: Коми научный центр Уральского отделения РАН; 2005. 336 с.
6. Кузяхметов ГГ. *Пространственная организация почвенных альгоценозов степи и лесостепи* [автореферат диссертации]. Сыктывкар: Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН; 2000. 37 с.
7. Безкоровайная ИН. *Биологическая диагностика и индикация почв: краткий курс лекций*. Красноярск: Красноярский государственный аграрный университет; 2001. 43 с.
8. Кузяхметов ГГ, Дубовик ИЕ. *Методы изучения почвенных водорослей*. Уфа: Издательство Башкирского университета; 2001. 60 с.
9. Кондакова ЛВ. Альгоиндикационная характеристика минеральных гидроморфных почв. *Теоретическая и прикладная экология*. 2011;1:80–86.
10. Зенова ГМ, Штина ЭА. *Почвенные водоросли*. Москва: МГУ; 1990. 80 с.
11. Михеева ТМ. *Альгофлора Беларуси. Таксономический каталог*. Минск: БГУ; 1999. 396 с.

References

1. Zvyagintsev DG, Babeva IP, Zenova GM. *Biologiya pochv* [Soil biology]. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2005. 448 p. Russian.
2. Nekhodimova SL, Fomina NV. Algoflora role in the ecological assessment of the anthropogenic-transformed soils (review). *Vestnik KrasGAU*. 2013;2:81–86. Russian.
3. Simakova MS. Some problems in classification and diagnostics of soils in Russia. *Byulleten' Pochvennogo instituta im. V. V. Dokuchaeva*. 2016;82:88–109. Russian. DOI: 10.19047/0136-1694-2016-82-88-109.
4. Blagodatskaya EV, Semenov MV, Yakushev AV. *Aktivnost' i biomassa pochvennykh mikroorganizmov v izmenyayushchikhsya usloviyakh okruzhayushchei sredy* [The activity and biomass of soil microorganisms in changing environmental conditions]. Moscow: Tovarichestvo nauchnykh izdaniy «KMK»; 2016. 243 p. Russian.
5. Domracheva LI. *«Tsveteniye» pochvy i zakonomernosti ego razvitiya* [«Flowering» of the soil and the laws of its development]. Syktyvkar: Komi nauchnyi tsentr Uro RAN; 2005. 336 p. Russian.
6. Kuzyakhmetov GG. *Prostranstvennaya organizatsiya pochvennykh al'gotsenozov stepi i lesostepi* [Spatial organization of soil algal cenoses of the steppe and forest-steppe] [dissertation abstract]. Syktyvkar: Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2000. 37 p. Russian.
7. Bezkorovaynaya IN. *Biologicheskaya diagnostika i indikatsiya pochv: kratkii kurs lektsii* [Biological diagnostics and indication of soils: a short course of lectures]. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State Agrarian University; 2001. 43 p. Russian.
8. Kuzyahmetov GG, Dubovik IE. *Metody izucheniya pochvennykh vodoroslei* [Methods of study of soil algae]. Ufa: Izdatel'stvo Bashkirskogo universiteta; 2001. 60 p. Russian.
9. Kondakova LV. Algoindication characteristics of mineral hydromorphic soils. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2011;1: 80–86. Russian.
10. Zenova GM, Shtina EA. *Pochvennye vodorosli* [Soil algae]. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 1990. 80 p. Russian.
11. Mikheeva TM. *Al'goflora Belarusi. Taksonomicheskii katalog* [Algoflora of Belarus. Taxonomic catalog]. Minsk: Belarusian State University; 1999. 396 p. Russian.

Статья поступила в редколлегию 09.09.2019.
Received by editorial board 09.09.2019.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

SHORT COMMUNICATIONS

УДК 595.772

ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ *CHROMATOMYIA PERICLYMENI* (HENDEL, 1922) (DIPTERA: AGROMYZIDAE) В БЕЛАРУСИ

М. В. ВОЛОСАЧ¹⁾

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

В работе приведены первые для Беларуси регистрации (две точки в г. Минске) минирующей мухи *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922) (Diptera: Agromyzidae). Сборы поврежденных личинками *Ch. periclymeni* листовых пластинок снежноягодника проводились автором в полевые сезоны 2017–2018 гг. На основании литературных данных по сопредельным регионам можно предположить, что *Ch. periclymeni* является локально распространенным на территории страны, чужеродным для фауны Беларуси видом агромизид.

