



БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

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

Выходит три раза в год

1

2020

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 544.77;577.164;577.19

РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ЭНДОЦИТОЗ – ВАЖНЫЙ ПУТЬ ПОСТУПЛЕНИЯ ЖЕЛАТИНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ В КЛЕТКИ

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, Т. О. СУХАН¹⁾, Т. Г. ШУТОВА²⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

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

²⁾*Институт химии новых материалов НАН Беларуси,
ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Беларусь*

Представлены экспериментальные данные, детализирующие возможности использования желатиновых наночастиц, полученных методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ, в качестве средств доставки фармакологически активных субстанций в культивируемые нормальные и раковые

Образец цитирования:

Потапович АИ, Сухан ТО, Шутова ТГ, Костюк ВА. Рецептор-опосредованный эндоцитоз – важный путь поступления желатиновых наночастиц в клетки. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020;1:3–10.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-3-10>

For citation:

Potapovich AI, Suhan TO, Shutava TG, Kostyuk VA. Receptor-mediated endocytosis is an important way for gelatin nanoparticles penetration into cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;1:3–10. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-3-10>

Авторы:

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

Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Геннадьевна Шутова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории биополимерных капсулированных структур.

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

Authors:

Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

pot-alla@rambler.ru

Tatyana O. Suhan, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

tanyasuhan@mail.ru

Tatsiana G. Shutava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of biopolymer encapsulated structures.

shutova@ichnm.basnet.by

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

kostyuk@bsu.by

клетки человека. Показано, что клатрин-зависимый эндоцитоз является основным путем поступления наночастиц в нормальные фибробласты человека и раковые клетки линии MDA-MB-231. Благодаря данному виду эндоцитоза в клетки попадает более 50 % желатиновых наночастиц. Установлено, что в процессе клатрин-зависимого эндоцитоза эти наночастицы специфически связываются с коллагеновыми рецепторами.

Ключевые слова: эндоцитоз; желатиновые наночастицы; фибробласты; клеточная линия MDA-MB-231; нильский красный; желатин; хлорпромазин.

RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS IS AN IMPORTANT WAY FOR GELATIN NANOPARTICLES PENETRATION INTO CELLS

A. I. POTAPOVICH^a, T. O. SUHAN^a, T. G. SHUTAVA^b, V. A. KOSTYUK^a

^a*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*

^b*Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus,
36 F. Skaryny Street, Minsk 220141, Belarus*

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Experimental data detailing the possibilities of using gelatin nanoparticles obtained by the two-stage desolvation method without the use of surfactants for delivering pharmacologically active substances to cultured normal and human cancer cells are presented. It was shown that clathrin-dependent endocytosis is the main route of entry of such nanoparticles into normal human fibroblasts and cancer cells of the MDA-MB-231 line. Due to this type of endocytosis, more than 50 % of gelatin nanoparticles enter the cells. It was shown that in the process of clathrin-dependent endocytosis, gelatin nanoparticles specifically bind to collagen receptors.

Keywords: endocytosis; gelatin nanoparticles; fibroblasts; cell line MDA-MB-231; Nile red; gelatin; chlorpromazine.

Введение

Традиционные способы доставки фармакологических препаратов при лечении сердечно-сосудистых, онкологических и других заболеваний сопряжены с рядом серьезных системных побочных эффектов, связанных с тем, что для обеспечения нужной концентрации в области потенциальной мишени приходится увеличивать дозу препарата. Поэтому в последние годы наблюдается растущий интерес к использованию наночастиц (НЧ) в качестве средств доставки фармакологических агентов. Применение НЧ, несущих на своей поверхности специфические лиганды, позволяет осуществлять адресную транспортировку лекарственного средства к органу-мишени, тем самым снизив терапевтическую дозу. Успех лечения с использованием НЧ в существенной степени определяется эффективностью их интернализации в клетки [1–3]. Традиционные фармакологические препараты поступают в клетку главным образом за счет пассивной диффузии или активного транспорта, в то время как нанолекарства – за счет эндоцитоза, который включает фагоцитоз и пиноцитоз. К фагоцитозу способны лишь некоторые типы клеток – моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные и тучные клетки, в незначительной степени – эпителиальные, эндотелиальные и паренхиматозные клетки [4]. Пиноцитоз, который осуществляют все типы клеток, включает клатрин-зависимый эндоцитоз (КлЗЭ), или рецептор-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз, а также клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз [5; 6]. Вид пиноцитоза, задействованный при интернализации нанолекарств в клетку, в значительной степени определяется размерами НЧ [7].

Ранее показана возможность использования желатиновых наночастиц (ЖН) в качестве средств доставки растительных полифенольных соединений в культивируемые нормальные и раковые клетки человека [8]. В настоящей работе изучено влияние специфического ингибитора КлЗЭ – хлорпромазина гидрохлорида – и конкурентного ингибитора коллагеновых рецепторов – желатина типа А – на поступление ЖН в нормальные фибробласты человека и клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231.

Материалы и методы исследования

Реактивы и среды. Желатин типа А (300 Блум), изотонический фосфатный буфер (ИФБ) (рН 7,4), диметилсульфоксид (ДМСО), нильский красный (НК), твин-80, Hoechst 33342 поставлялись компанией *Sigma-Aldrich* (Германия). Ростовая среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM), приобреталась у фирмы *Lonza* (Бельгия), эмбриональная сыворотка – у фирмы *Gibco* (США).

Клеточные культуры. В работе использовали нормальные фибробласты человека линии FL (*human lung fibroblasts*) и клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231. Клетки растили в полной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамин и антибиотиков (100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂).

Оценка цитотоксичности желатина и хлорпромазина. Цитотоксичность ингибиторов КлЗЭ для раковых клеток линии MDA-MB-231 и нормальных фибробластов человека определяли через 24 ч после воздействия в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (*Invitrogen*, США), который разводили в культуральной среде (1 : 9) и добавляли к клеткам в количестве 100 мкл на лунку. Перед этим клетки отмывали один раз, помещая в каждую лунку по 200 мкл ИФБ. На всех планшетах оставляли лунки с культуральной средой без клеток для определения базового уровня флуоресценции. Последнюю измеряли после инкубации планшетов в CO₂-инкубаторе в течение 2 ч, используя значения Ex (560 ± 25) нм, Em (590 ± 10) нм.

Получение желатиновых наночастиц. ЖН получали методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ по модифицированной методике [9]. Гидродинамические размеры, концентрацию и коэффициент полидисперсности, массовую долю желатина, а также дзета-потенциал (ζ -потенциал) частиц определяли, как описано в работе [8].

Получение желатиновых наночастиц, содержащих нильский красный (НК-ЖН). К 30 мл дисперсии ЖН в дистиллированной воде с концентрацией 5,25 мг/мл порциями (по 0,2 мл) добавляли 6 мл раствора НК (0,45 мг/мл) и обрабатывали образец ультразвуком в течение 1 мин после введения каждой порции красителя. Полученную дисперсию оставляли на 30 мин при комнатной температуре, после чего разделяли на аликвоты по 1 мл и отделяли НК-ЖН от супернатанта путем центрифугирования при 5500 об/мин в течение 10 мин. НК-ЖН диспергировали в 0,5 мл дистиллированной воды и объединяли аликвоты. Образец хранили при температуре 4 °С.

Изучение поступления НК-ЖН в клетки. Для количественной оценки эффективности поглощения НК-ЖН клетки растили в 24-луночных планшетах до конfluence 60 %, затем заменяли полную среду на среду без сыворотки (1 мл на лунку), содержащую 2 мкмоль/л инкапсулированного красителя, инкубировали 2 или 4 ч, после чего удаляли среду инкубации, клеточный монослой дважды промывали ИФБ (рН 7,4) и замораживали прикрепленные клетки при температуре –70 °С. После оттаивания клеток при комнатной температуре в каждую лунку 24-луночного планшета добавляли по 300 мкл ДМСО и выдерживали планшет 1 ч в темноте при постоянном перемешивании на мини-шейкере PSU-2T (*BioSan*, Латвия). Затем аликвоты из каждой лунки в трех повторах переносили в лунки 96-луночного планшета (100 мкл на лунку) и измеряли интенсивность флуоресценции при Ex (550 ± 25) нм, Em (650 ± 10) нм. Количество НК определяли, используя соответствующий калибровочный график.

Внутриклеточное распределение НК-ЖН оценивали посредством флуоресцентной микроскопии. В этом случае после удаления среды из лунок добавляли НК-ЖН (2 мкмоль/л по НК) в среде без сыворотки (1 мл на лунку). Инкубировали клетки с НК-ЖН в течение 1, 2 или 4 ч, удаляли среду, промывали клетки ИФБ (рН 7,4) два раза и добавляли в каждую лунку по 1 мл ИФБ. Проводили анализ и делали микрофотографии клеток с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 25 (*Carl Zeiss*, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой. В ряде экспериментов дополнительно окрашивали клеточные ядра: к клеткам добавляли Hoechst 33342 в концентрации 5 мкг/мл в ИФБ (1 мл на лунку), инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Удаляли буфер с красителем и делали микрофотографии флуоресценции клеток, обусловленной НК или Hoechst 33342, с помощью системы флуоресцентной визуализации клеток ZOE Fluorescent Cell Imager (*BioRad*, США), позволяющей совмещать оба изображения.

При исследовании влияния ингибиторов КлЗЭ (рецептор-опосредованного эндоцитоза) на поступление НК-ЖН в клетки последние преинкубировали 60 мин с хлорпромазином и 30 мин с желатином.

Статистический анализ. Обработку результатов проводили с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*. Данные представлены как среднее значение и стандартная ошибка среднего (Mean ± SE). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Физико-химические свойства желатиновых наночастиц, использованных в эксперименте. Средний гидродинамический диаметр ЖН, полученных методом двухстадийной десольватации, по интенсивности светорассеяния равен (264 ± 5) нм. В дисперсии ЖН в наибольшей степени представлены фракции частиц, имеющих диаметр от 190 до 220 нм. Их содержание достигает 46,9 % от общего числа. Средний диаметр и диаметр частиц, составляющих наибольшую долю в образце, различаются незначительно, что указывает на узкое распределение ЖН по размерам. Коэффициент полидисперсности ЖН достигает $0,030 \pm 0,012$. Для них характерно высокое значение ζ -потенциала, равное $(20,50 \pm 0,23)$ мВ. Достаточно большой положительный заряд на поверхности частиц обуславливает высокую коллоидную устойчивость раствора. Хранение ЖН в течение 6 мес. при температуре 4 °С не приводит к их агрегации.

Цитотоксичность хлорпромазина и желатина для фибробластов человека и клеток линии MDA-MB-231. Цитотоксичность хлорпромазина оценивали в диапазоне 5–50 мкмоль/л. Установлено, что при концентрации 10 мкмоль/л цитотоксический эффект хлорпромазина для обоих типов клеток отсутствует: жизнеспособность клеток MDA-MB-231 и фибробластов относительно контроля составила (101 ± 5) и (103 ± 3) % соответственно. Цитотоксичность действия желатина в отношении обоих типов клеток не выявлено во всем исследованном диапазоне концентраций (100–1000 мкмоль/л). В последующих экспериментах были использованы нетоксичные концентрации ингибиторов.

Поступление НК-ЖН в клетки. Для определения интернализации ЖН в них предварительно инкапсулировали НК. Количество НК-ЖН, поступившего в фибробласты и клетки линии MDA-MB-231, устанавливали через 2 и 4 ч инкубации. Полученные результаты представлены в табл. 1, из которой следует, что максимальный уровень НК в клетках MDA-MB-231 отмечался через 2 ч, и дальнейшая инкубация клеток с НК-ЖН не приводила к достоверному изменению внутриклеточного содержания красителя. Несколько другая кинетика накопления НК-ЖН в клетках наблюдалась в случае фибробластов: внутриклеточное содержание НК монотонно возрастало в течение всего периода инкубации (4 ч). Стоит отметить, что скорость поступления НК в фибробласты была достоверно ниже, чем в MDA-MB-231 ($p < 0,05$).

Таблица 1

Концентрация НК, экстрагируемого ДМСО
из клеток, инкубированных с НК-ЖН, нмоль/л

Table 1

The concentration of Nile red, extracted by DMSO
from cells incubated with Nile red – gelatin nanoparticles, nmol/L

Время инкубации, ч	Тип клеток	
	MDA-MB-231	Фибробласты
2	175 ± 22	$65 \pm 15^{**}$
4	161 ± 19	$102 \pm 24^{*#}$

^{*}, ^{**} Различия достоверны относительно концентрации НК в MDA-MB-231 при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно; [#] различия достоверны относительно концентрации НК в фибробластах через 2 ч инкубации при $p < 0,05$.

Анализ флуоресцентных микрофотографий клеток, инкубированных с НК-ЖН в течение 2 и 4 ч (рис. 1), подтверждает, что скорость поступления инкапсулированного НК в клетки MDA-MB-231 (см. рис. 1, в, г) выше, чем в фибробласты (см. рис. 1, а, б). Приведенные микрофотографии также показывают, что в обоих типах клеток НК равномерно распределяется в цитоплазме, за исключением центральной зоны, которая, как свидетельствует окрашивание специфичным флуоресцентным красителем хроматина Hoechst 33342 (рис. 2), является клеточным ядром.

Влияние ингибиторов клатрин-зависимого эндоцитоза на поступление НК-ЖН в клетки. Известно, что в функционировании КлЗЭ важную роль играют поверхностные рецепторы, способные избирательно связываться с различными лигандами – от растворимых макромолекул до крупных частиц. К ним относятся и коллагеновые рецепторы, лигандами которых выступают коллаген и его денатурированная форма – желатин. Эти рецепторы присутствуют на поверхности макрофагов, фибробластов, кератиноцитов, эндотелиальных и ряда других клеток, обеспечивая избирательность микровезикулярного транспорта и существенно увеличивая его скорость [10; 11]. Еще в 1992 г. было показано, что в качестве конкурентного ингибитора коллагеновых рецепторов может быть использован желатин [12].

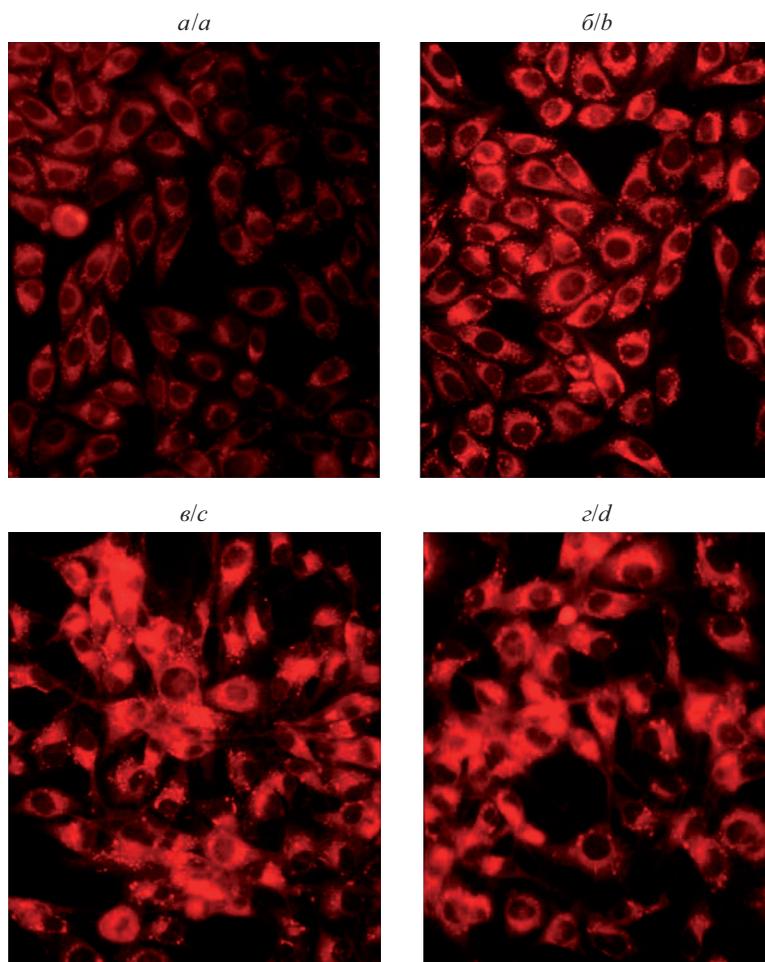


Рис. 1. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии фибробластов (*a, б*) и клеток линии MDA-MB-231 (*в, г*) через 2 ч (*a, в*) и 4 ч (*б, г*) инкубации с НК-ЖН в концентрации 2 мкмоль/л

Fig. 1. Representative fluorescent micrographs of fibroblasts (*a, b*) and MDA-MB-231 cells (*c, d*) after 2 h (*a, c*) and 4 h (*б, d*) incubation with Nile red – gelatin nanoparticles at the concentration of 2 $\mu\text{mol/L}$

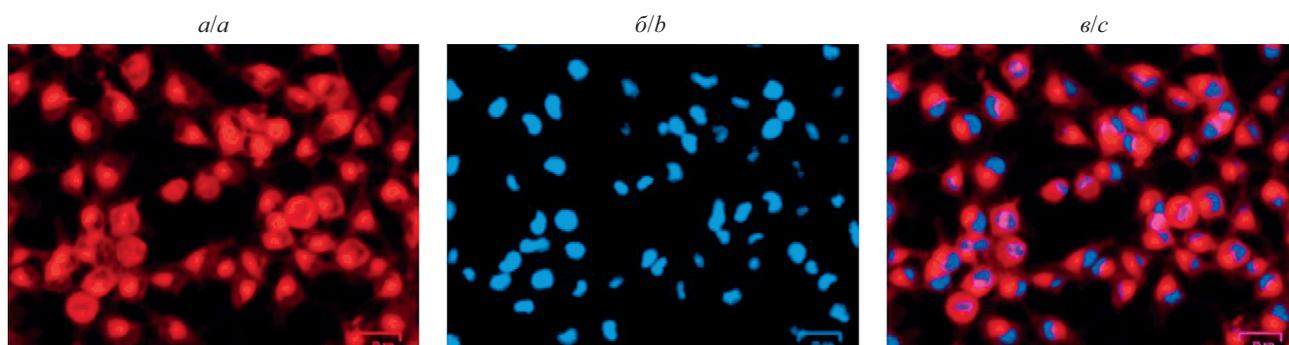


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток линии MDA-MB-231 через 1 ч инкубации с НК-ЖН в концентрации 2 мкмоль/л и дополнительно окрашенных Hoechst 33342: *a* – флуоресценция НК; *б* – флуоресценция Hoechst 33342; *в* – наложение флуоресценций НК и Hoechst 33342

Fig. 2. Representative fluorescent micrographs of MDA-MB-231 cells after 1 h incubation with Nile red – gelatin nanoparticles at the concentration of 2 $\mu\text{mol/L}$.

Cells were additionally stained with Hoechst 33342:
a – Nile red fluorescence; *b* – Hoechst 33342 fluorescence; *c* – merge

В настоящей работе при исследовании его влияния на транспорт НК-ЖН в клетки установлено, что преинкубация фибробластов и клеток MDA-MB-231 в течение 30 мин с желатином уже в концентрации 100 мкмоль/л приводит к значительному снижению попадания наноструктур в клетки. В случае фибробластов максимальный эффект желатина наблюдался через 4 ч инкубации, для клеток MDA-MB-231 процент ингибирования был одинаковым через 2 и 4 ч инкубации (табл. 2). Дозозависимое ингибирование поступления НК-ЖН желатином в исследованном диапазоне концентраций отмечалось только для фибробластов при 2-часовой инкубации с НК-ЖН. В остальных экспериментах ингибирование эндоцитоза желатином при 100 мкмоль/л было на уровне 50–60 % и при дальнейшем увеличении концентрации не повышалось.

Таблица 2

**Ингибирование желатином поступления НК-ЖН
в культивируемые клетки через 2 и 4 ч инкубации, %**

Table 2

**Inhibition of Nile red – gelatin nanoparticles entry
into cultivated cells by gelatin after 2 and 4 h incubation, %**

Концентрация желатина, мкмоль/л	Фибробласты		MDA-MB-231	
	2 ч	4 ч	2 ч	4 ч
100	23,3 ± 13,7*	57,8 ± 13,7**	49,4 ± 9,4**	56,9 ± 9,4**
500	30,6 ± 26,3*	51,5 ± 9,1**	56,2 ± 6,7**	55,5 ± 11,0**
1000	42,5 ± 10,9**	52,6 ± 9,2**	64,2 ± 13,9**	62,7 ± 5,7**

*, ** Различия достоверны относительно результатов в отсутствие желатина при $p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно.

Влияние специфического ингибитора КлЗЭ хлорпромазина в концентрации 10 мкмоль/л на поступление НК-ЖН в фибробласты человека и клетки линии MDA-MB-231 было исследовано через 4 ч инкубации без желатина и совместно с ним (100 мкмоль/л). Как видно из данных, приведенных в табл. 3, хлорпромазин снижает поступление НК-ЖН в клетки почти на 40 %. Относительно совместного действия хлорпромазина и желатина установлено, что ингибирующий эффект этих соединений не суммируется и только незначительно ($p > 0,05$) превышает ингибирующий эффект желатина, что вполне объяснимо, поскольку оба агента воздействуют на КлЗЭ. Таким образом, более 50 % НК-ЖН поступают в клетки путем КлЗЭ, специфически связываясь с коллагеновыми рецепторами.

Таблица 3

**Ингибирование хлорпромазином (без желатина и совместно с ним)
поступления НК-ЖН в культивируемые клетки через 4 ч, %**

Table 3

**Inhibition of Nile red – gelatin nanoparticles entry into cultivated cells
by chlorpromazine alone and with gelatin after 4 h, %**

Условия эксперимента	Тип клеток	
	Фибробласты	MDA-MB-231
Хлорпромазин (10 мкмоль/л)	39,5 ± 6,7	38,2 ± 3,1
Желатин (100 мкмоль/л)	49,0 ± 9,1	45,4 ± 6,3
Хлорпромазин совместно с желатином	57,3 ± 11,9	49,9 ± 5,7

Как свидетельствуют полученные данные, исследованные ингибиторы не полностью блокировали транспорт ЖН, поэтому можно допустить, что наряду с КлЗЭ существуют и другие пути поступления НК-ЖН в клетки. Считается, что размер НЧ в значительной степени предопределяет путь их попадания в клетку [7]. Исследуемые ЖН имеют средний гидродинамический диаметр (264 ± 5) нм, при этом примерно у половины диаметр меньше 200 нм. Есть экспериментальные данные, подтверждающие, что именно для таких НЧ характерен КлЗЭ [10]. Частицы размером более 200 нм могут поступать в клетку посредством макропиноцитоза или кавеолин- и клатрин-независимого эндоцитоза [3].

Другой важный параметр НЧ, который влияет на интернализацию, – их поверхностный заряд. Поскольку внешняя сторона клетки несет отрицательный заряд, в нее легче проникают НЧ с положительным поверхностным зарядом. Вопрос о том, влияет ли заряд НЧ на то, какой вид эндоцитоза будет задействован для их переноса в клетку, остается открытым. Согласно одним данным, положительно заряженные НЧ поступают в клетку через КлЗЭ [13; 14], согласно другим – через макропиноцитоз [15] или кавеолин- и клатрин-независимый эндоцитоз [16]. Отрицательно заряженные НЧ в основном проникают в клетку за счет кавеолин-зависимого эндоцитоза [15], а для нейтральных НЧ не выявлен предпочтительный путь интернализации. Полученные нами результаты с ингибиторами КлЗЭ подтверждают, что последний играет существенную роль в интернализации положительно заряженных НК-ЖН. Принимая во внимание размеры и положительный заряд ЖН, можно допустить, что их трансмембранный перенос также осуществляется через макропиноцитоз или кавеолин- и клатрин-независимый эндоцитоз.

Заключение

Установлено, что КлЗЭ является основным путем поступления ЖН, полученных методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ, в нормальные фибробласты и раковые клетки линии MDA-MB-231. Показано, что в процессе указанного эндоцитоза ЖН специфически связываются с коллагеновыми рецепторами.