Ключевые слова: фауна; минирующие мухи; декоративные кустарники; минеры; фитофаги снежноягодника; чужеродные виды.

FIRST RECORD OF *CHROMATOMYIA PERICLYMENI* (HENDEL, 1922) (DIPTERA: AGROMYZIDAE) FOR BELARUS

М. V. VOLOSACH^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

This paper presents the first finding of mining fly *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922) (Diptera: Agromyzidae) for Belarus (two sites in Minsk). Collecting of snowberry leaf blades damaged by *Ch. periclymeni* larvae was carried out by the author during the field seasons of 2017–2018. Based on literature data for adjacent regions, it can be assumed that *Ch. periclymeni* is a locally distributed, alien for the fauna of Belarus species of Agromyzidae.

Keywords: fauna; mining flies; ornamental shrubs; miners; phytophages of snowberry; alien species.

Образец цитирования:

Волосач МВ. Первое обнаружение *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922) (Diptera: Agromyzidae) в Беларуси. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:92–94.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-92-94>

For citation:

Volosach MV. First record of *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922) (Diptera: Agromyzidae) for Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:92–94. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-92-94>

Автор:

Марина Владимировна Волосач – аспирантка кафедры зоологии биологического факультета. Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор С. В. Буга.

Author:

Marina V. Volosach, postgraduate student at the department of zoology, faculty of biology.
marinavolosach@yahoo.com

Введение

Минирующие мухи (Diptera: Agromyzidae) до недавнего времени не были объектами целенаправленных исследований в Беларуси. Кроме видового состава, знания о котором, очевидно, неполны, малоизученными остаются их биология и экология. Большинство видов, принадлежащих к этому семейству, известны как минеры, живущие в тканях листьев и питающиеся ими. Дендрофильные агромизиды, к которым относится *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922), представляют особый практический интерес в связи с тем ущербом, который они причиняют декоративным зеленым насаждениям, в частности посадкам снежников (Symphoricarpos Dill. ex Juss.).

Снежник – листопадный декоративный кустарник, естественные ареалы подавляющего большинства видов рода *Symphoricarpos* расположены в Северной Америке (от Канады на юг до Пенсильвании, на запад до Калифорнии) [1, с. 201]. Самое первое упоминание снежника в Европе датируется 1879 г. [2, с. 390]. Этот кустарник используется для создания живых изгородей, бордюров, самостоятельно либо в сочетании с другими растениями, характеризуясь повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям городской среды [3, с. 84]. Он широко представлен в культурной флоре Беларуси и используется в зеленом строительстве благодаря своим ценным декоративным качествам. Чаще всего для этих целей применяется снежник белый, или кистевой (*Symphoricarpos albus* (L.) SF Blake), который иногда может дичать.

Первые регистрации *Ch. periclymeni* в Беларуси выполнены в ходе исследований, целью которых было установление видового состава и трофических связей агромизид, повреждающих декоративные деревья и кустарники в условиях страны и ее регионов.

Ch. periclymeni – вид-олигофаг, личинки которого питаются мезофиллом листьев растений семейства жимолостных (Caprifoliaceae): жимолостей (*Lonicera* L.) и снежников (*Symphoricarpos*) [4]. Единжды личинки были отмечены на лине северной (*Linnaea borealis* L.) [4], включенной в Красную книгу Республики Беларусь [5, с. 144–145]. *Ch. periclymeni* – обычный для Центральной и Восточной Европы вид [4]. Также он был отмечен в Канаде и Испании [6, с. 342]. В сопредельных Беларуси регионах регистрировался в Литве и Польше [7; 8, с. 685].

Материалы и методы исследования

Материалом для данной работы послужили сборы поврежденных листовых пластинок, выполненные автором в г. Минске в 2017–2018 гг. Собранные листовые пластинки гербаризировались в соответствии с общепринятыми методиками [9]. Определение проводилось по конфигурации мин, при этом использовались специализированные ключи и данные открытых интернет-источников [4; 8; 10; 11].

Результаты и их обсуждение

Вид был зарегистрирован автором в двух точках г. Минска на снежнике белом (*S. albus*):

- Лошицкий парк, 29.06.2018 г. Количество экземпляров – 12. Координаты – 53.8523371, 27.577233;
- сквер имени Янки Купалы, 28.06.2018 г. Количество экземпляров – 15, координаты – 53.905159, 27.567337.

Личинки минера формируют звездчатые мины, не ассоциированные ни с краем листовой пластинки, ни с главной листовой жилкой. Экскременты располагаются отдельными гранулами. Окукливание происходит в мине, в которой находятся 1–2 личинки.

Можно предположить, что данный вид распространен в Беларуси локально и является немногочисленным, как и в Польше [8, с. 685], с территории которой он, по всей видимости, проник в Беларусь.

Очевидно, что различные виды рода *Symphoricarpos* и, вероятно, *Lonicera* будут заселяться личинками минера с разной интенсивностью. Круг наиболее повреждаемых и, наоборот, устойчивых к *Ch. periclymeni* видов кустарников еще предстоит выяснить.

Библиографические ссылки

1. Jones GN. A monograph of the genus *Symphoricarpos*. *Journal of the Arnold Arboretum*. 1940;21(2):201–252.
2. Pyšek P, Chytrý M, Pergl J, Sádlo J, Wild J. Plant Invasions in the Czech Republic. In: Chytrý M, Danihelka J, Kaplan Z, Pyšek P, editors. *Flora and vegetation of the Czech Republic. Plant and Vegetation. Volume 14*. Cham: Springer; 2017. p. 339–399. DOI: 10.1007/978-3-319-63181-3_8.
3. Сунгурова НВ. *Декоративная дендрология*. Архангельск: Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова; 2014. 116 с.
4. Ellis WN. Leafminers and plant galls of Europe [Internet]. Nijmegen: Zoological Museum Amsterdam; 2007 [cited 2019 February 11]. Available from: <http://www.bladmineerders.nl>.

5. Пашков ГП, редактор. *Красная книга Республики Беларусь. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений*. Минск: Беларуская энцыклапедыя імя Петруся Броўкі; 2005. 456 с.
6. Černý M, Merz B. New records of Agromyzidae (Diptera) from Switzerland. *Mitteilungen der schweizerischen entomologischen Gesellschaft*. 2005;78(3–4):337–348. DOI: 10.5169/seals-402901.
7. de Jong Y, Verbeek M, Michelsen V, Per de Place Bjørn, Los W, Steeman F, et al. Fauna Europaea – all European animal species on the web. *Biodivers Data Journal*. 2014;2:e4034. DOI: 10.3897/BDJ.2.e4034.
8. Beiger M. *Owady minujące Polski. Klucz do oznaczania na podstawie min*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe; 2004. 894 s.
9. Гельтман ДВ, редактор. *Гербарное дело. Справочное руководство. Русское издание*. Кью: Королевский ботанический сад; 1995. 356 с.
10. British Leafminers [Internet; cited 2019 August 5]. Available from: <http://www.leafmines.co.uk>.
11. Pitkin B, Ellis W, Plant C, Edmunds R. The leaf and stem mines of British flies and other insects [Internet]. 2018 [cited 2018 December 25]. Available from: <http://www.ukflymines.co.uk>.

References

1. Jones GN. A monograph of the genus *Symphoricarpos*. *Journal of the Arnold Arboretum*. 1940;21(2):201–252.
2. Pyšek P, Chytrý M, Pergl J, Sádlo J, Wild J. Plant Invasions in the Czech Republic. In: Chytrý M, Danihelka J, Kaplan Z, Pyšek P, editors. *Flora and vegetation of the Czech Republic. Plant and Vegetation. Volume 14*. Cham: Springer; 2017. p. 339–399. DOI: 10.1007/978-3-319-63181-3_8.
3. Sungurova NV. *Dekorativnaya dendrologiya* [Decorative dendrology]. Arkhangelsk: Northern (Arctic) Federal University named after M. V. Lomonosov; 2014. 116 p. Russian.
4. Ellis WN. Leafminers and plant galls of Europe [Internet]. Nijmegen: Zoological Museum Amsterdam; 2007 [cited 2019 February 11]. Available from: <http://www.bladmineerders.nl>.
5. Pashkov GP, editor. *Krasnaya kniga Respubliki Belarus'. Redkie i nakhodyashchiesya pod ugrozoi ischeznoeniya vidy diko-rastushchikh rastenii* [The Red Book of Belarus. Rare and endangered species of wild plants]. Minsk: Belarusian encyclopedia named after Petrus Brovka; 2005. 456 p. Russian.
6. Černý M, Merz B. New records of Agromyzidae (Diptera) from Switzerland. *Mitteilungen der schweizerischen entomologischen Gesellschaft*. 2005;78(3–4):337–348. DOI: 10.5169/seals-402901.
7. de Jong Y, Verbeek M, Michelsen V, Per de Place Bjørn, Los W, Steeman F, et al. Fauna Europaea – all European animal species on the web. *Biodivers Data Journal*. 2014;2:e4034. DOI: 10.3897/BDJ.2.e4034.
8. Beiger M. *Owady minujące Polski. Klucz do oznaczania na podstawie min*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe; 2004. 894 s.
9. Geltman DV, editor. *Gerbarное дело. Spravochnoe rukovodstvo. Russkoe izdanie* [Herbarium. Handbook. Russian Edition]. Kew: Royal Botanic Gardens; 1995. 356 p. Russian.
10. British Leafminers [Internet; cited 2019 August 5]. Available from: <http://www.leafmines.co.uk>.
11. Pitkin B, Ellis W, Plant C, Edmunds R. The leaf and stem mines of British flies and other insects [Internet]. 2018 [cited 2018 December 25]. Available from: <http://www.ukflymines.co.uk>.