Библиографические ссылки

1. Sahoo SK, Labhassetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*. 2003;8(24):1112–1120. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9.
2. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(8):748–758. DOI: 10.1016/j.addr.2007.06.008.
3. Akinc A, Battaglia G. Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 2013 [cited 2019 July 1];5(11):a016980. Available from: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/11/a016980.full>. DOI: 10.1101/cshperspect.a016980.
4. Birge RB, Ucker DS. Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15(7):1096–1102.
5. Wang J, Byrne JD, Napier ME, DeSimone JM. More effective nanomedicines through particle design. *Small*. 2011;7(14):1919–1931. DOI: 10.1002/sml.201100442.
6. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*. 2008;412(3):415–423. DOI: 10.1042/BJ20080474.
7. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Advanced Materials*. 2009;21(4):419–424. DOI: 10.1002/adma.200801393.
8. Сухан ТО, Шутова ТГ, Ушенкина АМ, Потапович АИ, Костюк ВА. Получение желатиновых наночастиц и исследование их взаимодействия с культивируемыми клетками. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;1:13–19.
9. Coester CJ, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*. 2000;17(2):187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.
10. Sorensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrod B. Liver sinusoidal endothelial cells. *Comprehensive Physiology*. 2015;5(4):1751–1774. DOI: 10.1002/cphy.c140078.
11. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochemical Journal*. 1990;271(2):345–350. DOI: 10.1042/bj2710345.
12. Lu ML, McCarron RJ, Jacobson BS. Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 1992;101(4):873–883.
13. Vina-Vilaseca A, Bender-Sigel J, Sorkina T, Closs EI, Sorkin A. Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(10):8697–8706. DOI: 10.1074/jbc.M110.186858.
14. Kovács T, Kárász A, Szöllösi J, Nagy P. The density of GM1-enriched lipid rafts correlates inversely with the efficiency of transfection mediated by cationic liposomes. *Cytometry. Part A*. 2009;75A(8):650–657. DOI: 10.1002/cyto.a.20756.
15. Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules*. 2008;9(2):435–443. DOI: 10.1021/bm700535p.
16. Vighi E, Leo E. Studying the *in vitro* behavior of cationic solid lipid nanoparticles as a nonviral vector. *Nanomedicine*. 2012;7(1):9–12. DOI: 10.2217/nmm.11.168.

References

1. Sahoo SK, Labhassetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*. 2003;8(24):1112–1120. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9.
2. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(8):748–758. DOI: 10.1016/j.addr.2007.06.008.

3. Akinc A, Battaglia G. Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 2013 [cited 2019 July 1];5(11):a016980. Available from: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/11/a016980.full>. DOI: 10.1101/cshperspect.a016980.
4. Birge RB, Ucker DS. Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15(7):1096–1102.
5. Wang J, Byrne JD, Napier ME, DeSimone JM. More effective nanomedicines through particle design. *Small*. 2011;7(14):1919–1931. DOI: 10.1002/sml.201100442.
6. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*. 2008;412(3):415–423. DOI: 10.1042/BJ20080474.
7. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Advanced Materials*. 2009;21(4):419–424. DOI: 10.1002/adma.200801393.
8. Suhan TO, Shutova TG, Ushenkina AM, Potapovich AI, Kostyuk VA. Obtaining gelatin nanoparticles and study their interaction with cultured cells. *Journal of Belarusian State University. Biology*. 2018;1:13–19. Russian.
9. Coester CJ, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*. 2000;17(2):187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.
10. Sorensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrod B. Liver sinusoidal endothelial cells. *Comprehensive Physiology*. 2015;5(4):1751–1774. DOI: 10.1002/cphy.c140078.
11. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochemical Journal*. 1990;271(2):345–350. DOI: 10.1042/bj2710345.
12. Lu ML, McCarron RJ, Jacobson BS. Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 1992;101(4):873–883.
13. Vina-Vilaseca A, Bender-Sigel J, Sorkina T, Closs EI, Sorkin A. Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(10):8697–8706. DOI: 10.1074/jbc.M110.186858.
14. Kovács T, Kárász A, Szöllösi J, Nagy P. The density of GM1-enriched lipid rafts correlates inversely with the efficiency of transfection mediated by cationic liposomes. *Cytometry. Part A*. 2009;75A(8):650–657. DOI: 10.1002/cyto.a.20756.
15. Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules*. 2008;9(2):435–443. DOI: 10.1021/bm700535p.
16. Vighi E, Leo E. Studying the *in vitro* behavior of cationic solid lipid nanoparticles as a nonviral vector. *Nanomedicine*. 2012;7(1):9–12. DOI: 10.2217/nmm.11.168.

Статья поступила в редакцию 05.11.2019.
Received by editorial board 05.11.2019.

УДК 581.1

ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ И ИНДУКЦИЯ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КОРНЕ *HELIANTHUS ANNUUS* L. ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ НИКЕЛЯ И НИКЕЛЬ-ГИСТИДИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

В. С. МАЦКЕВИЧ¹⁾, А. А. ШИКЕР¹⁾, С. Н. ЗВОНАРЕВ¹⁾,
К. С. ЛИЦКЕВИЧ¹⁾, 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,
пос. Кричицкий, Мозырский район, Гомельская область, Беларусь

Никель (Ni^{2+}) выполняет ряд незаменимых функций у растений, но в высоких концентрациях вызывает токсические эффекты, подавляет их рост и развитие. Проблема загрязнения никелем занимает особое место в экологической физиологии, поскольку отказ от никелевых сплавов и, как следствие, снижение выброса данного металла

Образец цитирования:

Мацкевич В.С., Шикер А.А., Звонарев С.Н., Лицкевич К.С., Туровец О.А., Смолич И.И., Соколик А.И., Демидчик В.В. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистидиновых комплексов. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;1:11–19.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-11-19>

For citation:

Mackievic VS, Shyker AA, Zvanarou SM, Litskevich KS, Turovets OA, Smolich II, Sokolik AI, Demidchik VV. Growth inhibition and induction of programmed cell death in the root of *Helianthus annuus* L. triggered by nickel ions and nickel-histidine complexes. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:11–19. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-11-19>

Авторы:

Вера Сергеевна Мацкевич – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.
Артур Александрович Шикер – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. С. Мацкевич.
Сергей Николаевич Звонарев – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.
Кирилл Сергеевич Лицкевич – 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>
Artur A. Shyker, student at the faculty of biology.
shikerartur04@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2251-0779>
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>
Kiryl S. Litskevich, student at the faculty of biology.
litskevich.k.s@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7598-7805>
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, 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>

в биосферу на современном этапе не представляются возможными. Одним из природных механизмов приспособления к чрезмерному содержанию никеля в среде является усиленный синтез свободного гистидина, формирующего хелаты с Ni^{2+} . В настоящей работе проведен детальный анализ воздействия никеля и никель-гистидиновых комплексов на рост и развитие корней подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) белорусской селекции (гибрид Орион). Установлено, что Ni^{2+} , начиная с концентрации 0,3 ммоль/л, вызывает статистически достоверное ингибирование роста корней этого важного сельскохозяйственного вида, а при концентрации 3 ммоль/л и выше полностью подавляет его. Гистидин, введенный совместно с Ni^{2+} , уменьшал негативное влияние данного металла, сдвигая приблизительно на порядок действующие концентрации никеля, вызывающие один и тот же токсический эффект. Обработка Ni^{2+} приводила к увеличению доли клеток с симптомами запрограммированной клеточной гибели, при этом добавление гистидина снижало развитие указанных симптомов. Таким образом, в настоящей работе впервые установлены закономерности дозозависимости токсического воздействия никеля и никель-гистидиновых комплексов на рост корня подсолнечника и развитие симптомов запрограммированной клеточной гибели в ризодерме.

Ключевые слова: подсолнечник; корень; рост; запрограммированная клеточная гибель; тяжелые металлы; никель; гистидин.

GROWTH INHIBITION AND INDUCTION OF PROGRAMMED CELL DEATH IN THE ROOT OF *HELIANTHUS ANNUUS* L. TRIGGERED BY NICKEL IONS AND NICKEL-HISTIDINE COMPLEXES

V. S. MACKIEVIC^a, A. A. SHYKER^a, S. M. ZVANAROU^a,
K. S. LITSKEVICH^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

^bPalesky Institute of Plant Growing, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Škołnaja Street, Kryničny 247781, Mazyr District, Homiel Region, Belarus

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

Nickel (Ni^{2+}) performs a number of vital functions in plants, but at high concentrations it causes toxic effects and inhibits their growth and development. The problem of nickel contamination has a special place in environmental physiology, since the refuse to use nickel alloys and therefore the reduction of Ni^{2+} release into the biosphere are practically impossible today. In nature one of the mechanisms of adaptation to the excessive nickel content in the medium is increased synthesis of histidine, which forms chelates with Ni^{2+} . In the present work, for the first time, a detailed analysis of the effects of nickel and nickel-histidine complexes on the growth and development of sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) of Belarusian selection (variety Orion) was carried out. It was established that Ni^{2+} , starting from its level in the medium of 0.3 mmol/L, caused a significant growth inhibition of this agricultural plant. At a nickel concentration in the medium above 3 mmol/L, the growth of sunflower stopped completely. Histidine, introduced together with Ni^{2+} , caused a decrease in the toxicity of this metal for the root system, in some cases shifting by single-order nickel concentrations, causing the same effect. Nickel treatment caused a significant increase in the percentage of cells with programmed cell death symptoms, while histidine inhibited the development of these symptoms. Thus, the concentration dependences of nickel and nickel-histidine complexes effects on root growth and the processes of programmed cell death in the sunflower root were first demonstrated.

Keywords: sunflower; root; growth; programmed cell death; heavy metals; nickel; histidine.

Введение

Загрязнение почв тяжелыми металлами – одна из важнейших экологических проблем современности. Повышенные уровни тяжелых металлов вызывают угнетение роста и нарушают развитие растений, а их накопление в растительных тканях представляет серьезную угрозу здоровью человека и животных [1]. Практически для всех позвоночных животных ионы никеля (Ni^{2+}) являются крайне опасным токсикантом и канцерогеном: уже начиная с концентрации 1–5 мкмоль/л возникают патофизиологические реакции [2]. Для растительного организма Ni^{2+} , вероятно, менее токсичен [3]. У большинства видов растений токсические эффекты наблюдаются при концентрации Ni^{2+} в среде свыше

10–50 мкмоль/л [4]. Избыток Ni^{2+} в почве вызывает торможение или полную остановку роста корневой системы, хлороз и некроз листьев, отмирание репродуктивных органов и нарушение дифференцировки клеток и тканей, что часто связывают с подавлением активности некоторых ферментативных систем и деструкцией фотосинтетического аппарата [5].

В последние годы сформировалось мнение, согласно которому токсичность избытка Ni^{2+} для растений обусловлена его высокоспецифичным связыванием с рядом групп лигандов в белках и полисахаридах, а также индукцией окислительного стресса вследствие гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) [6]. Тем не менее, несмотря на многочисленные факты обнаружения продуктов окислительных повреждений в клетках растений в присутствии высоких уровней Ni^{2+} , природа редокс-зависимых токсических реакций Ni^{2+} остается непонятной. Известно, что в «биологических условиях», таких как среда цитоплазмы или пространство апопласта, ионная форма Ni^{2+} не обладает редокс-активностью, т. е. Ni^{2+} напрямую не может катализировать реакции Хабера – Вейса, синтезирующие гидроксильный радикал [7]. По одному из предложенных в литературе вариантов объяснения АФК-генерирующей способности никеля катализатором синтеза АФК, вероятно, выступают не сами ионы никеля, а их редокс-активные комплексы, способные к переносу электронов на молекулу H_2O_2 и генерации гидроксил-радикала [8]. Немаловажно отметить, что растения в ответ на никелевый стресс синтезируют протеиногенную аминокислоту гистидин (Гис), которая может формировать редокс-активные хелатные комплексы данного металла ($Ni - \text{Гис}$ и $Ni - \text{Гис}_2$) [9]. Общеизвестно, что синтез Гис, приводящий к устранению избытка свободной формы никеля, является важной эволюционной стратегией выживания на фоне повышенных уровней Ni^{2+} в среде [10]. Однако, по ряду оценок, никель-гистидиновые комплексы могут обладать большей токсичностью, отличаясь от свободных ионов никеля высокой способностью катализировать генерацию АФК [9; 11–13]. Соответственно, возникает вопрос о токсичности никель-гистидиновых комплексов для важнейших видов растений, а также о роли генерации АФК при никелевом стрессе. Согласно гипотезе, развиваемой авторами настоящей работы, редокс-активность никель-гистидиновых комплексов может использоваться для индукции редокс-зависимых реакций клеточной сигнализации, которые выступают в роли триггеров процессов адаптации и индуцированной устойчивости к повышенным уровням никеля в среде. В связи с этим значительный интерес представляет анализ влияния никеля и никель-гистидиновых комплексов на рост и развитие растений в стандартизированных условиях, а также на жизнеспособность клеток корня, являющегося первичной мишенью токсического воздействия данного металла. В представленной работе было рассмотрено растение *Helianthus annuus* L. – наиболее важная масличная культура в мире, для которой пока не изучено влияние никеля и редокс-активных комплексов данного металла. Помимо жизнеспособности клеток корня оценивалось развитие морфологических симптомов запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ), представляющей собой «центральную» реакцию корневой системы на избыток практически любых тяжелых металлов в среде.

Материалы и методы исследования

В работе использовались растения *Helianthus annuus* L. (гибрид Орион), семена которых были предоставлены Полесским институтом растениеводства. Ранее нами показано, что гибрид Орион отличается устойчивостью к воздействию некоторых абиотических стрессоров, таких как NaCl [14]. Проростки подсолнечника культивировались рулонным методом. Перед посадкой семена 20 мин обрабатывались раствором детергента (20 % *Domestos*), после чего промывались в проточной воде и выкладывались на влажную фильтровальную бумагу (15 × 15 см) на расстоянии 1 см от верхнего края, накрывались вторым листом бумаги и скручивались в рулон. Далее рулоны помещались в стаканы с питательным раствором, содержащим 10 % стандартного набора солей Мурасиге и Скуга [15] производства компании *Duchefa* (Нидерланды). В данную среду вводились тестируемые растворы Ni^{2+} ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) и $Ni^{2+} - \text{Гис}$, pH устанавливался на уровне 6,0. Комплексы $Ni^{2+} - \text{Гис}$ генерировались путем добавления растворов Ni^{2+} и Гис в соотношении 1 : 2 [16]. Стаканы с рулонами помещались в стерильную ростовую камеру с контролируемыми условиями освещения (16 ч (свет)/8 ч (темнота)) и температурным режимом (22 °C), где инкубировались в течение 7 сут. Ежедневно осуществлялся мониторинг прироста корней, фотографии делались SLR-камерой Nikon D5500 (Япония). На 7-е сутки регистрировалась длина основного корня. Расчеты морфологических параметров производились при помощи приложения *ImageJ*.

Морфологические симптомы ЗКГ выявлялись в корневых волосках 7-дневных проростков подсолнечника с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100F. Проростки подсолнечника помещались в Ni^{2+} -содержащие растворы на 3 и 24 ч. Для каждой серии экспериментов подсчет относительного количества клеток с симптомами ЗКГ производился в 15 независимых группах (по 100 корневых волосков каждая). Фотографирование при проведении морфологических тестов осуществлялось при 40-кратном увеличении.

Жизнеспособность клеток корня определялась с использованием красителя Evans blue (*AppliChem*, Германия). Обработанные стрессорами растения подсолнечника помещались в водный раствор 0,025 % Evans blue и выдерживались 30 мин, после чего корни тщательно промывались в течение 10 мин в растворе, содержащем по 0,1 ммоль/л KCl и CaCl₂ (pH 6,0; 2 ммоль/л Mes и 1 ммоль/л Tris), и анализировались при помощи инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100F ($\lambda_{ex} = 470$ нм, $\lambda_{em} = 680$ нм). Интенсивность флуоресценции определялась в приложении *NIS Elements Imaging Software* отдельно для зрелой зоны и зоны кончика корня.

Результаты и их обсуждение

Введение в среду выращивания Ni²⁺, начиная с уровня 0,1 ммоль/л, индуцировало снижение скорости роста основного корня *Helianthus annuus* L. (рис. 1). Полумаксимальный ингибирующий эффект (снижение скорости роста в 2 раза) регистрировался на фоне 0,4 ммоль/л Ni²⁺, а концентрация 10 ммоль/л Ni²⁺ была летальной. При введении в питательную среду 1 ммоль/л Ni²⁺ семена прорастали, однако в дальнейшем рост корней останавливался. Обнаруженный концентрационный диапазон токсических эффектов никеля указывает на то, что подсолнечник является относительно устойчивым к данному металлу видом по сравнению со многими сельскохозяйственными растениями. Например, для корней лука (*Allium cepa* L.) полумаксимальный эффект был отмечен при 0,25 ммоль/л Ni²⁺ (против 0,4 ммоль/л для подсолнечника) [17]. Кукуруза (*Zea mays* L.) намного более чувствительна к никелю: полумаксимальное ингибирование роста корня, а также снижение жизнеспособности клеток наблюдались при обработке 2 мкмоль/л Ni²⁺ [18].

Введение в среду выращивания Ni²⁺ совместно с Гис в соотношении 1 : 2 значительно снижало токсический эффект данного металла. Например, на фоне летальной концентрации Ni²⁺ (10 ммоль/л) добавление Гис восстанавливало прорастание семян (см. рис. 1, з, и). Сублетальные уровни Ni²⁺ (1 и 3 ммоль/л) в присутствии Гис вызывали в 3 раза меньший ингибирующий эффект (см. рис. 1, з – ж).

При кратковременной обработке проростков подсолнечника никельсодержащими растворами в клетках корня развивалась ЗКГ (рис. 2). В результате воздействия 0,3–10,0 ммоль/л Ni²⁺ в течение 3–24 ч в корневых волосках подсолнечника доминировали типичные морфологические симптомы ЗКГ: отслоение цитоплазматической мембраны от клеточной стенки, образование темных телец на месте ядра, конденсация протопласта, видимые нарушения целостности мембран (см. рис. 2, а – в). В контрольных образцах, выдержанных в безникелевой среде, данных симптомов практически не наблюдалось (см. рис. 2), а доля клеток с ЗКГ не превышала 8 %. При 3-часовой экспозиции симптомы ЗКГ отмечались лишь при высоких уровнях Ni²⁺: при 3 ммоль/л Ni²⁺ – у 15 % клеток, при 10 ммоль/л Ni²⁺ – у 25 %. Обработка 3 и 10 ммоль/л Ni²⁺ на протяжении 24 ч индуцировала гибель 35 % трихобластов (корневых волосков). Концентрация 0,3–1,0 ммоль/л Ni²⁺ не оказывала негативного эффекта при 3-часовом воздействии, однако индуцировала развитие морфологических симптомов ЗКГ при 24-часовой экспозиции. Добавление Гис подавляло токсические эффекты Ni²⁺: доля клеток с симптомами ЗКГ «возвращалась» к уровню контрольных необработанных никелем групп растений. Таким образом, в случае Ni²⁺-индуцированной ЗКГ Гис оказывал сильное протекторное воздействие, предотвращая отмирание клеток корня как на начальных этапах (3 ч), так и при увеличении времени экспозиции (24 ч).

Схожие результаты были получены в тестах жизнеспособности клеток с использованием Evans blue (рис. 3). Добавление сублетальных концентраций Ni²⁺ снижало общую жизнеспособность клеток в 1,5–2,0 раза как в зрелой зоне, так и в зоне деления. Обработка проростков подсолнечника летальной концентрацией Ni²⁺ (10 ммоль/л) на протяжении 24 ч уменьшала жизнеспособность клеток корня примерно в 3 раза по сравнению с контрольными необработанными группами растений. Введение Гис снижало токсическое действие Ni²⁺, в особенности при обработке 10 ммоль/л Ni²⁺.

Исследования ЗКГ, индуцируемой абиотическими стрессорами в корне высших растений, проведены на многих видах, включая важнейшие однодольные и двудольные растения [19–22]. Предложен ряд механизмов данного явления, в частности ионный механизм (посредством активации гидролитических ферментов в результате изменения уровней важнейших катионов в цитоплазме), механизм транслокации специализированных протеаз (фитоспаз) из клеточной стенки в цитоплазму и вакуолярный механизм (путем разрушения центральной вакуоли специальными ферментами) [19]. Соответственно, на морфологическом уровне ЗКГ у высших растений подразделяется на два основных типа – апоптозоподобный и вакуолярно-литический. Описанный в настоящей работе тип ЗКГ по своим признакам относится к первой группе, так как содержимое клеток корня остается интактным и отсутствуют признаки разрыва вакуоли. Подобный тип ЗКГ доминирует и при воздействии других переходных металлов, например ионов меди, а также при засолении [23]. Важно отметить, что протекторное влияние Гис на ЗКГ, вызываемую тяжелыми металлами, обнаружено в данной работе впервые. Ранее протекторные эффекты были выявлены только для антиоксидантов и блокаторов Ca²⁺- и K⁺-проницаемых катионных каналов [19].

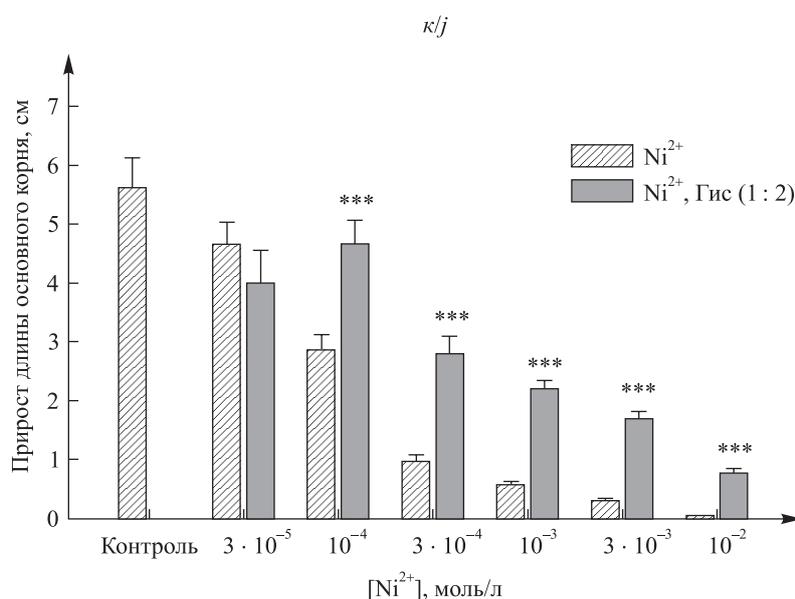


Рис. 1. Воздействие Ni²⁺ и Ni²⁺-гистидиновых комплексов на рост корней подсолнечника.

Внешний вид 7-дневных проростков подсолнечника: а – безникелевая среда (контроль); среда с Ni²⁺ в концентрации (ммоль/л): б – 0,3; г – 1; е – 3; з – 10;

среда с Ni²⁺-гистидиновыми комплексами в концентрации:

в – 0,3 ммоль/л Ni²⁺ + 0,6 ммоль/л Гис; д – 1 ммоль/л Ni²⁺ + 2 ммоль/л Гис;

ж – 3 ммоль/л Ni²⁺ + 6 ммоль/л Гис; и – 10 ммоль/л Ni²⁺ + 20 ммоль/л Гис.

Средние значения прироста длины основного корня ($X \pm Sx$, $n = 30$), полученные в контроле и при обработке Ni²⁺ и Ni²⁺-гистидиновыми комплексами (к).

Достоверность различий рассчитывалась по отношению

к растениям, обработанным Ni²⁺. *** – $p < 0,001$

Fig. 1. Ni²⁺ and Ni²⁺-histidine complexes effect on the sunflower root growth.

Typical photos of 7-day sunflower seedlings: а – nickel-free medium (the control);

medium with Ni²⁺ in concentration (mmol/L): б – 0.3; д – 1; ф – 3; h – 10;

medium with Ni²⁺-histidine complexes in concentration:

с – 0.3 mmol/L Ni²⁺ + 0.6 mmol/L histidine; е – 1 mmol/L Ni²⁺ + 2 mmol/L histidine;

г – 3 mmol/L Ni²⁺ + 6 mmol/L histidine; и – 10 mmol/L Ni²⁺ + 20 mmol/L histidine.

Mean length gain of the main root ($X \pm Sx$, $n = 30$) (j). The significance of differences was calculated with respect to the Ni²⁺-treated plants: *** – $p < 0.001$

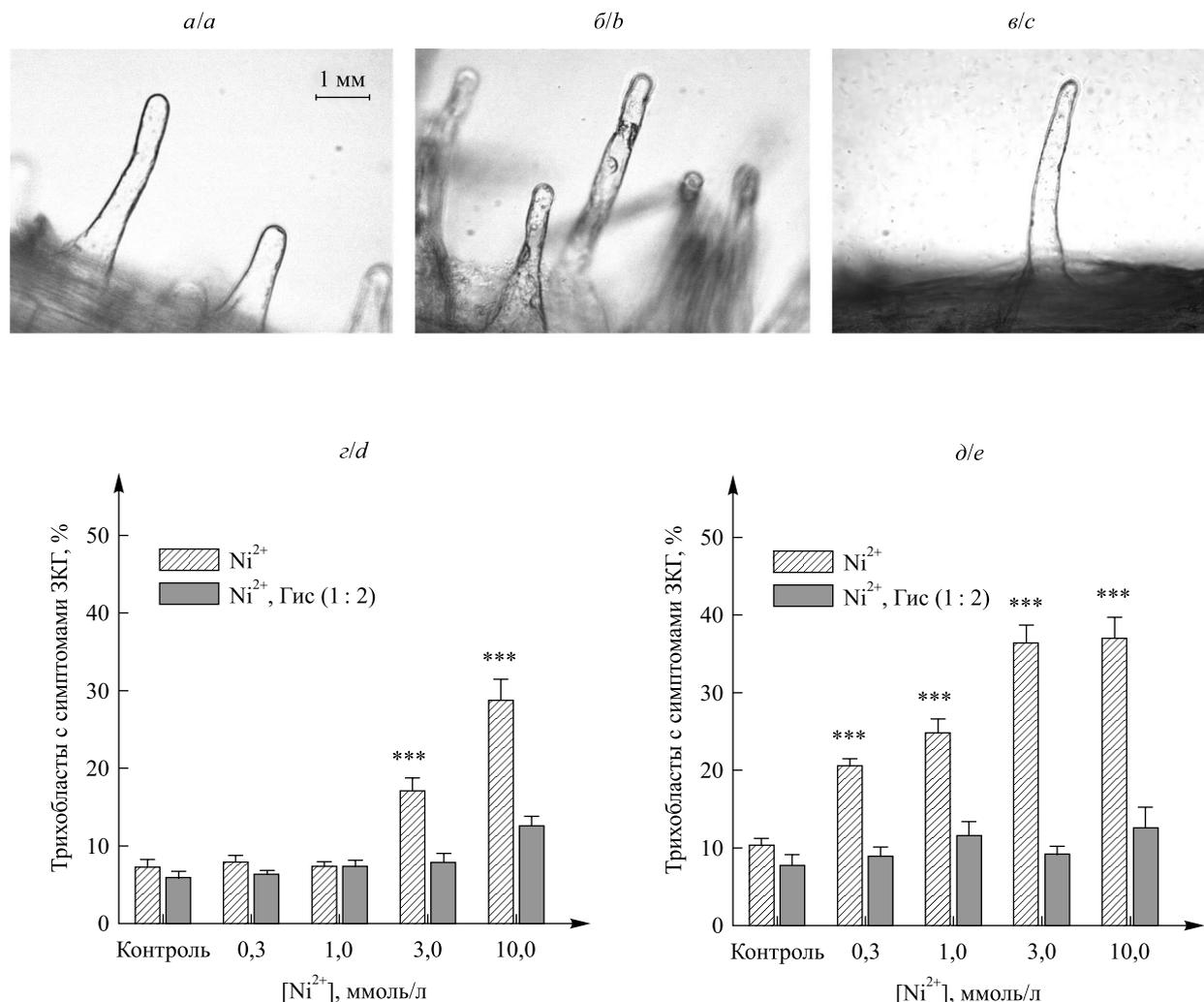


Рис. 2. Влияние Гис на развитие морфологических симптомов ЗКГ в клетках корня подсолнечника при никелевом стрессе. Внешний вид корневых волосков без обработки (а) и после 24-часовой экспозиции на фоне 3 ммоль/л Ni²⁺ (б) и 3 ммоль/л Ni²⁺ + 6 ммоль/л Гис (в). Средняя доля корневых волосков с симптомами ЗКГ при инкубировании подсолнечника в Ni²⁺-содержащих растворах в течение 3 ч (д) и 24 ч (е). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: *** – $p < 0,001$ ($n = 15$)

Fig. 2. The effect of histidine on the development of morphological symptoms of programmed cell death (PCD) in sunflower roots under nickel stress. Typical photos of root hairs without treatment (a) and after 24-hour exposure in solutions containing 3 mmol/L Ni²⁺ (b) and 3 mmol/L Ni²⁺ + 6 mmol/L histidine (c). The percentage of root hairs with programmed cell death symptoms in sunflower incubated in solutions containing Ni²⁺ for 3 h (d) and 24 h (e). The significance of differences was calculated with respect to the control: *** – $p < 0.001$ ($n = 15$)

Таким образом, проведенные опыты показывают, что добавление Гис и формирование его комплексов с никелем приводит к значительному снижению токсичности Ni²⁺ как в виде восстановления ростовых процессов, так и путем повышения жизнеспособности поврежденных клеток. Предположительно, протекторный эффект Гис может быть связан с образованием редокс-активных комплексов, способных активировать АФК- и Ca²⁺-зависимые механизмы адаптации к никелю. Однако возможны и другие механизмы, объясняющие обнаруженный эффект. Например, недавно было выявлено снижение Ni²⁺-индуцированного окислительного стресса посредством активации ферментов глутатион-аскорбатного цикла, важным звеном синтеза компонентов которого может выступать экзогенный Гис [24]. В таком случае Гис, вероятно, способствует увеличению пула ключевых антиоксидантов. Будущие исследования эффектов никеля и никель-гистидиновых комплексов на уровне сигнальных реакций клетки и модификаций генетической экспрессии позволят глубже понять природу обнаруженных явлений.

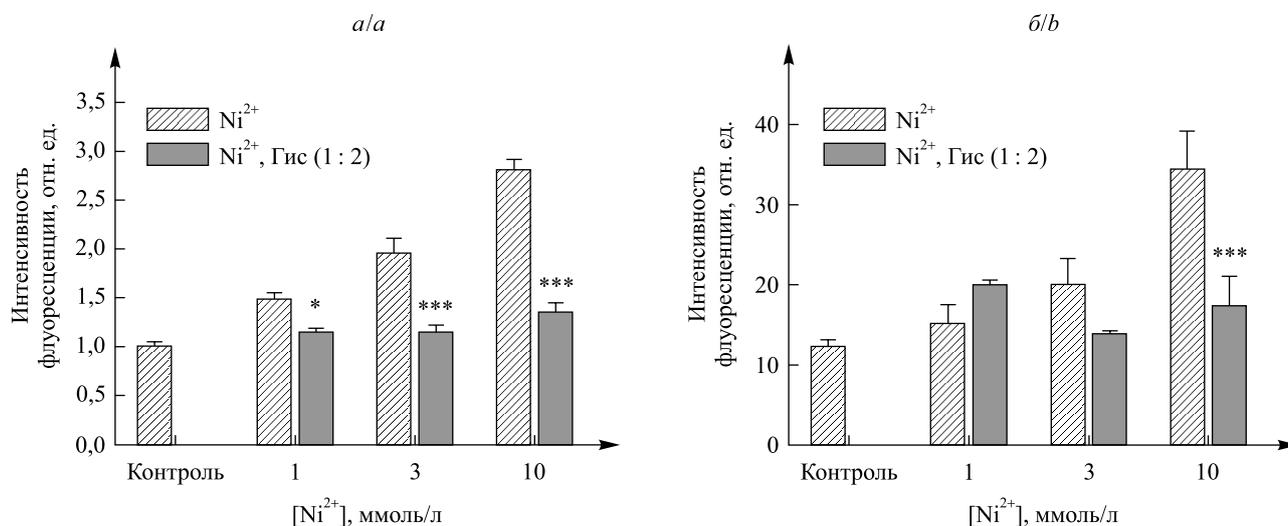


Рис. 3. Изменение жизнеспособности корней *Helianthus annuus* L. после 24-часовой экспозиции растений в Ni²⁺-содержащих растворах (тест с Evans blue): а – интенсивность флуоресценции Evans blue в зрелой зоне корня ($X \pm Sx$, $n = 40-50$); б – интенсивность флуоресценции Evans blue в зоне кончика корня ($X \pm Sx$, $n = 7-10$). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к интенсивности флуоресценции в корнях при обработке Ni²⁺: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$

Fig. 3. Change in the viability of the roots of *Helianthus annuus* L. after 24-hour exposure in Ni²⁺-containing solutions (test with Evans blue): а – the intensity of Evans blue fluorescence in the mature zone of roots ($X \pm Sx$, $n = 40-50$); б – the intensity of Evans blue fluorescence in the root tip area ($X \pm Sx$, $n = 7-10$). The significance of differences was calculated with respect to the fluorescence intensity in the roots treated with Ni²⁺: * – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$

Данное исследование было выполнено в рамках совместных международных белорусско-индийских (№ Б17ИНДГ-003) и белорусско-китайских (№ Б19КИТГ-006) научных проектов, финансируемых Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь.

Библиографические ссылки

- Buxton S, Garman E, Heim KE, Lyons-Darden T, Schlekot CE, Taylor MD, et al. Concise review of nickel human health toxicology and ecotoxicology. *Inorganics* [Internet]. 2019 [cited 2019 July 20];7(7):89. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6740/7/7/89/htm>. DOI: 10.3390/inorganics7070089.
- Balachandran C, Haribabu J, Jeyalakshmi K, Bhuvanesh NSP, Karvembu R, Emi N, et al. Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018;182:208–221. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.02.014.
- Bergmann W, editor. *Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis*. Jena: G. Fisher; 1992. 741 p.
- Rizvi A, Khan MS. Heavy metal-mediated toxicity to maize: oxidative damage, antioxidant defence response and metal distribution in plant organs. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(8):4873–4886. DOI: 10.1007/s13762-018-1916-3.
- Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany* [Internet]. 2012 [cited 2019 July 21];2012. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/872875/>. DOI: 10.1155/2012/872875.
- Kehrer JP. The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43–50. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.
- Joshi S, Husain MM, Chandra R, Hasan SK, Srivastava RC. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide. *Human & Experimental Toxicology*. 2005;24(1):13–17. DOI: 10.1191/0960327105ht493oa.
- Richau KH, Kozhevnikova AD, Seregin IV, Vooijs R, Koevoets PLM, Smith JAC, et al. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. 2009;183(1):106–116. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x.
- Ingle RA, Mugford ST, Rees JD, Campbell MM, Smith JAC. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*. 2005;17(7):2089–2106. DOI: 10.1105/tpc.104.030577.
- Inoue S, Kawanishi S. ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel(II) complex of glycyglycyl-L-histidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;159(2):445–451. DOI: 10.1016/0006-291x(89)90012-0.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd edition. Oxford: Oxford University Press; 1999. 936 p.

13. Ghasemi R, Ghaderian SM, Krämer U. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. *New Phytologist*. 2009;184(3):566–580. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02993.x.
14. Мацкевич ВС, Звонарев СН, Шикер АА, Туровец ОА, Смолич ИИ, Соколик АИ и др. Выявление особенностей NaCl-индуцированной модификации ростовых процессов и индукции запрограммированной клеточной гибели в корне подсолнечника. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:13–20. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-13-20.
15. 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.
16. Datta AK, Misra M, North SL, Kasprzak KS. Enhancement by nickel(II) and L-histidine of 2'-deoxyguanosine oxidation with hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*. 1992;13(2):283–287. DOI: 10.1093/carcin/13.2.283.
17. Akbaş H, Dane F, Meriç Ç. Effect of nickel on root growth and the kinetics of metal ions transport in onion (*Allium cepa*) root. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2009;46(4):332–336.
18. Fiala R, Kenderešová L, Syschykov DV, Martinka M, Repka V, Pavlovkin J, et al. Comparison of root growth and morphological responses to cadmium and nickel in two maize cultivars. *Modern Phytomorphology*. 2013;3:131–137. DOI: 10.5281/zenodo.162002.
19. Demidchik V, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):28–46. DOI: 10.1071/fp16380.
20. Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2015 [cited 2019 July 23];6:69. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00069/full>. DOI: 10.3389/fpls.2015.00069.
21. 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* [Internet]. 2011 [cited 2019 July 23];7(1):45. Available from: <http://www.plantmethods.com/content/7/1/45>. DOI: 10.1186/1746-4811-7-45.
22. Kumar SR, Mohanapriya G, Sathishkumar R. Abiotic stress-induced redox changes and programmed cell death in plants – a path to survival or death? In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, editors. *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Cham: Springer; 2016. p. 233–252. DOI: 10.1007/978-3-319-44081-1_11.
23. 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(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
24. Asrar Z, Mozafari H, Rezanejad F, Pourseyedi S, Yaghoobi MM. Calcium and L-histidine effects on ascorbate-glutathione cycle components under nickel-induced oxidative stress in tomato plants. *Biologia Plantarum*. 2014;58(4):709–716. DOI: 10.1007/s10535-014-0443-4.

References

1. Buxton S, Garman E, Heim KE, Lyons-Darden T, Schlekot CE, Taylor MD, et al. Concise review of nickel human health toxicology and ecotoxicology. *Inorganics* [Internet]. 2019 [cited 2019 July 20];7(7):89. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6740/7/7/89/htm>. DOI: 10.3390/inorganics7070089.
2. Balachandran C, Haribabu J, Jeyalakshmi K, Bhuvanesh NSP, Karvembu R, Emi N, et al. Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018;182:208–221. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.02.014.
3. Bergmann W, editor. *Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis*. Jena: G. Fisher; 1992. 741 p.
4. Rizvi A, Khan MS. Heavy metal-mediated toxicity to maize: oxidative damage, antioxidant defence response and metal distribution in plant organs. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(8):4873–4886. DOI: 10.1007/s13762-018-1916-3.
5. Srekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
6. Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany* [Internet]. 2012 [cited 2019 July 21];2012. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/872875/>. DOI: 10.1155/2012/872875.
7. Kehrer JP. The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43–50. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.
8. Joshi S, Husain MM, Chandra R, Hasan SK, Srivastava RC. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide. *Human & Experimental Toxicology*. 2005;24(1):13–17. DOI: 10.1191/0960327105ht493oa.
9. Richau KH, Kozhevnikova AD, Seregin IV, Vooijs R, Koevoets PLM, Smith JAC, et al. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. 2009;183(1):106–116. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x.
10. Ingle RA, Mugford ST, Rees JD, Campbell MM, Smith JAC. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*. 2005;17(7):2089–2106. DOI: 10.1105/tpc.104.030577.
11. Inoue S, Kawanishi S. ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel(II) complex of glycylglycyl-L-histidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;159(2):445–451. DOI: 10.1016/0006-291x(89)90012-0.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd edition. Oxford: Oxford University Press; 1999. 936 p.
13. Ghasemi R, Ghaderian SM, Krämer U. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. *New Phytologist*. 2009;184(3):566–580. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02993.x.

14. Mackievic VS, Zvanarou SM, Shyker AA, Turovets OA, Smolich II, Sokolik AI, et al. Determination of NaCl-induced modifications in growth processes and induction of programmed cell death in sunflower roots. *Journal of Belarusian State University. Biology*. 2019;3:13–20. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-13-20.
15. 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.
16. Datta AK, Misra M, North SL, Kasprzak KS. Enhancement by nickel(II) and L-histidine of 2'-deoxyguanosine oxidation with hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*. 1992;13(2):283–287. DOI: 10.1093/carcin/13.2.283.
17. Akbaş H, Dane F, Meriç Ç. Effect of nickel on root growth and the kinetics of metal ions transport in onion (*Allium cepa*) root. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2009;46(4):332–336.
18. Fiala R, Kenderešová L, Syshchykov DV, Martinka M, Repka V, Pavlovkin J, et al. Comparison of root growth and morphological responses to cadmium and nickel in two maize cultivars. *Modern Phytomorphology*. 2013;3:131–137. DOI: 10.5281/zenodo.162002.
19. Demidchik V, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):28–46. DOI: 10.1071/fp16380.
20. Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2015 [cited 2019 July 23];6:69. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00069/full>. DOI: 10.3389/fpls.2015.00069.
21. 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* [Internet]. 2011 [cited 2019 July 23];7(1):45. Available from: <http://www.plantmethods.com/content/7/1/45>. DOI: 10.1186/1746-4811-7-45.
22. Kumar SR, Mohanapriya G, Sathishkumar R. Abiotic stress-induced redox changes and programmed cell death in plants – a path to survival or death? In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, editors. *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Cham: Springer; 2016. p. 233–252. DOI: 10.1007/978-3-319-44081-1_11.
23. 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(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
24. Asrar Z, Mozafari H, Rezanejad F, Pourseyedi S, Yaghoobi MM. Calcium and L-histidine effects on ascorbate-glutathione cycle components under nickel-induced oxidative stress in tomato plants. *Biologia Plantarum*. 2014;58(4):709–716. DOI: 10.1007/s10535-014-0443-4.

Статья поступила в редколлегию 01.11.2019.
Received by editorial board 01.11.2019.

УДК 577.13:581.192

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

К. В. ПРИСТУПА¹⁾, Т. А. КУКУЛЯНСКАЯ¹⁾, Е. А. ХРАМЦОВА¹⁾

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

Проведен сравнительный анализ ряда биохимических показателей нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в почве с повышенной концентрацией солей тяжелых металлов. Трансгенные растения несли в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, кодирующий фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминазу (АЦК-деаминазу). Обработка почвы ионами меди, хрома и свинца в концентрациях, превышающих предельно допустимые, способствовала индукции экспрессии *acdS*-гена и увеличению активности АЦК-деаминазы в трансгенных растениях. Также показано, что в условиях абиотического стресса у исследуемых образцов возрастало содержание фенольных соединений (в частности, флавоноидов) и аскорбиновой кислоты, повышалась общая антиоксидантная активность.

Ключевые слова: антиоксидантная система; низкомолекулярные антиоксиданты; *acdS*-ген; *Nicotiana tabacum*.

Образец цитирования:

Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Анализ содержания фенольных антиоксидантов и аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;1:20–26. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-20-26>

For citation:

Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. Analysis of the low-molecular weight antioxidants of transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:20–26. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-20-26>

Авторы:

Кристина Владимировна Приступа – аспирантка кафедры биохимии биологического факультета. Научный руководитель – Т. А. Кукулянская.

Татьяна Александровна Кукулянская – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Kristina V. Pristupa, postgraduate student at the department of biochemistry, faculty of biology.

kristina.pristupa@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1977-4949>

Tatsiana A. Kukulianskaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

tak14@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-4204-658X>

Elena A. Khramtsova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

elena_khramtsova@inbox.ru

ANALYSIS OF THE LOW-MOLECULAR WEIGHT ANTIOXIDANTS OF TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

K. V. PRISTUPA^a, T. A. KUKULIANSKAYA^a, E. A. KHRAMTSOVA^a

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

Corresponding author: K. V. Pristupa (kristina.pristupa@mail.ru)

We conducted a comparative analysis of biochemical parameters of non-transgenic and transgenic *Nicotiana tabacum*, plants cultivated in heavy metal polluted soils. Transgenic plants had in their genome a bacterial *acdS*-gene encoding the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC-deaminase) enzyme. The introduction of elevated concentrations of copper, chromium, and lead ions into the soil promotes induction of the *acdS*-gene expression and an increase in ACC-deaminase activity in transgenic plants. It was shown that the content of phenolic compounds (flavonoids), ascorbic acid, the total antioxidant activity of plants increased under abiotic stress.

Keywords: antioxidant system; low-molecular weight antioxidants; *acdS*-gene; *Nicotiana tabacum*.

Введение

Повышение устойчивости сельскохозяйственных культур к неблагоприятным факторам окружающей среды является одной из важнейших задач, стоящих перед учеными. Растения, которые произрастают в сложных условиях, подвергаются абиотическому стрессовому воздействию, что может быть обусловлено засолением или загрязнением почв тяжелыми металлами, засухой и т. д. [1; 2].

При стрессовых воздействиях содержание активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках начинает быстро увеличиваться и, как следствие, значительно повышается интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов. АФК подавляют активность ферментов, вызывают деградацию клеточных биополимеров, нарушают проницаемость биологических мембран, останавливают клеточный цикл и приводят к развитию апоптоза. В ответ на усиление генерации АФК, как правило, происходит активация ферментативных и неферментативных элементов антиоксидантной защитной системы растений. К ключевым неферментативным антиоксидантам относятся аскорбиновая кислота, фенольные соединения (в частности, флавоноиды), α -токоферол и др. [3; 4].

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества этилена в растениях. Этилен представляет собой фитогормон, который участвует в регуляции прорастания семян, роста корней и стеблей, образования цветков, созревания плодов. Однако его чрезмерное накопление приводит к изменению параметров роста и развития растений.

Одним из современных способов снижения избыточного количества этилена в растениях является создание трансгенных форм, которые несут в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, кодирующий АЦК-деаминазу. Данный фермент катализирует разложение предшественника этилена – АЦК – до аммиака и α -кетобутирата [5–7].

Устойчивость растений к неблагоприятным условиям, вызывающим стресс, в значительной степени обеспечивается активным функционированием антиоксидантной системы. Во многих странах мира проводится изучение антиоксидантной активности растений под влиянием стрессовых воздействий, создаются трансгенные растения, которые характеризуются сверхэкспрессией генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты [8]. Данные об изменении состояния и эффективности антистрессового действия антиоксидантной системы получены также для ряда растений, инокулированных бактериями, которые имеют *acdS*-ген [9]. Однако исследование состояния антиоксидантной системы трансгенных растений, несущих этот ген, в условиях абиотического стресса не проводилось.

Целью настоящей работы является анализ влияния тяжелых металлов, внесенных в почву, на общую антиоксидантную активность, а также содержание неферментативных антиоксидантов в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37. Предметом исследования являлись общая антиоксидантная активность данных растений и содержание в них низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты и фенольных соединений, в частности флавоноидов).

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А. А. Мельниковой и соавторами [10].

Растения были разделены на четыре группы:

- контрольная серия (без обработки почвы тяжелыми металлами);
- 1-я серия (обработка CuSO_4 в концентрации 30 мг на 1 кг почвы);
- 2-я серия (обработка $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы);
- 3-я серия (обработка $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы).

Обработку почвы ионами тяжелых металлов проводили однократно с учетом их предельно допустимой концентрации (ПДК): вносимое количество должно было превышать ПДК в 5 раз.

Каждая серия включала по 5 трансгенных растений линий 4-12 и 10-38, а также 5 нетрансгенных растений *Nicotiana tabacum*.

Семена стерильно высевали на увлажненные фильтры и в течение 2 сут выдерживали при температуре $(20,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в темноте для прорастания. Затем проростки помещали в климатикамеру с температурой $(20,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и 16-часовым световым днем. Через 14 сут растения пересаживали в стаканчики со стерильной почвой (50 г). Дальнейшее культивирование производили при температуре $(20,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, влажности 70–80 %, 16-часовом световом дне на протяжении 8 нед.

Растительный материал (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 моль/л калий-фосфатном буфере (рН 7,8), затем объем доводили до 10 мл. Полученные гомогенаты трижды по 15 с подвергали ультразвуковому воздействию при частоте 11 кГц с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП «Академприбор», Россия), после чего центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 об/мин. Все процедуры производили на холоде (4°C). Клеточные экстракты использовали для определения общей антиоксидантной активности, а также содержания низкомолекулярных антиоксидантов и белка в растениях.

Общую антиоксидантную активность растительных экстрактов оценивали по степени ингибирования окисления парафенилендиамина пероксидом водорода с применением спектрофотометрического метода при длине волны 530 нм [11].

Общее содержание фенольных соединений в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу *Singleton* при длине волны 765 нм [12].

Общее содержание флавоноидов в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по методу *Quettier* при длине волны 415 нм [13].

Содержание аскорбиновой кислоты устанавливали спектрофотометрически с использованием метода *Das*, который основан на способности фосфомолибдата восстанавливаться данной кислотой до молибдата синего цвета. Измерение проводили при длине волны 660 нм [14].

Содержание белка в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм [15].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью лицензионного пакета программ *Statistica 6.0*. Оценку достоверности различий средних арифметических проводили на основании коэффициента Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при двустороннем уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Развитие стресса у растений сопровождается активацией свободнорадикальных окислительных процессов в клетке [3]. Нами была определена общая антиоксидантная активность всех серий растений, которая выражается степенью инактивации антиоксидантами растений окисления парафенилендиамина пероксидом водорода (табл. 1).

Таблица 1

Общая антиоксидантная активность нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, %

Table 1

The total antioxidant activity of non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, %

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	$60,0 \pm 1,5$	$56,0 \pm 1,4$	$54,0 \pm 1,4$
Обработка почвы Cu^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$77,0 \pm 1,8^*$	$63,0 \pm 1,5^*$	$60,0 \pm 1,6^*$

Окончание табл. 1
Ending table 1

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	83,0 ± 2,1*	68,0 ± 1,7*	65,0 ± 2,2*
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	73,0 ± 1,7*	59,0 ± 1,4*	58,0 ± 1,5*

*Различия между контрольной и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 1, нетрансгенные растения *Nicotiana tabacum* отличаются более высокой антиоксидантной активностью, чем трансгенные. Установлено, что при обработке почвы солями тяжелых металлов общая антиоксидантная активность исследуемых образцов увеличивается. Причем и у нетрансгенных, и у трансгенных форм максимальная ее величина обнаружена при внесении в почву 5-кратной ПДК Cr⁶⁺: в первом случае антиоксидантная активность возросла на 40 % по сравнению с контрольной серией, во втором – на 20 %.

Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный *acdS*-ген, образуется меньше АФК, следовательно, они имеют более низкую интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов, чем нетрансгенные. Поэтому в трансгенных растениях в меньшей степени происходит активация элементов антиоксидантной защиты, что, возможно, обуславливает более низкую общую антиоксидантную активность трансгенных форм по сравнению с нетрансгенными.