Статья поступила в редколлегию 06.09.2019.
Received by editorial board 06.09.2019.

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ

INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 613.9-057.87(06)

Современные проблемы формирования здорового образа жизни студенческой молодежи [Электронный ресурс] : материалы II Междунар. науч.-практ. интернет-конф. (Минск, 10–12 апр. 2019 г.) / редкол.: И. В. Пантюк (отв. ред.) [и др.] ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск, 2019. 358 с. : ил. Библиогр. в конце ст. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/222426>. Загл. с экрана. Деп. 28.06.2019, № 007628062019.

В сборник включены работы участников II Международной научно-практической интернет-конференции «Современные проблемы формирования здорового образа жизни студенческой молодежи» из ведущих учреждений образования, культуры, здравоохранения Беларуси, России, Украины. Представлены результаты самостоятельных теоретических и экспериментальных исследований экологических, социально-психологических, психолого-педагогических, философских аспектов формирования здорового образа жизни студенческой молодежи. Показана роль физической культуры и спорта в укреплении нравственного и физического здоровья человека. Материалы конференции предназначены для преподавателей, учителей, научных работников, специалистов в области валеологии и здравоохранения, аспирантов, магистрантов, студентов и всех интересующихся вопросами здорового образа жизни.

УДК 577.21(075.8)+575.113(075.8)

Лагоненко А. Л. Прикладная геномика [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление специальности 1-31 01 01-01 «Биология (научно-производственная деятельность)» / А. Л. Лагоненко ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск, 2018. 48 с. : ил. Библиогр.: с. 47–48. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/227691>. Загл. с экрана. Деп. 15.08.2019, № 008515082019.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление специальности 1-31 01 01-01 «Биология (научно-производственная деятельность)». Содержание комплекса предполагает изучение организации геномов разных групп организмов, принципов секвенирования и аннотации геномов.

УДК 581.9.081.1(075.8)

Писарчук Н. М. Геоботаническая практика [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 02 01 «География (по направлениям)», 1-31 02 02 «Гидрометеорология», 1-31 02 03 «Космоаэрокартография», 1-33 01 02 «Геоэкология» / Н. М. Писарчук, А. В. Соколова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск, 2019. 18 с. : ил. Библиогр.: с. 13–15. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/230613>. Загл. с экрана. Деп. 19.09.2019, № 009019092019.

Электронный учебно-методический комплекс по учебной полевой геоботанической практике предназначен для студентов специальностей 1-31 02 01 «География» (по направлениям), 1-31 02 02 «Гидрометеорология», 1-31 02 03 «Космоаэрокартография», 1-33 01 02 «Геоэкология». Содержание комплекса предполагает помощь в прохождении учебной геоботанической практики в полевых условиях на территории учебно-географической станции «Западная Березина» и в ее окрестностях.