Приведенные нами данные коррелируют с полученными ранее результатами, согласно которым трансгенные растения имели более низкую активность ферментативных антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы), а также более низкую интенсивность процессов перекисного окисления липидов, чем нетрансгенные [16].

Одними из наиболее активных низкомолекулярных антиоксидантов являются фенольные соединения, в частности флавоноиды. Поэтому нами было определено общее содержание фенольных соединений в исследуемых растениях (табл. 2). Оно выражается количеством танина (в микрограммах) на 1 г растительного экстракта.

Таблица 2

Общее содержание фенольных соединений в экстрактах
нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, мкг/г

Table 2

The total content of phenolic compounds in extracts
of non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, µg/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	59,0 ± 2,9	75,0 ± 3,6	69,0 ± 3,1
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	84,0 ± 4,1*	122,0 ± 6,1*	150,0 ± 7,2*
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	106,0 ± 5,5*	131,0 ± 6,6*	161,0 ± 7,8*
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	80,0 ± 4,0*	88,0 ± 4,1*	104,0 ± 4,8*

*Различия между контрольной и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 2, исходное количество фенольных соединений в трансгенных растениях было на 15–25 % выше, чем в нетрансгенных формах. При обработке почвы ионами тяжелых металлов содержание фенольных соединений увеличилось и в трансгенных, и в нетрансгенных растениях. В результате внесения в почву 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) в трансгенных образцах оно выросло на 40; 80 и 35 % соответственно по сравнению с контрольной серией, а в нетрансгенных – на 120; 130 и 50 %.

Возможно, это связано с тем, что в условиях абиотического стресса в трансгенных растениях образующийся АЦК подвергается не только ферментативному разрушению АЦК-деаминазой, но также может превращаться в ряд конденсированных соединений (например, жасмонил-АЦК), которые содержат в своем составе ароматические кольца, необходимые для синтеза вторичных метаболитов в растениях, в том числе и фенольных соединений.

Помимо этого, нами было определено общее содержание флавоноидов в исследуемых растениях (табл. 3). Оно выражается количеством рутина (в микрограммах) на 1 г растительного экстракта.

Таблица 3

Общее содержание флавоноидов в экстрактах нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, мкг/г

Table 3

The total content of flavonoids in extracts of non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, µg/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	34,0 ± 1,6	42,0 ± 1,9	40,0 ± 1,8
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	64,0 ± 3,0*	78,0 ± 3,5*	82,0 ± 3,9*
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	86,0 ± 4,5*	102,0 ± 4,1*	112,0 ± 4,7*
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	53,0 ± 2,7*	68,0 ± 3,2*	75,0 ± 3,6*

*Различия между контрольной и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Из приведенных в табл. 3 результатов следует, что при обработке почвы 5-кратной ПДК ионов тяжелых металлов количество флавоноидов увеличилось и в трансгенных, и в нетрансгенных растениях. При внесении в почву ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) общее содержание флавоноидов в нетрансгенных образцах составило 190; 250 и 155 % соответственно по сравнению с контрольной серией, а в трансгенных – 210; 280 и 190 %.

Также в ходе работы было определено содержание аскорбиновой кислоты во всех сериях в расчете на 1 г растительного материала (табл. 4).

Таблица 4

Содержание аскорбиновой кислоты в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, мкг/г

Table 4

The content of ascorbic acid in non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, µg/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	0,73 ± 0,015	0,81 ± 0,016	0,78 ± 0,015
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,96 ± 0,018*	0,99 ± 0,020*	1,07 ± 0,019*
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	1,38 ± 0,027*	1,53 ± 0,031*	1,74 ± 0,037*
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,75 ± 0,016*	0,88 ± 0,018*	0,88 ± 0,017*

*Различия между контрольной и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Исходя из данных табл. 4, можно сделать вывод, что при обработке почвы солями тяжелых металлов содержание аскорбиновой кислоты повышается как в нетрансгенных, так и в трансгенных образцах. При этом трансгенные растения *Nicotiana tabacum* отличаются несколько большим увеличением

количества аскорбиновой кислоты, чем нетрансгенные формы. Так, при внесении в почву ионов Cr^{6+} у нетрансгенных растений содержание витамина С выросло в 1,9 раза, а у трансгенных – в 2,2 раза по сравнению с контрольной серией.

Полученные нами результаты показывают, что общая антиоксидантная активность у нетрансгенных растений в условиях стресса в среднем на 25 % выше, чем у трансгенных форм. При этом содержание фенольных соединений и аскорбиновой кислоты выше в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. Значительное увеличение общей антиоксидантной активности может быть связано с возрастанием содержания общего пула низкомолекулярных антиоксидантов, таких как глутатион, токоферолы, пролин и ряд других, количество которых в данной работе не оценивалось. Помимо этого, фенольные производные, в частности флавоноиды, могут проявлять прооксидантную активность, что способствует снижению интенсивности антиоксидантной защиты [17; 18].

Заключение

Таким образом, трансгенные растения, несущие в своем геноме бактериальный *acdS*-ген и способные синтезировать АЦК-деаминазу [16], в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов тяжелых металлов, присутствующих в почве. Следует отметить, что трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, которые выращивались на загрязненной почве, имели лучшие ростовые характеристики (большая длина стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы [10].

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении активности антиоксидантной системы в условиях абиотического стресса, вызванного обработкой почвы ионами Cu^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} . Показано, что наименьшая чувствительность растений к загрязнению почвы солями тяжелых металлов отмечалась при внесении в почву солей свинца(II).

Практическая значимость данного исследования связана с использованием трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.
2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase containing plant growth promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(1):11–17. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2.
3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.
4. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008; 51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.
5. Hontzeas N, Hontzeas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.
6. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.
7. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
8. Lee Y-P, Kim S-H, Bang J-W, Lee H-S, Kwak S-S, Kwon S-Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5):591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.
9. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.
10. Мельникова АА, Храмова ЕА, Королева ЕС, Руткевич ДА, Кукулянская ТА. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:45–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.
11. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):48–54.
12. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin – Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2007;2(4):875–877. DOI: 10.1038/nprot.2007.102.
13. Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;72(1–2):35–42. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00196-3.
14. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.
15. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.

16. Приступа КВ, Королева ЕС, Кукулянская ТА, Руткевич ДА. Оценка состояния антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum* в условиях абиотического стресса. В: *Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: сборник тезисов докладов 19-й Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева; 15–16 апреля 2019 г.; Москва, Россия*. Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 2019. с. 55–56.

17. Yordi EG, Pérez EM, Matos MJ, Villares EU. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. In: Bouayed J, Bohn T, editors. *Nutrition, well-being and health*. Rijeka: InTech; 2012. p. 23–48. DOI: 10.5772/29471.

18. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(5):749–760. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00351-6.

References

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.

2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase containing plant growth promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(1):11–17. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2.

3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.

4. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008; 51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.

5. Hontzeas N, Hontzeas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.

6. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.

7. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.

8. Lee Y-P, Kim S-H, Bang J-W, Lee H-S, Kwak S-S, Kwon S-Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5):591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.

9. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.

10. Melnikava AA, Khramtsova AA, Karaleva KS, Rutkevich DA, Kukulienskaya TA. Expression analysis of *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:45–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.

11. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):48–54.

12. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin – Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2007;2(4):875–877. DOI: 10.1038/nprot.2007.102.

13. Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;72(1–2):35–42. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00196-3.

14. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.

15. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.

16. Pristupa KV, Karaleva KS, Kukulienskaya TA, Rutkevich DA. [Assessment status of the antioxidant system transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress]. In: *Biotehnologiya v rastenievodstve, zhivotnovodstve i sel'skokhozyaistvennoi mikrobiologii: sbornik tezisev dokladov 19-i Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh, posvyashchennoi pamyati akademika RASKhN Georgiya Sergeevicha Muromtseva; 15–16 aprelya 2019 g.; Moskva, Rossiya* [Biotechnology in crop production, animal husbandry and agricultural microbiology: a collection of abstracts of the 19th All-Russian conference of young scientists dedicated to the memory of academician of the Russian Academy of Agricultural Sciences Georgy Sergeevich Muromtsev; 2019 April 15–16; Moscow, Russia]. Moscow: All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology; 2019. p. 55–56. Russian.

17. Yordi EG, Pérez EM, Matos MJ, Villares EU. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. In: Bouayed J, Bohn T, editors. *Nutrition, well-being and health*. Rijeka: InTech; 2012. p. 23–48. DOI: 10.5772/29471.

18. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(5):749–760. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00351-6.

Статья поступила в редакцию 16.12.2019.
Received by editorial board 16.12.2019.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТОГЕННЫХ,
САХАРОСНИЖАЮЩИХ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ
СВОЙСТВ КЛИТОРИИ ТРОЙЧАТОЙ (*CLITORIA TERNATEA* L.)
НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ *in vivo***

**О. И. ГУБИЧ¹⁾, Я. А. БАНДЫК¹⁾, Н. А. ЗАЛЕССКАЯ²⁾,
С. С. ОКОРОКОВА¹⁾, А. И. КАПАНИК¹⁾, А. Э. ГЕРАСИМОВА¹⁾**

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

²⁾РУП «Белмедпрепараты», ул. Фабрициуса, 30, 220007, г. Минск, Беларусь

Изучено влияние препарата клитории тройчатой (*Clitoria ternatea* L.) на показатели энергетического и углеводного обмена в условиях повышенной физической нагрузки, рассмотрена возможность коррекции им величин биохимических маркеров углеводного и липидного обмена в экспериментальных моделях гиперфагии и сахарного диабета, проанализирована эффективность стабилизации данным препаратом маркеров поражения печени и перекисного окисления липидов у крыс в экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации. Установлено, что отвар клитории тройчатой обладает адаптогенным эффектом, оказывает стабилизирующее, антиоксидантное и гепатопротекторное действие. Это может быть обусловлено наличием в составе растения флавоноидов, аскорбиновой кислоты, танинов и непредельных жирных кислот, проявляющих антиоксидантные свойства, а также дитерпенов, терпенов и гликозидов, способствующих повышению проницаемости клеточных мембран для глюкозы.

Ключевые слова: углеводный обмен; энергетический обмен; физическая нагрузка; экспериментальная гиперфагия; экспериментальный сахарный диабет; хроническая алкогольная интоксикация; перекисное окисление липидов; клитория тройчатая.

Образец цитирования:

Губич ОИ, Бандык ЯА, Залеская НА, Окорокова СС, Капаник АИ, Герасимова АЭ. Исследование адаптогенных, сахароснижающих и гепатопротекторных свойств клитории тройчатой (*Clitoria ternatea* L.) на экспериментальных моделях *in vivo*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2020;1:27–38. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-27-38>

For citation:

Hubich AI, Bandyk YA, Zalesskaya NA, Okarakava SS, Kapanic AI, Herasimava AE. The investigation of adaptogenic, hypoglycemic and hepatoprotective properties of *Clitoria ternatea* L. on experimental models *in vivo*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:27–38. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-27-38>

Авторы:

Оксана Игоревна Губич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Янина Александровна Бандык – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Наталья Александровна Залеская – специалист по фармаконадзору отдела фармаконадзора.

Светлана Сергеевна Окорокова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Алена Игоревна Капаник – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Алина Эдуардовна Герасимова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Authors:

Aksana I. Hubich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

hubich_oksana@tut.by

Yanina A. Bandyk, student at the faculty of biology.

yanabandyk@gmail.com

Natalya A. Zalesskaya, specialist in pharmacovigilance at the department of pharmacovigilance.

natik-name@mail.ru

Svyatlana S. Okarakava, student at the faculty of biology.

svetka_konfetti1999@gmail.com

Alena I. Kapanic, student at the faculty of biology.

kapanic1998@mail.ru

Alina E. Herasimava, student at the faculty of biology.

geralinka911@gmail.com

THE INVESTIGATION OF ADAPTOGENIC, HYPOGLYCEMIC AND HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF *CLITORIA TERNATEA* L. ON EXPERIMENTAL MODELS *in vivo*

A. I. HUBICH^a, Y. A. BANDYK^a, N. A. ZALESSKAYA^b,
S. S. OKARAKAVA^a, A. I. KAPANIC^a, A. E. HERASIMAVA^a

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

^bRUE «Belmedpreparaty», 30 Fabrycyusa Street, Minsk 220007, Belarus

Corresponding author: A. I. Hubich (hubich_oksana@tut.by)

This work is devoted to the study of the effect of *Clitoria ternatea* L. decoction for energy and carbohydrate metabolism in conditions of increased physical activity, the analysis of possibilities carbohydrate and lipid metabolism markers correcting in a model of experimental hyperphagia and experimental diabetes, and the efficiency of the stabilization of liver injury and lipid peroxidation markers in rats in an experimental model of chronic alcohol intoxication. It's established that *Clitoria ternatea* L. has a stabilizing effect on carbohydrate metabolism in rats with experimental diabetes and hyperphagia, exhibits antioxidant and hepatoprotective effect in rats with experimental alcoholic liver, comparable to the action of classical hepatoprotector «Hepsil-Rn», has adaptogenic effect in experimental model of physical activity, comparable to the energy drink «Burn». The effect of the prepatation tested was more pronounced under alloxan diabetes than the effect of the anti-diabetic «Sadifit» collection. The results obtained may be due to the presence of flavonoids, ascorbic acid, tannins and unsaturated fatty acids, exhibiting an antioxidant effect, as well as glycosides, terpenes and diterpenes, contributing to increased permeability of cell membranes for glucose.

Keywords: carbohydrate metabolism; energy metabolism; physical activity; experimental hyperphagia; experimental diabetes mellitus; chronic alcohol intoxication; lipid peroxidation; *Clitoria ternatea* L.

Введение

Клитория тройчатая (*Clitoria ternatea* L.) – дикорастущее и культивируемое растение семейства бобовых (Fabaceae), произрастающее в тропических лесах экваториальной и субэкваториальной климатических зон на территории Южной и Юго-Восточной Азии и широко используемое в народной индийской и тайской медицине, а также в кулинарии указанного региона в качестве синего пищевого красителя и для приготовления традиционного напитка (так называемого синего тайского чая) [1–3]. Фитохимический анализ выявил высокое содержание в листьях, цветках и корнях данного растения пентациклических тритерпеноидов (тараксерола, тараксерона), танинов, флобатанина, сапонинов, флавоноидов (кверцетина) и их гликозидов, сердечных гликозидов, стероидов, незаменимых аминокислот, специфических антоцианов (тернатинов С1–С5 и D3) и их гликозидов, витаминов группы В, аскорбиновой кислоты, ацилированных производных дельфинидина [4–7]. В семенах *Clitoria ternatea* L. обнаружены нуклеопротеин, аминокислотная последовательность которого сходна с инсулином, обладающий антимикробной активностью белок финотин и специфические лектины [8].

Столь разнообразный химический состав предопределил использование водных отваров и спиртовых настоек различных частей растения в нетрадиционной медицине. В частности, препараты корней, семян и листьев применяли для повышения тонуса головного мозга, улучшения памяти и интеллектуальной деятельности, а также в качестве антидепрессантного, седативного и противосудорожного средства [3]. Сок, полученный из цветков, рекомендовали при укусах насекомых и заболеваниях кожи, а настойку корней и семян – как мочегонный и противовоспалительный препарат [4].

В традиционной медицине данное растение не применяется, однако в последние годы оно начало активно проникать на европейский рынок. Клитория тройчатая пользуется большим спросом среди любителей фитотерапии и рядовых граждан как натуральное средство, обладающее тонизирующим, иммуностимулирующим, гиполипидемическим, антиоксидантным действием, улучшающее состояние сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, кожи и волос. Между тем ряд авторов обращают внимание на тот факт, что длительная история использования фитопрепаратов в народной медицине не может служить гарантией их безопасности и эффективности [9; 10]. С другой стороны,

детальное изучение фармакологических свойств растительных средств, характеризующихся многообразным химическим составом, безусловно, позволяет не только оценить потенциальную опасность их бесконтрольного ежедневного применения, но и установить ранее неизвестные полезные с точки зрения фармакологии биологические эффекты [9–12].

В связи с этим *Clitoria ternatea* L. подвергается всестороннему фармакологическому и токсикологическому исследованию. В настоящее время экспериментально подтверждена антиревматоидная, иммуномодуляторная, диуретическая и антиастматическая активность экстрактов корней клитории [3; 13], противовоспалительное действие экстрактов ее лепестков [14], болеутоляющий и антиоксидантный эффект спиртовых настоек листьев [15], способность водных вытяжек всех частей растения подавлять рост и жизнедеятельность целого ряда бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*) и проявлять антидепрессантный эффект [16; 17].

Цель настоящей работы – изучение адаптогенных, гепатопротекторных и сахароснижающих свойств отвара цветков клитории тройчатой (*Clitoria ternatea* L.) на экспериментальных моделях *in vivo*.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на беспородных белых мышах-самцах массой 30–50 г (исследование адаптогенных свойств *Clitoria ternatea* L. в условиях физической нагрузки) и на беспородных белых крысах-самцах массой 180–200 г (экспериментальные модели гиперфагии, сахарного диабета и хронического алкогольного поражения печени). Все эксперименты осуществлялись в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях, составленными на основании рекомендаций и требований Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Страсбург, 1986).

Во всех экспериментальных моделях использовали коммерческий препарат *Clitoria ternatea* L. (ООО «TeaShop», Россия). Отвар цветков готовили согласно прилагающейся инструкции (50 мг цветков на 200 мл воды) и предоставляли для питья соответствующим группам подопытных животных вместо воды (экспериментальные модели хронического алкогольного поражения печени, сахарного диабета и гиперфагии) или вводили в дозе 2 мл/кг однократно перорально с помощью пипетки перед проведением эксперимента (изучение адаптогенных свойств в условиях физической нагрузки).

Исследование адаптогенных свойств клитории в условиях физической нагрузки предполагало 10-минутное плавание животных в воде комнатной температуры (24,5 °С). Наступление утомления фиксировали по убыли концентрации глюкозы и приросту концентрации пирувата (предшественника молочной кислоты) в крови подопытных мышей, снижению содержания суммарной фракции макроэргов и отдельно креатинфосфата в скелетной мускулатуре. В качестве препарата сравнения в данной модели эксперимента использовали коммерческий энергетический напиток «Burn» (ИП «Кока-Кола Бевэриджис Украина Лимитед», Украина). Энергетик вводили лабораторным мышам однократно перорально с помощью пипетки в подобранной опытным путем дозе 2 мл/кг за 20 мин до начала эксперимента.

Для создания экспериментальной модели гиперфагии использовалась «ресторанная диета», рекомендованная Институтом фармакологии имени А. В. Валдьмана (Санкт-Петербург). Рацион диеты на 1 крысу в день включал: белый хлеб – 5 г, шоколадное печенье – 5 г, картофельные чипсы – 5 г, сырные крекеры – 5 г, молочный шоколад – 5 г, творог (5 %) – 10 г. Перечисленные продукты в измельченном виде предоставлялись крысам как постоянный выбор. Продолжительность диеты – 7 дней. Среднее энергопотребление у крыс, находившихся на данной диете, равнялось 220 ккал/сут. Содержание белков на 1 крысу составляло 7,2 г, жиров – 10,2, углеводов – 25,4 г.

Для создания экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации 96 % этанол разводили водой до 15 % и предоставляли для питья (как альтернативу воде) в течение 6 нед. лабораторным крысам, имевшим предрасположенность к алкоголизму, т. е. добровольно употреблявшим этиловый спирт в объеме (V_{cp}) 10–12 мл/сут. Указанная модель также была разработана Институтом фармакологии имени А. В. Валдьмана и использована нами без модификации.

Экспериментальный сахарный диабет индуцировался однократной внутрибрюшинной инъекцией аллоксана в дозе 100 мг/кг, выведение животных из эксперимента путем декапитации осуществлялось через 7 сут. В качестве препарата сравнения использовали аптечный противодиабетический сбор «Садифит» (ЗАО «Лектравы», Украина) следующего состава, г/г: побеги черники (0,2), створки плодов фасоли обыкновенной (0,2), чай зеленый листовый (0,15), листья мяты перечной (0,05), клубни топинамбура (0,2), листья стевии (0,2). Отвар данного препарата готовили в соответствии с прилагающейся инструкцией и предоставляли лабораторным животным для питья вместо воды в течение 7 сут.

В качестве эталонного растительного препарата гепатопротекторного действия использовали «Гепсил-Рн» (ООО «Рубикон», Беларусь), активным фармацевтическим компонентом которого является сухой экстракт из плодов расторопши пятнистой, эквивалентный 35 мг силимарина [18]. Водную суспензию этого препарата вводили интактным животным и крысам с алкогольным поражением печени в дозе 9 мг/кг перорально с помощью пипетки в течение 7 сут.

По окончании эксперимента животных подвергали декапитации и проводили измерение величин основных биохимических маркеров изучаемых патологий. Активность α -амилазы определяли по методу Каравея [19], аланинаминотрансферазы (АлАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) – спектрофотометрическим методом с использованием коммерческих наборов реагентов, содержание билирубина устанавливали по методу Йендрашика [19], суммарное количество основных макроэргов – по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты [20], содержание креатинфосфата – по приведенной в практикуме [21] методике, пирувата – модифицированным методом Умбрайтта [19], глюкозы – глюкозооксидазным методом с помощью коммерческого набора реагентов, восстановленных SH-групп – по методу Элмана [20], ТБК-активных продуктов – спектрофотометрическим методом [21], активность каталазы измеряли описанным в статье [22] способом, а супероксиддисмутазы (СОД) – по методу Костюка [23].

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с подсчетом среднего арифметического (\bar{X}), стандартной ошибки среднего арифметического ($\pm Sx$) и достоверности при уровне значимости $p \leq 0,05$. Для статистических расчетов использовали лицензионный пакет программ *Stadia 6.0*.

Результаты и их обсуждение

Первый этап нашей работы был посвящен изучению адаптогенных свойств отвара клитории тройчатой в условиях повышенной физической нагрузки, которая, как отмечалось выше, представляла собой 10-минутное плавание лабораторных мышей при температуре воды 24,5 °С. Данная нагрузка приводила к наступлению состояния утомления, выразившегося в неспособности животных совершать дальнейшие активные плавательные движения, что было проявлением закономерного снижения содержания макроэргов в скелетной мускулатуре (суммарное количество макроэргов оказалось ниже начальных значений на 60 %, содержание креатинфосфата – на 44 %), почти полного исчерпания концентрации глюкозы в крови (до 15,1 % от начального уровня) и, соответственно, накопления пирувата (+262 % к контролю) (табл. 1).

Иная картина наблюдалась при аналогичной физической нагрузке, но после однократного приема животными отвара клитории в экспериментально подобранной максимально эффективной дозе (2 мл/кг) за 20 мин до начала эксперимента. Так, снижение уровня макроэргов в скелетной мускулатуре было менее выраженным (суммарное содержание составило 63,5 % от исходного, содержание креатинфосфата – 70,9 %), как и уменьшение концентрации глюкозы в крови (–56,6 % к контролю) (см. табл. 1). Таким образом, в условиях физической нагрузки отвар клитории тройчатой проявил важнейшее свойство препаратов группы адаптогенов – обеспечение более экономного расходования субстратов и появления у организма способности оптимального функционирования при меньших затратах энергии, что и делает возможной адаптацию к повышенным нагрузкам [24]. Примечательно, что наблюдаемый эффект реализовался уже после первого приема отвара, что характерно для немногих растительных адаптогенов (например, железницы крымской, рододендрона Адамса) [25; 26]. Высокая скорость реализации стимулирующего эффекта указывает на то, что, вероятно, непосредственные мишени действия активных компонентов исследуемого отвара располагаются не в скелетной мускулатуре, оказывается опосредованное влияние через центральную нервную систему или путем выброса простагландинов. Для установления более точного механизма действия клитории тройчатой в условиях физической нагрузки требуются дополнительные исследования.

Обращает на себя внимание тот факт, что пероральное введение исследуемого отвара интактным мышам в отсутствие физической нагрузки не сопровождалось выраженными изменениями анализируемых показателей углеводного и энергетического обмена (см. табл. 1), что соответствует первому требованию, предъявляемому к адаптогенным препаратам, согласно которому адаптоген может действовать только на соответствующем фоне, с минимальными сдвигами в нормальных условиях или без них [24]. Интересно, что близкие изменения анализируемых показателей наблюдались и при использовании препарата сравнения – энергетика «Вигн» в аналогичной дозе (см. табл. 1).

Следующий этап работы был посвящен определению гепатопротекторной активности клитории тройчатой в экспериментальной модели алкогольного поражения печени. Основанием для постановки этой серии экспериментов послужил тот факт, что в соответствии с рядом исследований этанольные экстракты листьев изучаемого растения проявляли гепатопротекторные свойства в экспериментальных моделях парацетамол- и CCl_4 -индуцированного поражения печени, снижая активность сывороточных аминотрансфераз и содержание общего билирубина [1; 3].

Таблица 1

Значение параметров углеводного и энергетического обмена у лабораторных мышей, подвергнутых физической нагрузке, при использовании энергетического напитка «Burn» и отвара клитории тройчатой

Table 1

The value of the carbohydrate and energy metabolism parameters of laboratory mice subjected to physical activity when using energy drink «Burn» and *Clitoria ternatea* L. decoction

Серия эксперимента	Содержание макроэргов в мышцах, мкмоль/г	Содержание креатинфосфата в мышцах, мкмоль/г	Содержание пирувата, мкг/мл	Концентрация глюкозы, ммоль/л
Интактные мыши	0,27 ± 0,07 (100 %)	2,65 ± 0,17 (100 %)	0,29 ± 0,06 (100 %)	10,60 ± 1,45 (100 %)
Мыши, подвергнутые физической нагрузке	0,11 ± 0,05 (40,1 %)*	1,49 ± 0,04 (56,0 %)*	1,05 ± 0,25 (362,1 %)*	1,60 ± 0,29 (15,1 %)*
Отвар клитории тройчатой	0,24 ± 0,06 (88,9 %)	2,40 ± 0,10 (90,6 %)	0,26 ± 0,04 (89,7 %)	9,70 ± 0,36 (91,5 %)
Отвар клитории тройчатой на фоне физической нагрузки	0,17 ± 0,07 (63,5 %)* ^a	1,88 ± 0,08 (70,9 %)* ^a	0,81 ± 0,17 (279,3 %)* ^a	4,60 ± 0,35 (43,4 %)* ^a
Энергетик «Burn»	0,28 ± 0,05 (102,2 %)	2,50 ± 0,16 (94,3 %)	0,36 ± 0,04 (124,1 %)*	9,40 ± 0,49 (88,7 %)*
Энергетик «Burn» на фоне физической нагрузки	0,03 ± 0,01 (12,2 %)* ^a	1,87 ± 0,15 (70,64 %)* ^a	0,92 ± 0,10 (317,24 %)	5,00 ± 0,95 (47,17 %)* ^a

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, ^aРезультаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность влияния физической нагрузки, энергетика «Burn» и отвара клитории тройчатой рассчитана по отношению к значениям анализируемых маркеров интактных мышей (*), а эффектов исследуемых препаратов при физической нагрузке – к показателям интактных животных, подвергнутых 10-минутному плаванию в воде (^a).

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 2, хроническое 5-недельное спаивание крыс этанолом приводит к выраженным изменениям всех анализируемых показателей: увеличению активности маркерных ферментов печени в сыворотке крови подопытных крыс (АлАТ – на 58,6 %, ЩФ – на 77,8 %), повышению содержания билирубина (свободного – на 148,4 %, связанного – на 52,5 %), подавлению альбумин-синтезирующей функции печени (снижение содержания альбумина в сыворотке крови составило 33 %).

Известно, что метаболизм этанола в печени осуществляется при помощи трех ферментных систем – алкогольдегидрогеназы, цитохрома P₄₅₀2E1 (CYP2E1) и каталазы [27]. Под действием алкогольдегидрогеназы и CYP2E1 алкоголь метаболизируется в ацетальдегид, который может опосредованно активировать перекисное окисление липидов (ПОЛ), что связано с его способностью снижать в гепатоцитах содержание восстановленного глутатиона, абсолютно необходимого для функционирования глутатионпероксидазы, участвующей в катаболизме H₂O₂ [28]. Накопление активных форм кислорода, в свою очередь, приводит к нарушению структуры липидного бислоя мембран клеток печени, что предопределяет возможность развития острого алкогольного гепатита и цирроза печени у алкоголиков [28].

Действительно, как свидетельствуют результаты, представленные в табл. 3, хроническое спаивание крыс этанолом вызывало повышение содержания ТБК-активных продуктов в печени на 51,5 %, увеличение активности каталазы на 38,9 %, а также снижение содержания восстановленных SH-групп на 41,3 %, что хорошо согласуется как с первоначальной гипотезой, так и с литературными данными [28; 29].

На следующем этапе исследования крысам с хроническим алкогольным поражением печени в рацион вводили широко используемый в медицинской практике гепатопротектор растительного происхождения «Гепсил-Рн». Входящие в его состав биофлавоноиды обеспечили выраженный антиоксидантный эффект и способствовали частичному восстановлению функций гепатоцитов у крыс, подвергшихся хроническому алкогольному воздействию (см. табл. 2 и 3). Так, установлено, что после ежедневного применения препарата «Гепсил-Рн» в течение 7 сут в экспериментальной модели хронического алкогольного воздействия активность АлАТ снизилась на 37,3 %, активность ЩФ – на 56,2 %, содержание свободного и связанного билирубина – на 40,1 и 46,2 % соответственно. Описанные изменения

сопровождались и некоторой стабилизацией величин изучаемых показателей ПОЛ: содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате печени крыс уменьшилось на 32,9 %, а содержание восстановленных SH-групп повысилось на 20,2 % по сравнению с показателями животных с хроническим поражением печени этанолом, не получавших препарат. Приведенные данные хорошо согласуются с ранее представленными результатами [29].

Таблица 2

Влияние отвара клитории тройчатой и препарата гепатопротекторного ряда «Гепсил-Рн» на показатели поражения печени в сыворотке крови интактных крыс и животных с экспериментальной алкогольной интоксикацией

Table 2

The effect of *Clitoria ternatea* L. decoction and hepatoprotective drug «Hepsil-Rn» on the liver damage markers in the blood serum of intact rats and animals with experimental alcohol intoxication

Серия эксперимента	Содержание альбумина, г/л	Активность ЩФ, мкмоль/л	Активность АЛАТ, молей НАДН в минуту	Содержание свободного билирубина, мкмоль/л	Содержание связанного билирубина, мкмоль/л
Интактные крысы	38,1 ± 4,1 (100 %)	121,0 ± 5,8 (100 %)	20,2 ± 1,5 (100 %)	6,2 ± 1,2 (100 %)	9,2 ± 1,6 (100 %)
Алкогольное поражение печени	25,4 ± 0,9 (67,0 %)*	215,1 ± 6,9 (177,8 %)*	32,1 ± 1,8 (158,6 %)*	15,4 ± 3,8 (248,4 %)*	14,0 ± 2,9 (152,5 %)*
«Гепсил-Рн» (7 сут)	39,1 ± 4,1 (102,6 %)	138,8 ± 11,5 (114,7 %)	23,6 ± 1,7 (116,9 %)	5,8 ± 0,9 (94,1 %)	6,7 ± 0,8 (104,7 %)
Отвар клитории тройчатой (7 сут)	34,9 ± 2,2 (91,6 %)	102,4 ± 6,8 (84,3 %)	21,9 ± 1,1 (108,4 %)	4,6 ± 1,0 (74,2 %)*	10,2 ± 1,6 (110,9 %)
«Гепсил-Рн» на фоне алкогольного поражения печени	37,0 ± 4,1 (97,1 %)* ^a	147,1 ± 2,6 (121,6 %)* ^a	24,5 ± 3,5 (121,3 %)* ^a	11,6 ± 1,2 (188,1 %)* ^a	6,8 ± 1,1 (106,3 %)* ^a
Отвар клитории тройчатой на фоне алкогольного поражения печени	26,5 ± 1,2 (69,6 %)	87,7 ± 5,6 (72,5 %)* ^a	29,7 ± 3,9 (146,5 %)* ^a	6,3 ± 1,2 (101,6 %)* ^a	10,8 ± 1,1 (109,1 %)* ^a

Пр и м е ч а н и е. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, *^aРезультаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность эффектов этанола, препарата «Гепсил-Рн» и отвара клитории тройчатой оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов аптечного гепатопротектора и исследуемого отвара, вводимых крысам с экспериментальным поражением печени, – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших изучаемый препарат (*^a).

Таблица 3

Влияние отвара клитории тройчатой и препарата гепатопротекторного ряда «Гепсил-Рн» на показатели ПОЛ и активность каталазы в печени интактных крыс и животных с экспериментальной алкогольной интоксикацией

Table 3

The effect of *Clitoria ternatea* L. decoction and hepatoprotective drug «Hepsil-Rn» on the indicators of lipid peroxidation and catalase activity in liver of intact rats and animals with experimental alcohol intoxication

Серия эксперимента	Содержание SH-групп, ммоль/л	Содержание ТБК-активных продуктов, мкмоль/л	Активность каталазы, миллимолей H ₂ O ₂ на 1 мг белка в минуту
Интактные крысы	155,4 ± 5,7 (100 %)	0,45 ± 0,1 (100 %)	23,9 ± 0,9 (100 %)
Алкогольное поражение печени	91,2 ± 6,5 (58,7 %)*	0,68 ± 0,1 (151,1 %)*	33,2 ± 1,5 (138,9 %)*
«Гепсил-Рн» (7 сут)	143,8 ± 7,3 (92,5 %)	0,52 ± 0,1 (115,9 %)	13,9 ± 0,7 (116,5 %)

Окончание табл. 3
Ending table 3

Серия эксперимента	Содержание SH-групп, ммоль/л	Содержание ТБК-активных продуктов, мкмоль/л	Активность каталазы, миллимолей H ₂ O ₂ на 1 мг белка в минуту
Отвар клитории тройчатой (7 сут)	148,3 ± 3,5 (95,4 %)	0,48 ± 0,1 (107,1 %)	29,3 ± 1,7 (122,6 %)*
«Гепсил-Рн» на фоне алкогольного поражения печени	122,3 ± 4,4 (78,9 %)* ^a	0,53 ± 0,1 (118,2 %)* ^a	32,5 ± 2,3 (136,2 %)
Отвар клитории тройчатой на фоне алкогольного поражения печени	131,4 ± 5,1 (84,3 %)* ^a	0,57 ± 0,1 (126,7 %)* ^a	35,9 ± 0,9 (150,2 %)

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, **Результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность эффектов этанола, аптечных гепатопротекторов и растительных отваров оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов коммерческих гепатопротекторов и растительных отваров, вводимых крысам с экспериментальным поражением печени, – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших изучаемый препарат (*^a).

Анализ же показателей крыс с алкогольным поражением печени, ежедневно употреблявших отвар клитории, демонстрирует проявление им защитного действия. В частности, каждодневный его прием подопытными животными сопровождался снижением активности ЩФ на 105,3 %, АлАТ – на 12,1 %, уменьшением содержания свободного и связанного билирубина до значений, статистически неотличимых от уровня интактных крыс (см. табл. 2). С гепатопротекторным действием коррелировали и антиоксидантные свойства данного средства. Так, содержание ТБК-активных продуктов в печени крыс, употреблявших отвар клитории тройчатой, снизилось на 24 %, а содержание восстановленных SH-групп увеличилось на 25,6 % по сравнению с животными, не получавшими отвар, отмечалась тенденция к повышению активности каталазы (см. табл. 3). Способность препаратов клитории проявлять антиоксидантные свойства была зафиксирована прежде на экспериментальных моделях индуцированного ацетаминофеном поражения почек и парацетамол-индуцированного повреждения печени. Защитный эффект коррелировал также со снижением содержания малонового диальдегида, увеличением содержания восстановленного глутатиона, повышением активности глутатионпероксидазы и СОД [3]. Более того, водные экстракты цветков клитории демонстрировали антиоксидантную активность *in vitro*, предотвращая ПОЛ и окисление функциональных групп белков в эритроцитах [30]. По мнению большинства авторов, такую активность, проявляемую препаратами этого растения *in vivo* и *in vitro*, определяют флавоноиды, танины, кумарины и незаменимые жирные кислоты [4; 8].

Таким образом, способность клитории тройчатой подавлять интенсивность ПОЛ, описанная в литературе, была продемонстрирована нами и на модели хронического поражения печени алкоголем. Логичным продолжением данного исследования, на наш взгляд, явилось изучение отвара цветков клитории тройчатой на экспериментальной модели аллоксан-индуцированного сахарного диабета. Как известно, аллоксан вызывает гибель инсулин-продуцирующих β -клеток в островках поджелудочной железы *in vivo*, что связано с продуцированием во внеклеточной среде и непосредственно в β -клетках супероксид-анион-радикалов (O₂⁻) [21].

Эффективность используемой модели определялась измерением концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс. Кроме того, как свидетельствуют результаты табл. 4, развитие экспериментального сахарного диабета у крыс сопровождалось изменением величин важнейших маркеров углеводного обмена: повышением активности α -амилазы на 53,8 % и увеличением содержания пирувата в цельной крови на 69,0 %.

Необходимо заметить, что в ряде работ показан достоверный антидиабетический эффект водных экстрактов листьев исследуемого растения и спиртовых экстрактов его корней и цветков [4; 30]. Так, установлено, что 84-дневное пероральное их введение крысам с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом обеспечивает снижение концентрации глюкозы, гликозилированного гемоглобина, активности глюкозо-6-фосфатазы в сыворотке крови, но увеличивает запасы гликогена в печени и скелетной мускулатуре, повышает активность глюкокиназы и инсулина [30]. Кроме того, показано, что перечисленные препараты ингибируют процесс гликозилирования сывороточного альбумина в условиях гипергликемии, предотвращая тем самым возможность развития осложненной сахарного диабета [30].

В наших экспериментах употребление в течение 7 дней крысами с аллоксановым диабетом отвара цветков клитории тройчатой как альтернативы питьевой воде значительно улучшало анализируемые маркеры сыворотки крови (см. табл. 4). Так, концентрация глюкозы в данном случае снижалась в 4,3 раза, активность α -амилазы – в 1,5 раза, содержание пирувата – на 25 % по сравнению с таковыми у животных,

страдающих диабетом, но не получавших препарат. Таким образом, отвар цветков клитории действительно способен значительно улучшать показатели углеводного обмена крыс с экспериментальным диабетом, что может быть обусловлено стимулированием им поглощения глюкозы клетками и активацией ее депонирования в форме гликогена, как это описано для экспериментальной модели сахарного диабета, индуцированного стрептозотоцином [4].

Таблица 4

Влияние отваров клитории тройчатой и сбора «Садифит» на показатели углеводного обмена в сыворотке крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Table 4

The effect of *Clitoria ternatea* L. and «Sadifit» decoctions on carbohydrate metabolism serum markers in rats with experimental diabetes mellitus

Серия эксперимента	Содержание пирувата, мкг/мл	Активность α-амилазы, граммов крахмала на 1 л в час	Концентрация глюкозы, ммоль/л
Интактные крысы	8,4 ± 0,9 (100 %)	23,2 ± 1,1 (100 %)	6,5 ± 0,72 (100 %)
Экспериментальный сахарный диабет	14,2 ± 0,9 (169,0 %)*	35,7 ± 6,0 (153,8 %)*	32,8 ± 1,1 (507,1 %)*
Отвар клитории тройчатой	3,6 ± 2,1 (42,9 %)*	23,3 ± 1,4 (100,4 %)	5,5 ± 1,2 (84,6 %)*
Отвар клитории тройчатой на фоне экспериментального сахарного диабета	3,7 ± 0,31 (144,1 %)* ^a	23,7 ± 1,1 (102,2 %)* ^a	7,6 ± 1,5 (116,9 %)* ^a
Отвар сбора «Садифит»	10,7 ± 1,1 (126,9 %)*	22,2 ± 2,3 (95,8 %)	9,2 ± 0,9 (140,6 %)*
Отвар сбора «Садифит» на фоне экспериментального сахарного диабета	12,3 ± 0,6 (146,2 %)* ^a	32,4 ± 2,6 (139,5 %)	5,5 ± 0,6 (84,4 %)* ^a

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, ^aРезультаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность эффектов аллоксана и растительных отваров оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов растительных отваров, вводимых крысам с экспериментальным сахарным диабетом, – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших отвар (*^a).

В качестве препарата сравнения на данном этапе мы использовали аптечный растительный сбор «Садифит», обладающий гипогликемизирующим действием при сахарном диабете, что, согласно инструкции, в ряде случаев позволяет снизить суточную дозу пероральных антидиабетических средств. Как следует из табл. 4, этот препарат существенно нормализует изучаемые параметры у крыс. Установлено, что в его присутствии концентрация глюкозы у животных, страдающих сахарным диабетом, снизилась в 6 раз, активность α-амилазы – на 14,3 %, содержание пирувата – на 23,0 %. Таким образом, растительный сбор «Садифит» и отвар цветков клитории тройчатой оказывали выраженное нормализующее действие при использовании в модели сахарного диабета, вызванного введением аллоксана.

На заключительном этапе работы нами было проанализировано еще одно прежде не описанное свойство цветков клитории – способность корректировать изменения углеводного и липидного обмена у крыс с экспериментальной гиперфагией. Известно, что в последние десятилетия во всем мире наблюдается рост числа пациентов, страдающих ожирением, что можно объяснить увеличением в рационе высококалорийных и богатых жирами продуктов [31]. Одной из причин повышенного употребления калорийной пищи служит гиперфагия, причем немаловажную роль в формировании зависимости от еды играет ее разнообразие. Установлено, что предоставление лабораторным животным возможности выбирать продукты питания увеличивает суточную калорийность их рациона и сопровождается повышенной секрецией дофамина в головном мозге. Напротив, лишение животных сахара приводит к снижению синтеза дофамина и повышению синтеза ацетилхолина, что характерно для животных с синдромом отмены алкоголя, никотина и различных наркотических веществ. Таким образом, серьезные перестройки нейротрансмиттерной системы головного мозга, наблюдаемые при гиперфагии, ее широкое распространение и непосредственная связь с первичным алиментарным ожирением, риск развития сопутствующих заболеваний требуют детального изучения данной патологии и изыскания безопасных

и эффективных средств терапии [32]. Анализ доступной литературы позволил установить, что спиртовые экстракты корней и семян клитории снижают показатели общего холестерина, триацилглицеринов, липопротеинов низкой и очень низкой плотности, а также коэффициент атерогенности при алиментарном ожирении [33] с эффективностью, характерной для аторвастатина (50 мг/мл) и гемфиброзина (50 мг/кг). Предполагается, что компоненты клитории тройчатой способны увеличивать экскрецию холестерина с желчью и снижать абсорбцию холестерина пищи [33].

В нашей работе гиперфагия была вызвана нахождением животных на «ресторанной диете», подробное описание которой представлено в разделе «Материалы и методы исследования». Содержание животных на данной диете в течение 7 сут привело к заметным изменениям важнейших биохимических маркеров углеводного и липидного обмена. Так, концентрация глюкозы в крови возросла на 48,5 %, содержание пирувата увеличилось на 36,3 % к контролю, концентрация холестерина – на 58,1 %, триацилглицеринов – на 64,9 % (табл. 5). Ежедневный прием при несбалансированном питании отвара клитории тройчатой в течение 7 сут (среднее потребление 12–15 мл на 1 крысу) способствовал снижению нежелательного изменения анализируемых биохимических маркеров. Так, содержание пирувата в данной серии эксперимента снизилось на 66 % по сравнению с показателями крыс, употреблявших высококалорийную пищу, концентрация глюкозы уменьшилась до уровня, характерного для интактных животных, а концентрация холестерина оказалась ниже, чем у интактных крыс (см. табл. 5).

Таблица 5

Влияние препарата клитории тройчатой на показатели углеводного и липидного обмена в сыворотке крови интактных крыс и животных с экспериментальной гиперфагией

Table 5

The effect of *Clitoria ternatea* L. preparation on the carbohydrate and lipid metabolism serum parameters in intact rats and animals with experimental hyperphagia

Серия эксперимента	Показатели углеводного обмена		Показатели липидного обмена	
	Содержание пирувата, мкг/мл	Концентрация глюкозы, моль/л	Концентрация холестерина, ммоль/л	Концентрация триглицеринов, ммоль/л
Интактные крысы (контроль)	3,42 ± 0,29 (100 %)	3,82 ± 0,10 (100 %)	1,88 ± 0,17 (100 %)	14,44 ± 1,73 (100 %)
Экспериментальная гиперфагия	4,66 ± 0,81 (136,3 %)*	5,67 ± 0,13 (148,5 %)*	2,97 ± 0,05 (158,1 %)*	23,81 ± 1,36 (164,9 %)*
Отвар клитории тройчатой	2,68 ± 0,45 (78,3 %)	2,83 ± 0,14 (74,1 %)*	1,69 ± 0,07 (89,8 %)	12,20 ± 1,19 (84,5 %)
Отвар клитории тройчатой на фоне экспериментальной гиперфагии	4,05 ± 0,30 (118,5 %)* ^a	3,84 ± 0,04 (100,5 %)* ^a	1,60 ± 0,12 (85,1 %)* ^a	23,93 ± 1,14 (165,7 %)

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, **Результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность изменения показателей крыс с гиперфагией и эффектов исследуемого препарата, вводимого интактным животным, оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*); достоверность эффектов отвара клитории тройчатой на маркеры углеводного и липидного обмена крыс с гиперфагией – по отношению к соответствующим показателям крыс с указанной патологией (*^a).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что отвар клитории тройчатой способствует нормализации углеводного обмена крыс как при экспериментальном диабете, так и при индуцированной гиперфагии, оказывает антиоксидантное и гепатопротекторное влияние на животных с экспериментальным алкогольным поражением печени, превосходящее по ряду показателей действие классического гепатопротектора «Гепсил-Рн», обладает адаптогенным эффектом в условиях физической нагрузки, сопоставимым с таковым энергетического напитка «Burn». Указанные эффекты могут быть обусловлены наличием в составе данного растения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и непредельных жирных кислот, проявляющих антиоксидантные свойства, а также дитерпенов, терпенов и гликозидов, способствующих, как известно, повышению проницаемости клеточных мембран для глюкозы.