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Стрельцова Д. Е., Черныш М. А., Гриусевич П. В., Демидчик В. В. Негеномные эффекты стероидных гормонов: роль ионных каналов.....	3
Мацкевич В. С., Звонарев С. Н., Шикер А. А., Туровец О. А., Смолич И. И., Соколик А. И., Демидчик В. В. Выявление особенностей NaCl-индуцированной модификации ростовых процессов и индукции запрограммированной клеточной гибели в корне подсолнечника.....	13
Сидорова С. Г. Антифунгальная активность актиномицетов в отношении возбудителя фузариоза томата.....	21
Саваневская Е. Н. Электроэнцефалографические корреляты коркового этапа сенсорной рецепции лимонной кислоты.....	33
Янко Р. В., Чака Е. Г., Литовка И. Г., Левашов М. И. Морфологические изменения печени крыс разного возраста после введения хлорида магния.....	40
Сидоров А. В., Шаденко В. Н., Казакевич В. Б. Реакции идентифицированных кардиорегуляторных нейронов ЦНС моллюска <i>Lymnaea stagnalis</i> в условиях гипергликемии и при действии инсулина.....	49

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Кулик Е. В., Русь О. Б., Евтушенков А. Н. Клонирование кДНК глюкоамилазы <i>Aspergillus awamori</i> в дрожжевой интегративный экспрессионный вектор.....	59
--	----

БОТАНИКА

Тихомиров В. Н., Ровенская И. А. Внутри- и межпопуляционная изменчивость <i>Solidago canadensis</i> L. s. l. в Беларуси.....	67
--	----

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

Гаевский Е. Е., Куликов Я. К. Оптимизация альгофлоры дерново-подзолистой песчаной почвы в условиях ее окультуривания.....	79
---	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Волосач М. В. Первое обнаружение <i>Chromatomyia periclymeni</i> (Hendel, 1922) (Diptera: Agromyzidae) в Беларуси.....	92
Аннотации депонированных в БГУ работ.....	95

CONTENTS

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

<i>Straltsova D. Y., Charnysh M. A., Hryvusevich P. V., Demidchik V. V.</i> Non-genomic effects of steroid hormones: role of ion channels	3
<i>Mackievic V. S., Zvanarou S. M., Shyker A. A., Turovets O. A., Smolich I. I., Sokolik A. I., Demidchik V. V.</i> Determination of NaCl-induced modifications in growth processes and induction of programmed cell death in sunflower roots.....	13
<i>Sidorova S. G.</i> The antifungal activity of ray fungum against the fusarium wilt causal agent of tomato	21
<i>Savaneuskaya A. M.</i> Electroencephalographical correlates of cortex stage of sensory citric acid perception.....	33
<i>Yanko R. V., Chaka E. G., Litovka I. G., Levashov M. I.</i> Morphological changes in the rat's liver of different age after administration of magnesium chloride.....	40
<i>Sidorov A. V., Shadenko V. N., Kazakevich V. B.</i> Responses of identified cardioregulatory neurons within CNS of mollusc <i>Lymnaea stagnalis</i> at hyperglycemia and insulin action.....	49

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Kulik A. V., Rus O. B., Evtushenkov A. N.</i> Cloning of cDNA glucoamylase <i>Aspergillus awamori</i> into yeast integrative expression vector	59
---	----

BOTANY

<i>Tikhomirov V. N., Ravenskaya I. A.</i> Intra- and interpopulation variability of <i>Solidago canadensis</i> L. s. l. in Belarus.....	67
---	----

ECOLOGY AND CONSERVANCY

<i>Gaevskii E. E., Kulikov Y. K.</i> Optimization of algoflora of sod-podzolic sand soil in the conditions of its cultivation.....	79
--	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Volosach M. V.</i> First record of <i>Chromatomyia periclymeni</i> (Hendel, 1922) (Diptera: Agromyzidae) for Belarus.....	92
Indicative abstracts of the papers deposited in BSU.....	95

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.
№ 3. 2019**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.

Почтовый адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.

Тел. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.

E-mail: jbiol@bsu.by

URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«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 *Т. Р. Джум*
Технический редактор *В. В. Пишкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 31.10.2019.
Тираж 100 экз. Заказ 407.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
ЛП № 02330/89 от 03.03.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

© БГУ, 2019

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 3. 2019**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Tel. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.

E-mail: jbiol@bsu.by

URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«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 *T. R. Dzhum*
Technical editor *V. V. Pishkova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 31.10.2019.
Edition 100 copies. Order number 407.

Republican Unitary Enterprise
«Informatsionno-vychislitel'nyi tsentr
Ministerstva finansov Respubliki Belarus'».
License for publishing No. 02330/89, 3 March, 2014.
17 Kal'varyjskaja Str., Minsk 220004.

© BSU, 2019