Библиографические ссылки

1. Gupta GK, Chahal J, Bhatia M. *Clitoria ternatea* (L.): old and new aspects. *Journal of Pharmacy Research* [Internet]. 2010 [cited 2019 September 15];3(11):2610–2614. Available from: <http://jprsolutions.info/files/final-file-55851d33acdcd1.19607307.pdf>.
2. Muhammad Ezzudin R, Rabeta MS. A potential of Telang tree (*Clitoria ternatea*) in human health. *Food Research* [Internet]. 2018 [cited 2019 September 15];2(5):415–420. Available from: https://www.myfoodresearch.com/uploads/8/4/8/5/84855864/_2_fr-2018-073_ezzudin_1.pdf. DOI: 10.26656/fr.2017.2(5).073.
3. Gollen B, Mehla J, Gupta P. *Clitoria ternatea* Linn: a herb with potential pharmacological activities: future prospects as therapeutic herbal medicine. *Journal of Pharmacological Reports* [Internet]. 2018 [cited 2019 September 15];3(1):141. Available from: <https://www.longdom.org/open-access/clitoria-ternatea-linn-a-herb-with-potential-pharmacological-activitiesfuture-prospects-as-therapeutic-herbal-medicine.pdf>.
4. Al-Snafi AE. Pharmacological importance of *Clitoria ternatea* – a review. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2016;6(3):68–83.
5. Kumar V, Mukherjee K, Kumar S, Mal M, Mukherjee PK. Validation of HPTLC method for the analysis of taraxerol in *Clitoria ternatea*. *Phytochemical Analysis*. 2008;19(3):244–250. DOI: 10.1002/pca.1042.
6. Terahara N, Toki K, Saito N, Honda T, Matsui T, Osajima Y. Eight new anthocyanins, ternatins C1–C5 and D3 and preternatins A3 and C4 from young *Clitoria ternatea* flowers. *Journal of Natural Products*. 1998;61(11):1361–1367.
7. Thakur AV, Ambwani S, Ambwani TK, Ahmad AH, Rawat DS. Evaluation of phytochemicals in the leaf extract of *Clitoria ternatea* Willd. through GC-MS analysis. *Tropical Plant Research*. 2018;5(2):200–206. DOI: 10.22271/tpr.2018.v5.i2.025.
8. Joshi SS, Shrivastava RK, Shrivastava DK. Chemical examination of *Clitoria ternatea* seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1981;58(6):714.
9. Булаев ВМ, Ших ЕВ, Сычев ДА. *Современная фитотерапия*. Москва: МЕДпресс-информ; 2011. 144 с.
10. Вайс РФ, Финтельманн Ф. *Фитотерапия: руководство*. Коршикова ЮИ, переводчик; Шретер АИ, редактор. Москва: Медицина; 2004. 552 с.
11. Самылина ИА, Сорокина АА. *Атлас лекарственных растений и сырья*. Москва: Авторская академия; 2008. 318 с.
12. Ковалева НГ. Лечение травами. *Очерки по фитотерапии*. Москва: Медицина; 1972. 356 с.
13. Bharathree RC, Ranjith P, Chandana AK, Jayakody JRAC, Daya RW. *In vitro* antirheumatoid arthritic activity of aqueous root extract of *Clitoria ternatea*. *International Research Journal of Pharmacy* [Internet]. 2014 [cited 2019 September 15];5(12):926–928. Available from: https://irjponline.com/admin/php/uploads/2280_pdf.pdf. DOI: 10.7897/2230-8407.0512188.
14. Nair V, Bang WY, Schreckinger E, Andarwulan N, Zevallos LC. Protective role of ternatin anthocyanins and quercetin glycosides from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) blue flower petals against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(28):6355–6365. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00928.
15. Ramaswamy V, Varghese N, Simon A. An investigation on cytotoxic and antioxidant properties of *Clitoria ternatea* L. *International Journal of Drug Discovery*. 2011;3(1):74–77.
16. Nadzirah J, Furzani P. Antimicrobial activity from leaf, flower, stem, and root of *Clitoria ternatea* – a review. *AIP Conference Proceedings*. 2018;2002(1):020044. DOI: 10.1063/1.5050140.
17. Mukherjee PK, Kumar V, Kumar NS, Heinrich M. The Ayurvedic medicine *Clitoria ternatea* – from traditional use to scientific assessment. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;120(3):291–301. DOI: 10.1016/j.jep.2008.09.009.
18. Машковский МД. *Лекарственные средства*. 16-е издание. Москва: Новая волна; 2012. 1216 с.
19. Колб ВГ, Камышников ВС. *Справочник по клинической химии*. 2-е издание. Минск: Беларусь; 1982. 366 с.
20. Северин СЕ, Соловьева ГА, редакторы. *Практикум по биохимии*. 2-е издание. Москва: Издательство Московского университета; 1989. 509 с.
21. Губич ОИ, составитель. *Медицинская биохимия. Практикум*. Минск: БГУ; 2014. 100 с.
22. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
23. Костюк ВА, Потапович АИ, Ковалева ЖВ. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии*. 1990;36(2):88–91.
24. Яременко КВ. Учение Н. В. Лазарева о СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины. *Психофармакология и биологическая наркология* [Интернет]. 2005 [процитировано 15 сентября 2019 г.];5(4):1089–1092. Доступно по: <http://psychopharmacology.ru/index.php/PPBN/article/view/234/136>.
25. Губич ОИ, Пучкова КВ, Залеская НА, Крючкова НВ. Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.) на экспериментальных моделях *in vivo*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;1:60–68.
26. Николаеня ЕВ, Губич ОИ. Влияние препарата железницы крымской (*Sideritis scandica*) на показатели углеводного обмена сыворотки крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом. В: *Материалы VI Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Біологічні дослідження – 2015»; 10–11 марта 2015 г.; Житомир, Украина*. Житомир: Рута; 2015. с. 414–415.
27. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2000;76(895):280–286. DOI: 10.1136/pmj.76.895.280.
28. Ковалев ГА, Петренко АЮ. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс. *Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия: Медицина*. 2004;8:15–18.
29. Губич ОИ, Дашкова ЯЮ, Кривленя ИИ. Сравнительная оценка гепатопротекторных свойств растительных адаптогенов на экспериментальной модели хронического алкогольного поражения печени *in vivo*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:54–62.
30. Zingare ML, Zingare PL, Dubey AK, Ansari A. *Clitoria ternatea* (Aparajita): a review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2013;3(1):203–213.
31. Ялочкина ТО, Пигарова ЕА. Гиперфагия и ожирение. *Ожирение и метаболизм*. 2013;10(1):14–17. DOI: 10.14341/2071-8713-5065.
32. Berthoud H-R, Lenard NR, Shin AC. Food reward, hyperphagia, and obesity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(6):R1266–R1277. DOI: 10.1152/ajpregu.00028.2011.
33. Solanki YB, Jain SM. Antihyperlipidemic activity of *Clitoria ternatea* and *Vigna mungo* in rats. *Pharmaceutical Biology*. 2010;48(8):915–923.

References

- Gupta GK, Chahal J, Bhatia M. *Clitoria ternatea* (L.): old and new aspects. *Journal of Pharmacy Research* [Internet]. 2010 [cited 2019 September 15];3(11):2610–2614. Available from: <http://jprsolution.info/files/final-file-55851d33acdcd1.19607307.pdf>.
- Muhammad Ezzudin R, Rabeta MS. A potential of Telang tree (*Clitoria ternatea*) in human health. *Food Research* [Internet]. 2018 [cited 2019 September 15];2(5):415–420. Available from: https://www.myfoodresearch.com/uploads/8/4/8/5/84855864/2_fr-2018-073_ezzudin_1.pdf. DOI: 10.26656/fr.2017.2(5).073.
- Göllen B, Mehla J, Gupta P. *Clitoria ternatea* Linn: a herb with potential pharmacological activities: future prospects as therapeutic herbal medicine. *Journal of Pharmacological Reports* [Internet]. 2018 [cited 2019 September 15];3(1):141. Available from: <https://www.longdom.org/open-access/clitoria-ternatea-linn-a-herb-with-potential-pharmacological-activitiesfuture-prospects-as-therapeutic-herbal-medicine.pdf>.
- Al-Snafi AE. Pharmacological importance of *Clitoria ternatea* – a review. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2016;6(3):68–83.
- Kumar V, Mukherjee K, Kumar S, Mal M, Mukherjee PK. Validation of HPTLC method for the analysis of taraxerol in *Clitoria ternatea*. *Phytochemical Analysis*. 2008;19(3):244–250. DOI: 10.1002/pca.1042.
- Terahara N, Toki K, Saito N, Honda T, Matsui T, Osajima Y. Eight new anthocyanins, ternatins C1–C5 and D3 and preternatins A3 and C4 from young *Clitoria ternatea* flowers. *Journal of Natural Products*. 1998;61(11):1361–1367.
- Thakur AV, Ambwani S, Ambwani TK, Ahmad AH, Rawat DS. Evaluation of phytochemicals in the leaf extract of *Clitoria ternatea* Willd. through GC-MS analysis. *Tropical Plant Research*. 2018;5(2):200–206. DOI: 10.22271/tpr.2018.v5.i2.025.
- Joshi SS, Shrivastava RK, Shrivastava DK. Chemical examination of *Clitoria ternatea* seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1981;58(6):714.
- Bulaev VM, Shikh EV, Sychev DA. *Sovremennaya fitoterapiya* [Modern phytotherapy]. Moscow: MEDpress-inform; 2011. 144 p. Russian.
- Weiss RF, Fintelmann V. *Lehrbuch der Phytotherapie*. Stuttgart: Hippokrates; 1999. 485 s.
Russian edition: Weiss RF, Fintelmann V. *Fitoterapiya: rukovodstvo*. Korshikova YuI, translator; Shreter AI, editor. Moscow: Meditsina; 2004. 552 p.
- Samylina IA, Sorokina AA. *Atlas lekarstvennykh rastenii i syr'ya* [The atlas of medicinal plants and raw materials]. Moscow: Avtorskaya akademiya; 2008. 318 p. Russian.
- Kovaleva NG. *Lechenie travami. Ocherki po fitoterapii* [Herbal treatment. Essays on phytotherapy]. Moscow: Meditsina; 1972. 356 p. Russian.
- Bharathee RC, Ranjith P, Chandana AK, Jayakody JRAC, Daya RW. *In vitro* antirheumatoid arthritic activity of aqueous root extract of *Clitoria ternatea*. *International Research Journal of Pharmacy* [Internet]. 2014 [cited 2019 September 15];5(12):926–928. Available from: https://irjponline.com/admin/php/uploads/2280_pdf.pdf. DOI: 10.7897/2230-8407.0512188.
- Nair V, Bang WY, Schreckinger E, Andarwulan N, Zevallos LC. Protective role of ternatin anthocyanins and quercetin glycosides from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) blue flower petals against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(28):6355–6365. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00928.
- Ramaswamy V, Varghese N, Simon A. An investigation on cytotoxic and antioxidant properties of *Clitoria ternatea* L. *International Journal of Drug Discovery*. 2011;3(1):74–77.
- Nadzirah J, Furzani P. Antimicrobial activity from leaf, flower, stem, and root of *Clitoria ternatea* – a review. *AIP Conference Proceedings*. 2018;2002(1):020044. DOI: 10.1063/1.5050140.
- Mukherjee PK, Kumar V, Kumar NS, Heinrich M. The Ayurvedic medicine *Clitoria ternatea* – from traditional use to scientific assessment. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;120(3):291–301. DOI: 10.1016/j.jep.2008.09.009.
- Mashkovskii MD. *Lekarstvennye sredstva* [Medicines]. 16th edition. Moscow: Novaya volna; 2012. 1216 p. Russian.
- Kolb VG, Kamyshnikov VS. *Spravochnik po klinicheskoi khimii* [Handbook of clinical and biochemical diagnostics]. 2nd edition. Minsk: Belarus'; 1982. 366 p. Russian.
- Severin SE, Solov'eva GA, editors. *Praktikum po biokhimi* [Workshop on biochemistry]. 2nd edition. Moscow: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta; 1989. 509 p. Russian.
- Hubich AI, compiler. *Meditsinskaya biokhimiya. Praktikum* [Medical biochemistry. Workshop]. Minsk: Belarusian State University; 2014. 100 p. Russian.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZnV. A simple, sensitive assay for determination of superoxide dismutase activity based on reaction of quercetin oxidation. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1990;36(2):88–91. Russian.
- Jaremenko KV. The N. V. Lazarev's theory of State Unspecific Increased Resistance (SUIR) and adaptogens as a basis of preventive medicine. *Psychopharmacology & Biological Narcology* [Internet]. 2005 [cited 2019 September 15];5(4):1089–1092. Available from: <http://psychopharmacology.ru/index.php/PPBN/article/view/234/136>. Russian.
- Hubich AI, Puchkova KV, Zalesskaya NA, Kryuchkova NV. The investigation of the adaptogenic properties of *Rhododendron adamsii* Rehder. on experimental models *in vivo*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;1:60–68. Russian.
- Nikalanya AV, Hubich AI. [Influence of the preparation of *Sideritis scandica* on the parameters of carbohydrate metabolism of blood serum of rats with experimental diabetes mellitus]. In: *Materialy VI Vseukrainskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh i studentov «Biologichni doslidzhennya – 2015»; 10–11 marta 2015 g.; Zhitomir, Ukraina* [Proceedings of the VI All-Ukrainian scientific and practical conference of young scientists and students «Biological investigations – 2015»; 2015 March 10–11; Zhitomir, Ukraine]. Zhitomir: Ruta; 2015. p. 414–415. Russian.
- Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2000;76(895):280–286. DOI: 10.1136/pmj.76.895.280.
- Kovalyov GA, Petrenko AYu. An experimental model of alcohol induced hepatic injury at female rats. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series: Medicine*. 2004;8:15–18. Russian.
- Hubich AI, Dashkova YaYu, Krivlenya IN. The comparative evaluation of plant adaptogenes' hepatoprotective properties on the experimental model of rat liver chronic alcohol damage *in vivo*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:54–62. Russian.

30. Zingare ML, Zingare PL, Dubey AK, Ansari A. *Clitoria ternatea* (Aparajita): a review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2013;3(1):203–213.
31. Yalochkina TO, Pigarova EA. Hyperphagia and obesity. *Obesity and metabolism*. 2013;10(1):14–17. Russian. DOI: 10.14341/2071-8713-5065.
32. Berthoud H-R, Lenard NR, Shin AC. Food reward, hyperphagia, and obesity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(6):R1266–R1277. DOI: 10.1152/ajpregu.00028.2011.
33. Solanki YB, Jain SM. Antihyperlipidemic activity of *Clitoria ternatea* and *Vigna mungo* in rats. *Pharmaceutical Biology*. 2010;48(8):915–923.

Статья поступила в редколлегию 23.12.2019.
Received by editorial board 23.12.2019.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.21:575.113

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ *acdS*-ГЕНА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* В-37 НА ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ *NICOTIANA TABACUM* В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Д. А. РУТКЕВИЧ¹⁾, Е. С. КОРОЛЕВА²⁾, Е. А. ХРАМЦОВА¹⁾

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

²⁾Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Проведен селективный отбор трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37. Методом полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами доказано наличие целевого гена. Отобранные на селективной среде трансгенные растения высаживались в грунт и подвергались абиотическому стрессу, вызванному загрязнением почвы солями тяжелых металлов (15 мг/кг для Cu^{2+} и 30 мг/кг для Sr^{6+} и Pb^{2+}), а также засолением почвы (200 ммоль/л NaCl). Проведение реакции обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени показало транскрипционную активность бактериального *acdS*-гена в клетках трансгенных растений на уровне с референсным геном *Ef-1a*. Определение удельной активности АЦК-дезаминазы – продукта экспрессии *acdS*-гена – подтвердило формирование активного фермента в тканях трансгенных растений табака. Доказано положительное влияние *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 на трансгенные растения *N. tabacum* в условиях абиотического стресса.

Ключевые слова: АЦК-дезаминаза; *Nicotiana tabacum*; *acdS*-ген; *Pseudomonas putida*; абиотический стресс.

Образец цитирования:

Руткевич ДА, Королева ЕС, Храмцова ЕА. Изучение влияния *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 на трансгенные растения *Nicotiana tabacum* в условиях абиотического стресса. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2020;1:39–46.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-39-46>

For citation:

Rutkevich DA, Karaleva KS, Khramtsova EA. The influence of bacteria *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* В-37 on *Nicotiana tabacum* transgenic plants under abiotic stress conditions. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2020;1:39–46. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-39-46>

Авторы:

Дарья Андреевна Руткевич – магистрант кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.

Екатерина Сергеевна Королева – младший научный сотрудник.

Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Daria A. Rutkevich, master's degree student at the department of genetics, faculty of biology.

rutkevichd@inbox.ru

Katsiaryna S. Karaleva, junior researcher.

Elena A. Khramtsova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

elenakhramtsova@inbox.ru

THE INFLUENCE OF BACTERIA *acdS*-GENE OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* B-37 ON *NICOTIANA TABACUM* TRANSGENIC PLANTS UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

D. A. RUTKEVICH^a, K. S. KARALEVA^b, E. A. KHRAMTSOVA^a

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

^bInstitute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: D. A. Rutkevich (rutkevichd@inbox.ru)

In the present work was carried out selection of transgenic plants of *Nicotiana tabacum* carrying *acdS*-gene of bacteria *Pseudomonas putida* B-37. Using polymerase chain reaction with specific primers, the presence of the target gene was proved. Transgenic plants selected on a selective medium were planted in the ground and subjected to abiotic stress caused by soil contamination with heavy metal salts (15 mg/kg for Cu²⁺ and 30 mg/kg for Cr⁶⁺ and Pb²⁺) and salinization of the soil (200 mmol/L NaCl). Reverse transcription polymerase chain reaction and real-time polymerase chain reaction were conducted and confirmed the transcriptional activity of the bacterial *acdS*-gene in transgenic plant cells at a level with the reference gene *Ef-1a*. Determination of activity of ACC-deaminase, the product of expression of the *acdS*-gene, confirmed the formation of the active enzyme in the leaf tissues of transgenic tobacco plants. The beneficial effect of the *acdS*-gene of the bacteria *P. putida* B-37 on transgenic *N. tabacum* plants under abiotic stress has been proven.

Keywords: ACC-deaminase; *Nicotiana tabacum*; *acdS*-gene; *Pseudomonas putida*; abiotic stress.

Введение

Этилен – фитогормон, обладающий сильным морфогенетическим действием. Он стимулирует рост самого растения и всех его частей, активизирует созревание плодов и семян [1–3]. Однако при произрастании растений в стрессовых условиях концентрация этилена может увеличиваться на несколько порядков («стрессовый этилен»), что впоследствии обычно приводит к ускорению процессов старения, пожелтения и опадения листьев, остановке роста и гибели растения [4].

Одним из способов снижения уровня стрессового этилена является использование фермента АЦК-дезаминазы, синтезируемого некоторыми ризобактериями. Данный фермент разлагает предшественника этилена – АЦК – до аммиака и α -кетобутирата [5].

В последние годы особое внимание уделяется исследованиям, направленным на разработку методов защиты растений от стрессового этилена путем создания и использования трансгенных форм, которые приобретают устойчивость к стрессовому этилену благодаря введению в их геном бактериальных генов, кодирующих АЦК-дезаминазу.

В настоящее время известно, что экспрессия *acdS*-гена бактерий в растениях приводит к усиленной деградации стрессового этилена в корневой зоне и снятию негативного эффекта его действия [6; 7].

Создание новых трансгенных растений, синтезирующих бактериальную АЦК-дезаминазу и обладающих повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам, является высокоактуальным в связи с постоянно усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества.

Цель данного исследования – анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в трансгенных растениях *N. tabacum* в условиях абиотического стресса, вызванного засолением почвы и загрязнением ее солями тяжелых металлов.

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В качестве основного объекта исследования использовались полученные ранее трансгенные растения *N. tabacum*. Отбор растений производился на селективной среде Мурасиге – Скуга, содержащей канамицин.

Культивирование семян *N. tabacum*. Проростки табака переносили на среду для корнеобразования и выращивали при 16-часовом световом дне и температуре (20 ± 0,5) °С. Сформированные растения высаживали в грунт.

Создание условий абиотического стресса. Для создания стрессовых условий, вызванных загрязнением почвы солями тяжелых металлов, производили однократный полив растений растворами $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (по 5 мл) в концентрации 15 мг на 1 кг почвы для Cu^{2+} и 30 мг на 1 кг почвы для Cr^{6+} и Pb^{2+} соответственно.

Для создания стрессовых условий, вызванных засолением почвы, проводили полив растений раствором NaCl до достижения в почве концентрации 200 ммоль/л по методике, предложенной в статье [8].

Выделение тотальной ДНК из растений. Растительный материал помещали в пробирку, добавляли жидкий азот и выдерживали несколько секунд до его испарения, затем быстро растирали листовую ткань в порошок. Далее вводили буфер для выделения ДНК до объема 750 мкл, ресуспендировали и инкубировали пробу при 65 °С 10 мин. Добавляли 200 мкл ацетата калия (5 моль/л) и энергично встряхивали пробирку. Инкубировали пробу на ледяной бане 20 мин, после чего центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли равный объем изопропанола, перемешивали и центрифугировали 2 мин при 12 000 об/мин. Удаляли жидкую фазу и ресуспендировали осадок в равном объеме 80 % этанола. Затем убрали супернатант, подсушивали осадок. Растворяли ДНК в 50 мкл ТЕ-буфера и хранили при –20 °С.

Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакцию осуществляли по заданной программе с помощью аппарата C1000 Touch™ Thermal Cycler фирмы *Bio-Rad Laboratories* (США). При постановке ПЦР использовали реактивы компании *Thermo Fisher Scientific* (Литва): Taq-полимеразу, 10-кратный Taq-буфер для ПЦР, смесь дНТФ и деионизированную H_2O в концентрациях, предложенных производителем. Результаты ПЦР визуализировали посредством электрофореза в агарозном геле.

*Аmplификация *acdS*-гена.* Используемые праймеры:

- прямой (Fatg) – 5'-TCCGGATCCATGAACCTGAATCGTTTTTRAACGTTATC-3';
- обратный (Rtga) – 5'-TCCGGATCCTCAGCCGTTGCGRAACARGAAG-3'.

Параметры циклов амплификации: 5 мин при 94 °С – 1 цикл; 30 с при 94 °С, 30 с при 54 °С, 1,5 мин при 72 °С – 35 циклов; 30 с при 72 °С – 1 цикл.

Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез проводили с использованием ТАЕ-буфера согласно методическим указаниям, изложенным в пособии [9].

Выделение растительной РНК. Растительный материал растирали тонким металлическим шпателем. Добавляли 500 мкл буфера для экстракции, центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Отбирали водную фазу, добавляли к ней равный объем 4 моль/л LiCl . Центрифугировали 30 мин при 10 000 об/мин, добавляли к осадку 250 мкл H_2O , 25 мкл ацетата натрия (3 моль/л, pH 5,2) и 550 мкл 96 % этанола. Пробы центрифугировали 30 мин при 12 000 об/мин. Осадок промывали 1 мл 70 % этанола. Образцы центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин. Удаляли супернатант, подсушивали осадок и растворяли его в 40 мкл H_2O .

Синтез кДНК. В стерильный эппендорф на льду вводили в следующем порядке реактивы: мРНК – 0,1–5,0 нг, праймеры – 0,5 мкг, ДЕПК-вода – до 12,5 мкл, 5-кратный буфер для реакции – 4 мкл, ингибитор РНКазы – 0,5 мкл, смесь нуклеотидов – 2 мкл, обратная транскриптаза – 1 мкл. Инкубировали 10 мин при 25 °С, 60 мин при 42 °С. Ингибировали реакцию нагреванием до 70 °С в течение 10 мин.

Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу Revert Aid™ Premium Reverse Transcriptase, произведенную фирмой *Fermentas* (США).

Постановка количественной ПЦР в режиме реального времени (РВ-ПЦР). Смесь реагентов для проведения одной реакции составляли следующим образом: 2-кратный ПЦР-буфер Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (*Thermo Scientific*, США) – 12,5 мкл, прямой праймер – 0,5 мкл, обратный праймер – 0,6 мкл, образец кДНК (20 нг/мкл) – 2 мкл. Конечный объем доводили H_2O до 25 мкл. Программа амплификации была такой: 2 мин при 50 °С – 1 цикл; 10 мин при 95 °С – 1 цикл; 15 с при 95 °С, 30 с при 55 °С, 1 мин при 60 °С – 40 циклов.

Используемые праймеры:

- прямой (RT-ATG-For1) – 5'-ATGAACCTGAATCGTTTTGAACGTTATC-3';
- обратный (RT-ATG-Rev1) – 5'-CACTGTTGTCAGTCTTCACGTTTG-3'.

Определение содержания белка в растительных гомогенатах. Количество белка определяли биуретовым методом [10].

Определение ферментативной активности АЦК-деаминазы [11]. Пробу, содержащую 200 мкл клеточного экстракта и 16 мг АЦК, инкубировали в 0,2 мл Tris-буфера (1 моль/л) при 30 °С в течение 60 мин. Останавливали реакцию добавлением 1,8 мл 0,56 н HCl , после чего вносили 0,3 мл 0,1 % раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н HCl и повторно выдерживали при 30 °С 15 мин. Реакцию останавливали, добавляя 2 мл 2 н NaOH .

Реакционную смесь переносили в кювету и измеряли оптическую плотность образовавшегося в результате реакции α -кетобутирата ($\lambda = 540$ нм). Спектрофотометрический анализ проводили с использованием спектрофотометра Cary 50 Scan (Varian, Австралия).

Удельную активность АЦК-дезаминазы определяли по формуле

$$A = \Delta ОП / (C \cdot V \cdot t),$$

где A – удельная активность АЦК-дезаминазы; $\Delta ОП = ОП_{\text{проба}} - ОП_{\text{контроль}}$ (изменение адсорбции); C – количество белка в реакции, мг/мл; V – объем вносимого клеточного экстракта, мл; t – время реакции, мин.

Удельную активность фермента выражали в наномолях на 1 мг белка в минуту.

Результаты и их обсуждение

Семена от полученных ранее трансгенных растений проращивали на селективной среде Мурасиге – Скуга с добавлением канамицина. Проростки переносили на среду для корнеобразования. После завершения формирования корневой системы растения высаживали в грунт для укоренения и постановки эксперимента.

Разработка схемы эксперимента. Укоренившиеся растения разбивались на несколько выборок: трансгенные растения *N. tabacum*, выращиваемые в условиях загрязнения почвы солями тяжелых металлов и в условиях засоления почвы. В качестве контрольных выборок были высажены нетрансгенные растения табака, подвергавшиеся аналогичным стрессовым воздействиям, а также нетрансгенные и трансгенные образцы, культивируемые в отсутствие абиотического стресса.

*Подтверждение наличия бактериального *acdS*-гена в геноме трансгенных растений *N. tabacum*.* Одним из необходимых этапов работы было выделение тотальной растительной ДНК трансгенных растений табака. Выделенная ДНК служила матрицей при постановке ПЦР со специфическими праймерами к *acdS*-гену. В качестве положительного контроля использовалась рекомбинантная плазмида рВ1121/*acdS*-В37, несущая *acdS*-ген бактерий *P. putida* В-37, в качестве негативного – продукт ПЦР на матрице ДНК нетрансгенных растений табака. Результаты представлены на рис. 1.

В ходе ПЦР получен фрагмент около 1000 пар нуклеотидов (п. н.), соответствующий размеру *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37. Таким образом, было доказано наличие бактериального *acdS*-гена в трансгенных растениях *N. tabacum*.

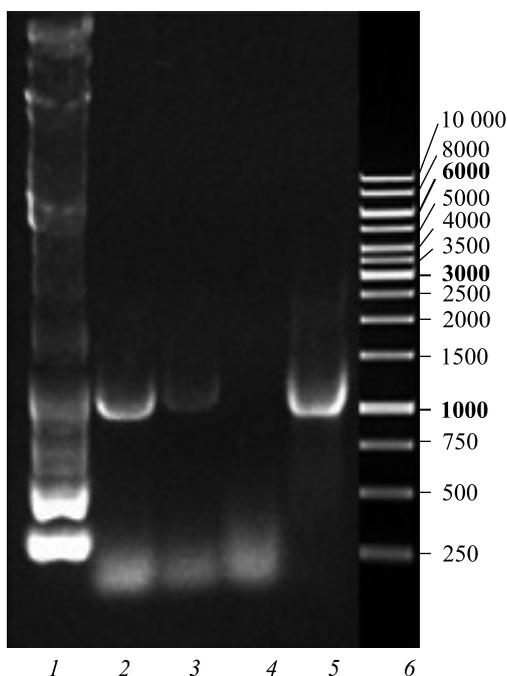


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР на матрице ДНК:
1, 6 – 1 kb DNA Ladder; 2, 3 – фрагменты (~1000 п. н.), соответствующие *acdS*-гену;
4 – негативный контроль; 5 – положительный контроль

Fig. 1. Electrophoregram of PCR products on the DNA matrix:
1, 6 – 1 kb DNA Ladder; 2, 3 – fragments (~1000 bp) corresponding to the *acdS*-gene;
4 – negative control; 5 – positive control

Анализ экспрессии гетерологичного гена в трансгенных растениях табака. Постановку реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) и РВ-ПЦР можно назвать одним из ключевых этапов изучения влияния бактериального *acdS*-гена на трансгенные растения в условиях абиотического стресса. Следует учесть и тот факт, что уровень транскрипционной активности *acdS*-гена будет определяться местом его интеграции в хромосому. Другой механизм регуляции транскрипционной активности целевого гена может заключаться в наличии внутренних систем интерференции у растений [3; 12].

Выделенная клеточная РНК выступала матрицей при построении кДНК. Полученную кДНК использовали при постановке ОТ-ПЦР (рис. 2) со специфическими праймерами к *acdS*-гену и специфическими праймерами к референс-гену *Ef-1a*. В качестве положительного контроля были взяты рекомбинантная плаزمиды рВ1121/*acdS*-B37 и *GAPDH*-ген домашнего хозяйства, предоставленный вместе с набором для построения кДНК, в качестве негативного контроля – пробы, не содержащие обратной транскриптазы.

Для постановки РВ-ПЦР использовались пробы, содержащие синтезированную ранее кДНК трансгенных растений табака, выращенных в условиях описанного абиотического стресса. Негативным контролем выступали пробы, не содержащие ревертазы. В качестве референсного гена был взят ген домашнего хозяйства *Ef-1a*.

На рис. 3 и 4 представлены результаты анализа уровня экспрессии бактериального *acdS*-гена в трансгенных растениях табака первого поколения (*N. tabacum* T1), выращенных в условиях загрязнения почвы хромом (30 мг/кг) и засоления почвы (200 ммоль/л NaCl). Аналогичные результаты были получены при загрязнении почвы солями меди (15 мг/кг) и свинца (30 мг/кг).

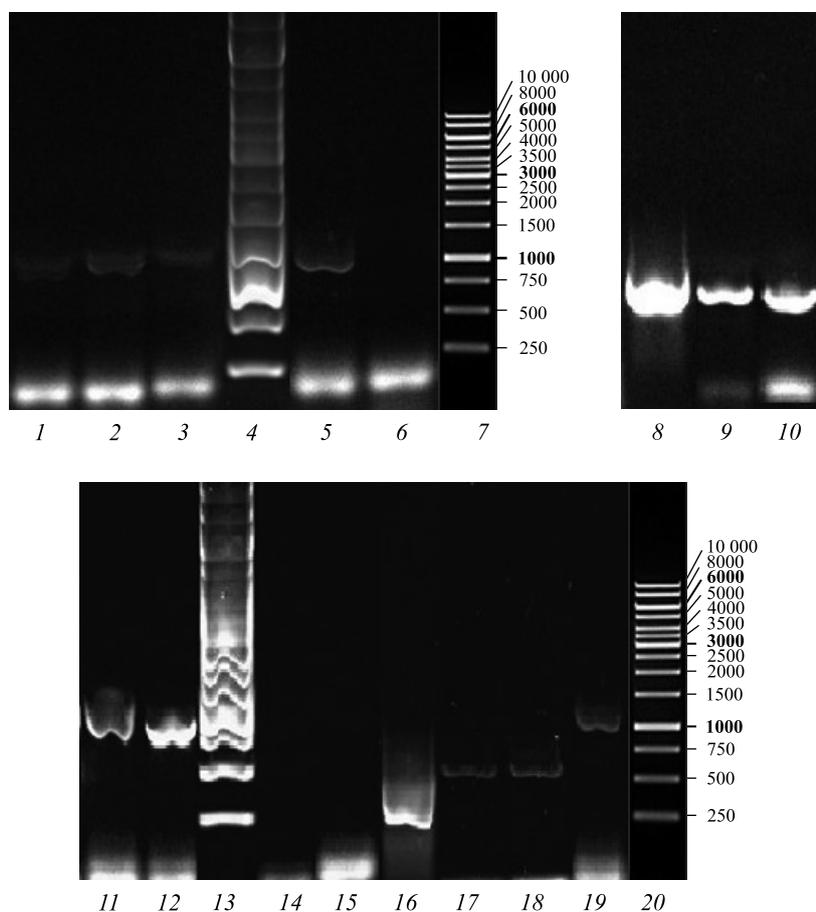


Рис. 2. Продукты ПЦР на матрице кДНК:
1–3, 11, 12 – фрагменты (~1000 п. н.), соответствующие *acdS*-гену (1 – Cu²⁺; 2 – Cr⁶⁺; 3 – Pb²⁺;
11, 12 – 200 ммоль/л NaCl); 4, 7, 13, 20 – 1 kb DNA Ladder; 5, 19 – pBI121/*acdS*-B37;
6, 14, 15 – негативный контроль; 8–10, 17, 18 – фрагменты (~500 п. н.), соответствующие
гену *Ef-1a* (8 – Cu²⁺; 9 – Cr⁶⁺; 10 – Pb²⁺; 17, 18 – 200 ммоль/л NaCl); 16 – *GAPDH*

Fig. 2. PCR products on the cDNA matrix:
1–3, 11, 12 – fragments (~1000 bp) corresponding to the *acdS*-gene (1 – Cu²⁺; 2 – Cr⁶⁺; 3 – Pb²⁺;
11, 12 – 200 mmol/L NaCl); 4, 7, 13, 20 – 1 kb DNA Ladder; 5, 19 – pBI121/*acdS*-B37;
6, 14, 15 – negative control; 8–10, 17, 18 – fragments (~500 bp) corresponding
to the gene *Ef-1a* (8 – Cu²⁺; 9 – Cr⁶⁺; 10 – Pb²⁺; 17, 18 – 200 mmol/L NaCl); 16 – *GAPDH*

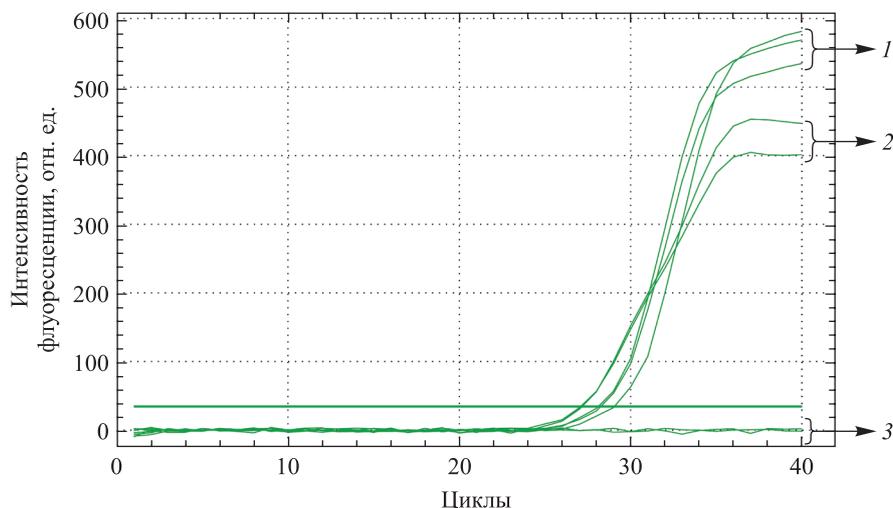


Рис. 3. Уровень экспрессии бактериального *acdS*-гена в растениях *N. tabacum* T1, выращенных в условиях загрязнения почвы Cr^{6+} (перед постановкой РВ-ПЦР пробы были разведены в 4 раза): 1 – экспрессия бактериального *acdS*-гена; 2 – экспрессия гена домашнего хозяйства *Ef-1a*; 3 – негативный контроль (RT–)

Fig. 3. The level of expression of the bacterial *acdS*-gene in *N. tabacum* T1 under Cr^{6+} soil pollution: 1 – expression of the bacterial *acdS*-gene; 2 – expression of the household gene *Ef-1a*; 3 – negative control (RT–)

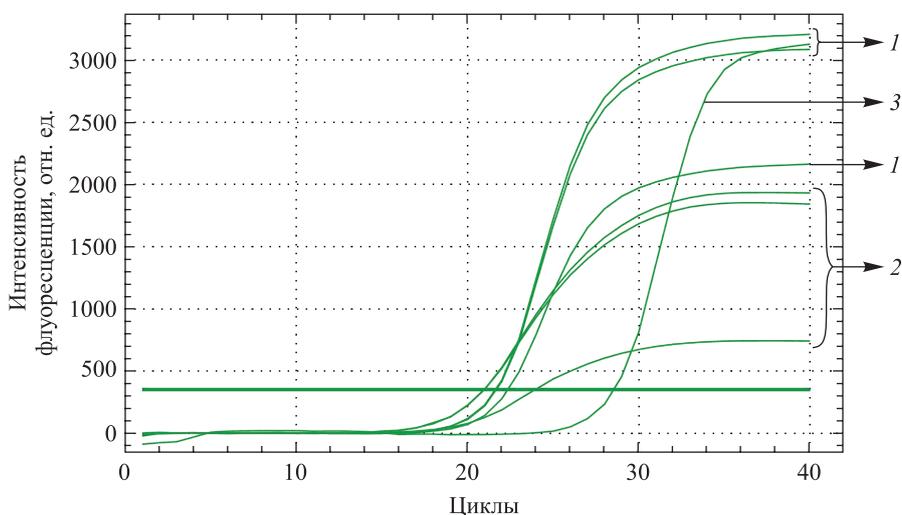


Рис. 4. Уровень экспрессии бактериального *acdS*-гена в растениях *N. tabacum* T1, выращенных в условиях засоления почвы: 1 – экспрессия бактериального *acdS*-гена; 2 – экспрессия гена домашнего хозяйства *Ef-1a*; 3 – негативный контроль (RT–)

Fig. 4. The level of expression of the bacterial *acdS*-gene in *N. tabacum* T1 under solinity stress condition: 1 – expression of the bacterial *acdS*-gene; 2 – expression of the household gene *Ef-1a*; 3 – negative control (RT–)

Таким образом, была доказана эффективная экспрессия бактериального *acdS*-гена в трансгенных растениях табака первого поколения в условиях абиотического стресса, вызванного загрязнением почвы тяжелыми металлами и засолением почвы, на уровне с геном домашнего хозяйства *Ef-1a*.

Определение удельной активности АЦК-дезаминазы в трансгенных растениях N. tabacum в условиях абиотического стресса. Представленные этапы дают понятие о транскрипционной активности гена. Для доказательства наличия функционально активного продукта *acdS*-гена – АЦК-дезаминазы – был проведен анализ активности фермента в растениях табака, выращенных в условиях абиотического стресса и в его отсутствие. Активность АЦК-дезаминазы определялась методом измерения оптической плотности по образовавшемуся в результате реакции α -кетобутирату. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Активность фермента АЦК-деаминазы в тканях листьев
трансгенного табака, наномолей на 1 мг белка в минуту

Table 1

The activity of ACC-deaminase in the leaf tissue of transgenic tobacco,
nanomoles per 1 mg of protein per minute

Серия	Контроль (нетрансгенные растения)	Трансгенные растения
Без обработки почвы тяжелыми металлами и NaCl	0,017 ± 0,006*	0,072 ± 0,003*
Обработка Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,020 ± 0,005*	0,60 ± 0,027*
Обработка Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,022 ± 0,007*	0,82 ± 0,034*
Обработка Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,021 ± 0,006*	0,69 ± 0,032*
Обработка 200 ммоль/л NaCl	0,022 ± 0,007*	0,81 ± 0,033*

*Результаты достоверны при уровне значимости $p < 0,05$.

Данные табл. 1 свидетельствуют о возрастании активности АЦК-деаминазы в условиях абиотического стресса: в среднем она увеличилась в 11 раз по сравнению с контрольными растениями *N. tabacum* T1, выращенными в отсутствие стресса. Полученные результаты согласуются с литературными данными [6].

Анализ активности фермента показал, что в условиях абиотического стресса в трансгенных растениях табака формируется активный фермент – АЦК-деаминаза.

Оценка ростовых характеристик растений. Следующим этапом эксперимента было выполнение оценки ростовых характеристик растений из опытных и контрольных выборок. В рамках проведенного опыта по прошествии 3 мес. определены длина корня, стебля и биомасса. В результате контрольных измерений отмечено увеличение длины корня и стебля трансгенных растений из опытной выборки относительно нетрансгенных растений из контрольной выборки в 1,42–2,47 и 1,93–1,97 раза соответственно. Значения биомассы растений из опытных и контрольных выборок приведены в табл. 2.

Таблица 2

Средние значения биомассы трансгенных растений *N. tabacum*

Table 2

The average biomass of *N. tabacum* transgenic plants

Серия растений	Условия обработки				
	H ₂ O	Cu ²⁺	Cr ⁶⁺	Pb ²⁺	NaCl
Нетрансгенные растения <i>N. tabacum</i>	17,95 ± 0,11*	7,79 ± 0,06*	6,67 ± 0,06*	7,12 ± 0,08*	7,0 ± 0,25*
Трансгенные растения <i>N. tabacum</i> T1	23,2 ± 0,06*	16,68 ± 0,07*	11,4 ± 0,032*	12,4 ± 0,04*	10,75 ± 0,55*

*Результаты достоверны при уровне значимости $p < 0,05$.

Данные, представленные в табл. 2, отображают увеличение биомассы трансгенных растений табака, выращенных в условиях загрязнения почвы солями тяжелых металлов и засоления почвы, относительно нетрансгенных растений, выращенных в аналогичных условиях, в 1,21–2,14 раза.

Таким образом, было отмечено положительное влияние *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 на трансгенные растения табака, культивируемые в условиях абиотического стресса.

Заключение

В ходе эксперимента подтверждено наличие *acdS*-гена в трансгенных растениях табака первого поколения. Методом ОТ-ПЦР и РВ-ПЦР доказана эффективная транскрипционная активность целевого гена в растениях *N. tabacum* T1 на уровне с референсным геном. Полученные в результате биохимического

анализа данные об активности фермента свидетельствуют о формировании активного продукта бактериального *acdS*-гена – АЦК-деаминазы – в тканях листьев трансгенных растений. Также отмечено положительное влияние *acdS*-гена на растения *N. tabacum* T1, выращенные в условиях абиотического стресса, вызванного загрязнением почвы солями тяжелых металлов и засолением почвы.

Библиографические ссылки

1. Полевой ВВ. *Физиология растений*. Москва: Высшая школа; 1989. 464 с.
2. Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251(1):1–7. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.030.
3. Tuteja N, Gill SS, editors. *Plant acclimation to environmental stress*. New York: Springer-Verlag; 2013. XXII, 494 p.
4. Титов АФ, Таланова ВВ, Казнина НМ, Лайдинен ГФ. *Устойчивость растений к тяжелым металлам*. Немова НН, редактор. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН; 2007. 172 с.
5. Jha CK. Biochemical and molecular biology of ACC deaminase production. In: *Isolation characterization and development of consortia of PGPB for the growth of Jatropha curcas: thesis submitted for the award of the degree of doctor of philosophy in microbiology*. Gujarat: Gujarat University; 2011. p. 124–175.
6. Gontia-Mishra I, Sasidharan S, Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2014;36(5):889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.
7. Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 2014; 169(1):30–39. DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.009.
8. Mayak S, Tirosch T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004;42(6):565–572. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.05.009.
9. Храмова ЕА, Максимова НП. *Генетика*. Минск: БГУ; 2002. 22 с.
10. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.
11. Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1978;42(10):1825–1831. DOI: 10.1271/bbb1961.42.1825.
12. Sahu PP, Pandey G, Sharma N, Puranik S, Muthamilarasan M, Prasad M. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*. 2013;32(8):1151–1159. DOI: 10.1007/s00299-013-1462-x.

References

1. Polevoi VV. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology]. Moscow: Vysshaya shkola; 1989. 464 p. Russian.
2. Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251(1):1–7. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.030.
3. Tuteja N, Gill SS, editors. *Plant acclimation to environmental stress*. New York: Springer-Verlag; 2013. XXII, 494 p.
4. Titov AF, Talanova VV, Kaznina NM, Laidinen GF. *Ustoichivost' rastenii k tyazhelym metallam* [Plant resistance to heavy metals]. Nemova NN, editor. Petrozavodsk: Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 2007. 172 p. Russian.
5. Jha CK. Biochemical and molecular biology of ACC deaminase production. In: *Isolation characterization and development of consortia of PGPB for the growth of Jatropha curcas: thesis submitted for the award of the degree of doctor of philosophy in microbiology*. Gujarat: Gujarat University; 2011. p. 124–175.
6. Gontia-Mishra I, Sasidharan S, Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2014;36(5):889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.
7. Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 2014; 169(1):30–39. DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.009.
8. Mayak S, Tirosch T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004;42(6):565–572. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.05.009.
9. Khrantsova EA, Maksimova NP. *Genetika* [Genetics]. Minsk: Belarusian State University; 2002. 22 p. Russian.
10. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.
11. Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1978;42(10):1825–1831. DOI: 10.1271/bbb1961.42.1825.
12. Sahu PP, Pandey G, Sharma N, Puranik S, Muthamilarasan M, Prasad M. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*. 2013;32(8):1151–1159. DOI: 10.1007/s00299-013-1462-x.

Статья поступила в редколлегию 05.11.2019.
Received by editorial board 05.11.2019.

УДК 632.772(476)

МИНИРУЮЩИЕ МУХИ (DIPTERA: AGROMYZIDAE) – ФИТОФАГИ ЖИМОЛОСТЕЙ (*LONICERA* L.) И СНЕЖНОГОДНИКОВ (*SYMPHORICARPOS* DUHAMEL) В ДЕКОРАТИВНЫХ ЗЕЛЕНых НАСАЖДЕНИЯХ БЕЛАРУСИ

М. В. ВОЛОСАЧ¹⁾

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

Результаты исследований 2016–2019 гг. показали, что в декоративных зеленых насаждениях Беларуси жимолости (*Lonicera* L.) и снежноягодники (*Symphoricarpos* Duhamel) повреждаются личинками 6 видов минирующих мух (Diptera: Agromyzidae): *Aulagromyza cornigera* (Griffiths, 1973), *Aulagromyza hendeliana* (Hering, 1926), *Aulagromyza luteoscutellata* (de Meijere, 1924), *Chromatomyia aprilina* (Goureau, 1851), *Chromatomyia lonicerae* (Robineau-Desvoidy, 1851), *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922). Представлены данные о трофических связях, основных особенностях биологии, распространенности агромизид в условиях Беларуси, а также о характере повреждений личинками листовых пластинок жимолостей и снежноягодников.

Ключевые слова: вредоносность; декоративные кустарники; интродуценты; минеры; тамнобионты; филлобионты.

Образец цитирования:

Волосач МВ. Минирующие мухи (Diptera: Agromyzidae) – фитофаги жимолостей (*Lonicera* L.) и снежноягодников (*Symphoricarpos* Duhamel) в декоративных зеленых насаждениях Беларуси. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020;1:47–54.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-47-54>

For citation:

Volosach MV. Mining flies (Diptera: Agromyzidae) – phytophages of honeysuckles (*Lonicera* L.) and snowberries (*Symphoricarpos* Duhamel) in green areas in Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;1:47–54. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-47-54>

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

MINING FLIES (DIPTERA: AGROMYZIDAE) – PHYTOPHAGES OF HONEYSUCKLES (*LONICERA* L.) AND SNOWBERRIES (*SYMPHORICARPOS* DUHAMEL) IN GREEN AREAS IN BELARUS

M. V. VOLOSACH^a

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

According to the results of investigations, carried out in 2016–2019, it was found that in the conditions of green areas of Belarus, honeysuckles (*Lonicera* L.) and snowberries (*Symphoricarpos* Duhamel) has been damaged by larvae of 6 species of mining flies (Diptera: Agromyzidae): *Aulagromyza cornigera* (Griffiths, 1973), *Aulagromyza hendeliana* (Hering, 1926), *Aulagromyza luteoscutellata* (de Meijere, 1924), *Chromatomyia aprilina* (Goureau, 1851), *Chromatomyia lonicerae* (Robineau-Desvoidy, 1851), *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922). The basic data on trophic relations, the main characteristics of ecology, the distribution in the conditions of Belarus, and the pattern of damages causing by larvae to leaf plates of honeysuckles and snowberries are presented.

Keywords: harmfulness; ornamental shrubs; introduced plants; miners; tannobionts; phyllobionts.

Введение

Жимолости (*Lonicera* L.) и снежноягодники (*Symphoricarpos* Duhamel) – кустарники семейства жимолостных (Caprifoliaceae). Жимолости – прямостоячие, стелющиеся или вьющиеся листопадные либо вечнозеленые кустарники. В мировой флоре насчитывается около 200 видов, в каталоге дендрария Центрального ботанического сада НАН Беларуси (г. Минск) числится 68 видов [1]. В республике проводились интродукционные испытания 46 видов жимолостей, из которых 6 видов охарактеризованы как отличающиеся высокими декоративными качествами – обильным и продолжительным цветением, а некоторые еще и эстетически привлекательными плодами [2]. Снежноягодники – листопадные кустарники. Из 16 видов мировой флоры [3] в коллекциях Центрального ботанического сада представлены 8 видов [1]. В практике зеленого строительства Беларуси используется фактически лишь снежноягодник белый, или кистистый (*Symphoricarpos albus* L.). Отличаясь высокой декоративностью, жимолости и снежноягодники применяются при создании живых изгородей, крупных бордюров, в солитерных посадках. Некоторые виды жимолостей, например жимолость каприфоль (*Lonicera caprifolium* L.), используются для вертикального озеленения. Как жимолости, так и снежноягодник белый хорошо переносят антропогенный пресс, что вместе с высокими декоративными качествами обуславливает в настоящее время их широкое применение в зеленом строительстве Беларуси [4].

Кустарники родов *Lonicera* и *Symphoricarpos* повреждаются фитофагами различных таксонов, в Беларуси среди них выделяются настоящие тли (Rhynchota: Sternorrhyncha: Aphidoidea) [5], чешуекрылые насекомые (Lepidoptera) [6] и минирующие мухи (Agromyzidae). Семейство агромизид отряда двукрылых насекомых (Diptera) насчитывает в мировой фауне около 2900 видов, представители таксона распространены повсеместно [7]. Личинки агромизид питаются внутри тканей различных органов растений, чаще всего листьев, что приводит к образованию так называемых мин – камер в паренхиматозных тканях. В случае листовых мин, как это имеет место при повреждении агромизидами жимолостей и снежноягодников, личинками выедается мезофилл, но эпидермальный слой остается нетронутым. При этом некротизация происходит в результате прекращения питания клеток, а не вследствие их непосредственного повреждения фитофагами.

Из-за минирования листовых пластинок сокращается фотосинтезирующая поверхность, снижается жизнеспособность растений и их устойчивость к неблагоприятному воздействию абиотических и биотических факторов среды. Помимо этого, в микроповреждения, наносимые яйцекладами самок агромизид при яйцекладке, может проникать инфекционное начало [8]. В декоративных зеленых насаждениях основным фактором вредоносности этих фитофагов является снижение декоративности растений и посадок в целом [9].

Агромизиды до недавнего времени не были объектами систематических целенаправленных исследований в Беларуси. Сейчас для ее фауны известно 93 вида минирующих мух [10]. Из них 20 видов являются дендробионтами, т. е. повреждают древесно-кустарниковые растения, при этом 13 видов выступают вредителями декоративных деревьев и кустарников [9].

Цель настоящей статьи – обобщение информации о видовом составе, трофических связях, особенностях биологии и экологии, а также характере вредоносности агромизид, повреждающих в зеленых насаждениях Беларуси декоративные деревья и кустарники, включая интродуцированные в рамках работ по мобилизации растительных ресурсов.

Материалы и методы исследования

В работе использованы энтомологические и гербарные сборы, а также данные энтомофитопатологических обследований кустарников, выполненных в течение вегетационных сезонов 2016–2019 гг. в зеленых насаждениях на территории всех административных областей и районов интродукции древесных растений [11] в Беларуси. Детализированные обследования интродуцентов проводили в арборетуме и ландшафтном парке Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Рандомизированный отбор поврежденных фитофагами листьев осуществляли в zip-пакеты для временного хранения. В последующем материал гербаризировали по стандартной методике [12]. Для видовой идентификации агромизид использовали соответствующие определительные таблицы и ключи [13–16].

Уровни заселенности и поврежденности растений оценивали по 4-балльной шкале, предложенной А. И. Блинцовым [17] для листогрызущих, сосущих, минирующих и галлообразующих насекомых. Согласно ей при отсутствии повреждений и фитофагов на растении заселенность и поврежденность оцениваются в 0 баллов, при поврежденности до 5 % и заселенности до 10 % присваивается 1 балл, при заселенности и поврежденности до 1/3 листовых пластинок – 2 балла, до 50 % – 3 балла, более 50 % – 4 балла.

Результаты и их обсуждение

Выполненные исследования показали, что жимолости и снежнягодники в разного типа декоративных зеленых насаждениях Беларуси повреждают (минируют листовые пластинки) личинки 6 видов агромизид, а именно: *Aulagromyza cornigera* (Griffiths, 1973), *Aulagromyza hendeliana* (Hering, 1926), *Aulagromyza luteoscutellata* (de Meijere, 1924), *Chromatomyia aprilina* (Goureau, 1851), *Chromatomyia lonicerae* (Robineau-Desvoidy, 1851), *Chromatomyia perichlymeni* (Hendel, 1922). На основе анализа фаунистических списков для сопредельных стран [18] можно предположить возможное обнаружение в Беларуси еще одного вида агромизид, повреждающих жимолости и снежнягодники, – *Chromatomyia isicae* (Hering, 1962), известного в Литве и России [14]. Тем не менее в ходе многолетних исследований фитофагов – вредителей зеленых насаждений Беларуси – этот вид выявить не удалось.

В табл. 1 приведена информация о периоде развития личинок и характере размещения пупариев, а также основных характеристиках (признаках) мин агромизид.

Поскольку визуальный ряд позволяет дополнить словесные описания и облегчить определение фитофагов по наносимым ими повреждениям, на рис. 1–6 представлены изображения листовых пластинок с минами личинок агромизид, охарактеризованными в табл. 1.

Представленные в табл. 1 характеристики мин имеют не только диагностическое значение. Сведения об окукливании личинок внутри либо вне мин актуальны также для решения задачи выведения имаго минирующих мух в целях верификации определения таксономической принадлежности по имагинальным признакам, для получения выборок взрослых насекомых при проведении исследований и т. п.

Практическое значение имеет информация о круге жимолостей и снежнягодников, повреждаемых этими фитофагами в Беларуси: она необходима для корректировки предложений об исключении из ассортиментов древесных растений, рекомендуемых к использованию в зеленом строительстве [19; 20], тех представителей родов *Lonicera* и *Symphoricarpos*, которые отличаются высокой повреждаемостью агромизидами. В табл. 2 сведены данные о повреждаемости минирующими мухами тех видов жимолостей и снежнягодников, которые представлены в разного типа декоративных зеленых насаждениях, охваченных выполненными исследованиями.

Как следует из табл. 2, жимолости в декоративных зеленых насаждениях Беларуси повреждаются личинками 6 видов агромизид, тогда как снежнягодники – 5 видов.

Наиболее широким кругом трофических связей характеризуется *Ch. lonicerae*. Среди охваченных исследованиями кустарников родов *Lonicera* и *Symphoricarpos* не были выявлены повреждения личинками данной минирующей мухи жимолостей Уэбба (*L. webbiana*) и татарской (*L. tatarica*). При этом в литературе имеются указания на повреждение личинками *Ch. lonicerae* жимолости татарской [14], в связи с чем вывод об устойчивости этого обычного для сформированных во второй половине прошлого века зеленых насаждений декоративного кустарника представляется преждевременным. Следует отметить, что жимолость съедобная (*L. caerulea*) принадлежит к числу не только декоративных, но и перспективных для возделывания в Беларуси плодово-ягодных культур [21]. Как показали результаты проведенных исследований, в зеленых насаждениях республики она повреждается личинками 2 видов минирующих мух – *A. cornigera* и *Ch. lonicerae*.

Основные характеристики биологии агромизид и наносимых их личинками повреждений (мин) жимолостям и снежноягодникам, произрастающим в декоративных зеленых насаждениях Беларуси

Table 1

The main characteristics of biology of agromyzids and mines caused by their larvae to honeysuckles and snowberries growing in green areas in Belarus

Вид	Период развития личинок	Характеристики мины						Размещение пупариев
		Размещение относительно стороны листа	Расположение на листовой пластинке	Форма	Ветвление	Окраска	Характер экскрементов	
<i>Aulagromyza cornigera</i> (Griffiths, 1973)	Апрель – середина мая	Верхнестороннее	Параллельно краю листа	Узкий постепенно расширяющийся коридор	Отсутствует	Светлая (зеленовато-белая)	В виде центральной прерывистой полосы	Вне мин
<i>Aulagromyza hendeliana</i> (Hering, 1926)	Май – середина июня	Верхнестороннее	По краю листа (обычно только вначале)	Несколько расширяющийся коридор	Отсутствует	Светлая	Крупные гранулы в виде двойной пунктирной линии	Вне мин
<i>Aulagromyza luteoscutellata</i> (de Meijere, 1924)	Середина мая – конец июня	Верхнестороннее	Мины не ассоциированы с краем листа	Относительно широкий коридор	Отсутствует	Зеленая (сперва мины темные за счет экскрементов, позднее белеют)	Широкая центральная зеленая лента с черными вкраплениями	Вне мин
<i>Chromatomyia apritina</i> (Gougeau, 1851)	Начало – середина октября	Преимущественно верхнестороннее (начинаются на нижней стороне, затем переходят на верхнюю сторону)	Коридоры формируются по обе стороны от средней жилки листа	Центральный коридор со множественными отходящими от него ответвлениями	Присутствует	Светло-зеленая	В виде темных полос	В минах
<i>Chromatomyia loniceræ</i> (Robineau-Desvoidy, 1851)	Май – середина октября	Преимущественно верхнестороннее (начинаются на нижней стороне, затем переходят на верхнюю сторону)	Без определенной локализации; часто на листе располагаются несколько мин	Звездчатое начало, от которого отходят несколько относительно длинных коридоров	Присутствует	Светлая	В виде полосы по боковой стороне мины	В минах
<i>Chromatomyia periclymeni</i> (Hendel, 1922)	Июнь	Верхнестороннее	Без определенной локализации	Звездчатые мины с большим количеством коротких «лучей»	Присутствует	Серовато-коричневая	Отдельные зерна	В минах



Рис. 1. Мина *Aulagromyza hendeliana* (Hering, 1926)
на листовой пластинке *Lonicera xylosteum* L.
Fig. 1. Mine of *Aulagromyza hendeliana* (Hering, 1926)
on *Lonicera xylosteum* L. leaf plate



Рис. 2. Мина *Aulagromyza cornigera* (Griffiths, 1973)
на листовой пластинке *Lonicera caerulea* L.
Fig. 2. Mine of *Aulagromyza cornigera* (Griffiths, 1973)
on *Lonicera caerulea* L. leaf plate



Рис. 3. Мина *Aulagromyza luteoscutellata* (de Meijere, 1924)
на листовой пластинке *Symphoricarpos albus* L.
Fig. 3. Mine of *Aulagromyza luteoscutellata* (de Meijere, 1924)
on *Symphoricarpos albus* L. leaf plate



Рис. 4. Мина *Chromatomyia aprilina* (Goureau, 1851)
на листовой пластинке *Lonicera xylosteum* L.
Fig. 4. Mine of *Chromatomyia aprilina* (Goureau, 1851)
on *Lonicera xylosteum* L. leaf plate



Рис. 5. Мина *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922)
на листовой пластинке *Symphoricarpos albus* L.
Fig. 5. Mine of *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922)
on *Symphoricarpos albus* L. leaf plate



Рис. 6. Мины *Chromatomyia lonicerae* (Robineau-Desvoidy, 1851)
на листовой пластинке *Lonicera prolifera* Rehd.
Fig. 6. Mines of *Chromatomyia lonicerae* (Robineau-Desvoidy, 1851)
on *Lonicera prolifera* Rehd. leaf plate

Таблица 2

Повреждаемость жимолостей (*Lonicera* L.) и снежноягодников (*Symphoricarpos* Duhamel) минирующими мухами (Diptera: Agromyzidae) в декоративных зеленых насаждениях Беларуси

Table 2

Damage caused to honeysuckles (*Lonicera* L.) and snowberries (*Symphoricarpos* Duhamel) by mining flies (Diptera: Agromyzidae) in green areas in Belarus

Жимолости и снежноягодники	Фитофаги					
	<i>Aulagomyza cornigera</i> (Griffiths, 1973)	<i>Aulagomyza hendeliana</i> (Hering, 1926)	<i>Aulagomyza luteoscutellata</i> (de Meijere, 1924)	<i>Chromatomyia aprilina</i> (Goureau, 1851)	<i>Chromatomyia loniceræ</i> (Robineau-Desvoidy, 1851)	<i>Chromatomyia periclymeni</i> (Hendel, 1922)
<i>Lonicera caerulea</i> L.	+	–	–	–	+	–
<i>Lonicera canadensis</i> Bartr. ex Marsh.	–	–	–	–	+	–
<i>Lonicera caprifolium</i> L.	–	–	–	–	+	–
<i>Lonicera caucasica</i> Pall.	–	–	–	–	+	–
<i>Lonicera prolifera</i> Rehd.	–	+	–	–	+	–
<i>Lonicera tatarica</i> L.	+	+	+	–	–	–
<i>Lonicera webbiana</i> Wall. ex DC.	–	–	–	–	–	–
<i>Lonicera xylosteum</i> L.	+	+	+	+	+	+
<i>Symphoricarpos albus</i> L.	+	+	+	–	+	+
<i>Symphoricarpos hesperius</i> G. N. Jones	–	–	–	–	+	–

Уровень вредоносности в декоративных зеленых насаждениях определяется среди прочего распространенностью фитофагов в отдельных регионах страны, а также способностью давать в этих условиях вспышки массового размножения либо принадлежностью к числу массовых видов.

В табл. 3 обобщены усредненные за период исследований данные, характеризующие минирующих мух, личинки которых повреждают жимолости и снежноягодники в декоративных зеленых насаждениях Беларуси.

Таблица 3

Распространенность агромизид (Diptera: Agromyzidae), повреждающих жимолости (*Lonicera* L.) и снежноягодники (*Symphoricarpos* Duhamel), заселенность и поврежденность декоративных кустарников в зеленых насаждениях Беларуси

Table 3

The spreading of mining flies (Diptera: Agromyzidae), damaging honeysuckles (*Lonicera* L.) and snowberries (*Symphoricarpos* Duhamel), occurrence of mines and degree of damage to ornamental shrubs in green areas in Belarus

Фитофаг	Заселенность	Поврежденность	Распространение
<i>Aulagomyza cornigera</i>	3	2	Повсеместное
<i>Aulagomyza hendeliana</i>	1	1	Спорадичное
<i>Aulagomyza luteoscutellata</i>	2	2	Повсеместное
<i>Chromatomyia aprilina</i>	3	3	Спорадичное
<i>Chromatomyia loniceræ</i>	2	2	Повсеместное
<i>Chromatomyia periclymeni</i>	1	1	Спорадичное

Данные, представленные в табл. 3, позволяют заключить, что к числу массовых и повсеместно распространенных в декоративных зеленых насаждениях Беларуси принадлежат виды *A. cornigera*, *A. luteoscutellata* и *Ch. lonicerae*. Именно эти агромизиды и являются значимыми вредителями декоративных кустарников, что подтверждают результаты ранее выполненной нами количественной оценки физиологической вредоносности, экологически обусловленной и общей вредоносности минирующих мух в декоративных зеленых насаждениях Беларуси [9].

Заключение

Исходя из результатов проведенных исследований, можно сделать следующие выводы:

1. В декоративных зеленых насаждениях Беларуси жимолости (*Lonicera* L.) и снежнаягодники (*Symphoricarpos* DuRoi) повреждаются личинками 6 видов минирующих мух (Diptera: Agromyzidae), а именно: *Aulagromyza cornigera* (Griffiths, 1973), *Aulagromyza hendeliana* (Hering, 1926), *Aulagromyza luteoscutellata* (de Meijere, 1924), *Chromatomyia aprilina* (Goureau, 1851), *Chromatomyia lonicerae* (Robineau-Desvoidy, 1851), *Chromatomyia periclymeni* (Hendel, 1922). Возможно выявление еще одного вида агромизид, известного в фауне сопредельных государств (Литвы и России), – *Chromatomyia isicae* (Hering, 1962).
2. Судя по представленным характеристикам наносимых личинками повреждений (мин), у всех 6 рассмотренных видов агромизид они формируются как верхнесторонние или преимущественно верхнесторонние. У *Ch. aprilina*, *Ch. lonicerae*, *Ch. periclymeni* пупарии размещаются в минах, у *A. cornigera*, *A. hendeliana*, *A. luteoscutellata* – вне мин.
3. Листовые пластинки жимолостей повреждаются личинками 6 видов агромизид, снежнаягодников – 5 видов. Наиболее широким кругом трофических связей характеризуется *Ch. lonicerae*. Среди охваченных исследованиями видов декоративных кустарников к повреждению агромизидами устойчива лишь *Lonicera webbiana* Wall. ex DC.
4. На основе оценок поврежденности и заселенности растений, а также распространенности агромизид к числу имеющих хозяйственное значение в качестве вредителей декоративных зеленых насаждений отнесены *A. cornigera*, *A. luteoscutellata* и *Ch. lonicerae*.

Библиографические ссылки

1. Володько ИК, Белоусова НЛ, Бородич ГС, Брель НГ, Булыко СЕ, Вайновская ИФ и др., составители. *Каталог сосудистых растений Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (открытый грунт)*. Решетников ВН, Титок ВВ, редакторы. Минск: Тэхналогія; 2010. 264 с.
2. Чаховский АА, Бурова ЭА, Орленок ЕИ, Гусарова ЛП. *Красивоцветущие кустарники для садов и парков*. Минск: Ураджай; 1988. 144 с.
3. The Plant List. Version 1.1 [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.theplantlist.org>.
4. Бученков ИЭ, Нилова ОВ. *Декоративная дендрология: краткий курс лекций. Часть 3*. Пинск: Полесский государственный университет; 2013. 187 с.
5. Буга СВ. *Дендрофильные тли Беларуси*. Минск: БГУ; 2001. 98 с.
6. Сауткин ФВ, Рыжая АВ, Буга СВ. Насекомые-фитофаги – вредители декоративных кустарников в зеленых насаждениях г. Гродно. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2012;3:49–54.
7. Ortiz RG. *Biosystematic contributions to Agromyzidae: thesis Doctoral*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2009. 422 p.
8. Civelek HS, Önder F. An investigations on the role of leaf miners (Diptera: Agromyzidae) on transmission of plant diseases. *Turkish Journal of Entomology*. 1997;21(3):233–241.
9. Волосач МВ, Буга СВ. Комплексная оценка вредоносности минирующих мух (Diptera: Agromyzidae) – вредителей декоративных древесных растений Беларуси. В: *Защита растений. Выпуск 43*. Минск: [б. и.]; 2019. с. 247–256.
10. Волосач МВ. Краткий обзор минирующих мух (Diptera, Agromyzidae) фауны Беларуси. В: Бородин ОИ, Цинкевич ВА, редакторы. *Итоги и перспективы развития энтомологии в Восточной Европе: сборник статей II Международной научно-практической конференции; 6–8 сентября 2017 г.; Минск, Беларусь*. Минск: А. Н. Вараксин; 2017. с. 112–115.
11. Нестерович НД. *Интродукционные районы и древесные растения для зеленого строительства в Белорусской ССР*. Минск: Наука і тэхніка; 1982. 109 с.
12. Бридсон Д, Форман Л, редакторы. *Гербарное дело: справочное руководство*. Еремеева Е, Гельтман Д, Соколова И, переводчики; Гельтман ДВ, редактор перевода. Кью: Королевский ботанический сад; 1995. XVI, 341 с.
13. Beiger M. *Owady minujące Polski. Klucz do oznaczenia na podstawie min*. Poznan: Bogucki Wydawnictwo Naukowe; 2004. 894 s.
14. Ellis WN. Leafminers and plant galls of Europe [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.bladmineerders.nl>.
15. Pitkin B, Ellis W, Plant C, Edmunds R. The leaf and stem mines of British flies and other insects (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera and Lepidoptera) [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.ukflymines.co.uk>.
16. Edmunds R. British leafminers [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.leafmines.co.uk>.
17. Блинцов АИ. *Способ определения устойчивости древесных растений к вредителям: информационный листок БелНИИТИ № 58*. Минск: [б. и.]; 1986. 4 с.
18. Martinez M. Fauna Europaea. Version 2.4 [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.faunaeur.org>.

19. Сергейчик СА, Сергейчик АА, Шобанова ИА, Борсук ЕА, Николайчук АМ, Сидорович ЕА, составители. *Ассортимент аборигенных и интродуцированных деревьев и кустарников, рекомендуемых для озеленения промышленно-городских территорий, автомагистралей, в зонах загрязнения воздуха газообразными соединениями азота, формальдегидом, бенз(а)пиреном, хлористым водородом*. Сидорович ЕА, редактор. Минск: Эдит ВВ; 2005. 48 с.

20. Сидорович ЕА, Гаранович ИМ, Чаховский АИ, составители. *Ассортимент декоративных деревьев и кустарников для зеленого строительства Беларуси и рекомендации по оптимизации условий выращивания сеянцев*. Сидорович ЕА, редактор. Минск: Тэхналогія; 1997. 62 с.

21. Гаранович ИМ. *Перспективные плодово-ягодные растения для садоводства в БССР*. Минск: БелНИИТИ; 1991. 44 с.

References

1. Volod'ko IK, Belousova NL, Borodich GS, Brel' NG, Bulyko SE, Vainovskaya IF, et al., compilers. *Katalog sosudistykh rastenii Tsentral'nogo botanicheskogo sada Natsional'noi akademii nauk Belarusi (otkrytyi grunt)* [Catalog of vascular plants of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (open field)]. Reshetnikov VN, Titok VV, editors. Minsk: Tjehnologija; 2010. 264 p. Russian.
2. Chakhovskii AA, Burova EA, Orlenok EI, Gusarova LP. *Krasivotsvetushchie kustarniki dlya sadov i parkov* [Beautiful flowering shrubs for gardens and parks]. Minsk: Uradzhaj; 1988. 144 p. Russian.
3. The Plant List. Version 1.1 [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.theplantlist.org>.
4. Buchenkov IE, Nilova OV. *Dekorativnaya dendrologiya: kratkii kurs lektsii. Chast' 3* [Decorative dendrology: short lecture course. Part 3]. Pinsk: Polessky State University; 2013. 187 p. Russian.
5. Buga SV. *Dendrofil'nye tli Belarusi* [Dendrophilous aphids of Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2001. 98 p. Russian.
6. Sautkin FV, Ryzhaya AV, Buga SV. [Phytophagous pests of ornamental shrubs in green stands in Grodno]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2012;3:49–54. Russian.
7. Ortiz RG. *Biosystematic contributions to Agromyzidae: thesis Doctoral*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2009. 422 p.
8. Civelek HS, Önder F. An investigations on the role of leaf miners (Diptera: Agromyzidae) on transmission of plant diseases. *Turkish Journal of Entomology*. 1997;21(3):233–241.
9. Volosach MV, Buga SV. [Complex harmfulness assessment of mining flies (Diptera: Agromyzidae) – pests of ornamental woody plants in Belarus]. In: *Zashchita rastenii. Vypusk 43* [Plant protection: a collection of scientific papers. Issue 43]. Minsk: [s. n.]; 2019. p. 247–256. Russian.
10. Volosach MV. [A brief overview of mining flies (Diptera, Agromyzidae) of the fauna of Belarus]. In: Borodin OI, Tsinkevich VA, editors. *Itogi i perspektivy razvitiya entomologii v Vostochnoi Evrope: sbornik statei II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 6–8 sentyabrya 2017 g.; Minsk, Belarus'* [Results and prospects of entomology development in Eastern Europe: collection of articles of the II International scientific and practical conference; 2017 September 6–8; Minsk, Belarus]. Minsk: A. N. Varaksin; 2017. p. 112–115. Russian.
11. Nesterovich ND. *Introduktsionnye raiony i drevesnye rasteniya dlya zelenogo stroitel'stva v Belorusskoi SSR* [Introduction areas and woody plants for green building in the in the Belarusian SSR]. Minsk: Navuka i tjehnika; 1982. 109 p. Russian.
12. Bridson DM, Forman L, editors. *The herbarium handbook*. Kew: Royal Botanic Gardens; 1992. 303 p.
Russian edition: Bridson D, Forman L, editors. *Gerbarnoe delo: spravochnoe rukovodstvo*. Eremeeva E, Gel'tman D, Sokolova I, translators; Gel'tman DV, translation editor. Kew: Royal Botanic Gardens; 1995. XVI, 341 p.
13. Beiger M. *Owady minujace Polski. Klucz do oznaczania na podstawie min*. Poznan: Bogucki Wydawnictwo Naukowe; 2004. 894 s.
14. Ellis WN. Leafminers and plant galls of Europe [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.bladmineerders.nl>.
15. Pitkin B, Ellis W, Plant C, Edmunds R. The leaf and stem mines of British flies and other insects (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera and Lepidoptera) [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.ukflymines.co.uk>.
16. Edmunds R. British leafminers [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.leafmines.co.uk>.
17. Blintsov AI. *Sposob opredeleniya ustoichivosti drevesnykh rastenii k vreditelyam: informatsionnyi listok BelNIINTI № 58* [The method of determining the resistance of woody plants to pests: BelNIINTI information sheet No. 58]. Minsk: [s. n.]; 1986. 4 p. Russian.
18. Martinez M. Fauna Europaea. Version 2.4 [Internet; cited 2020 January 10]. Available from: <http://www.faunaeur.org>.
19. Sergeichik SA, Sergeichik AA, Shobanova IA, Borsuk EA, Nikolaichuk AM, Sidorovich EA, compilers. *Assortiment aborigennykh i introdutsirovannykh derev'ev i kustarnikov, rekomenduemykh dlya ozeleneniya promyshlenno-gorodskikh territorii, avtomagistralей, v zonakh zagryazneniya vozdukhа gazoobraznyimi soedineniyami azota, formal'degidom, benz(a)pirenom, khlорistym vodorodom* [The assortment of native and introduced trees and shrubs, recommended for landscaping of industrial-urban areas, highways, in areas of air polluted by gaseous nitrogen compounds, formaldehyde, benzo(a)pyrene, hydrogen chloride]. Sidorovich EA, editor. Minsk: Edit VV; 2005. 48 p. Russian.
20. Sidorovich EA, Garanovich IM, Chakhovskii AI, compilers. *Assortiment dekorativnykh derev'ev i kustarnikov dlya zelenogo stroitel'stva Belarusi i rekomendatsii po optimizatsii uslovii vyrashchivaniya seyantsев* [The assortment of decorative trees and shrubs for green construction in Belarus and recommendations for optimizing the conditions for growing seedlings]. Sidorovich EA, editor. Minsk: Tjehnologija; 1997. 62 p. Russian.
21. Garanovich IM. *Perspektivnye plodovo-yagodnye rasteniya dlya sadovodstva v BSSR* [Promising horticultural plants in the BSSR]. Minsk: BelNIINTI; 1991. 44 p. Russian.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

SHORT COMMUNICATIONS

УДК 582.28(476.2)

ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ НА ТЕРРИТОРИИ г. КАЛИНКОВИЧИ

Н. А. ЛЕМЕЗА¹⁾, И. С. ГИРИЛОВИЧ¹⁾, Я. С. ДАСЬКО¹⁾

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

В результате проведенных исследований на территории г. Калинковичи было обнаружено 186 видов фитопатогенных грибов и грибоподобных организмов, относящихся к 4 отделам – Oomycota, Ascomycota, Basidiomycota и Deuteromycota. Выявленные микромицеты паразитировали на 165 видах питающих растений из 45 семейств. Отдел Ascomycota в пределах города представлен 70 видами из 19 родов, отдел Basidiomycota – 32 видами из 9 родов, отдел Deuteromycota – 47 видами из 18 родов, а отдел Oomycota – 37 видами из 7 родов.

Ключевые слова: микромицеты; оомицеты; аскомицеты; базидиомицеты; дейтеромицеты; мучнисторосяные грибы; ржавчинные грибы.

Образец цитирования:

Лемеза НА, Гирилович ИС, Дасько ЯС. Фитопатогенные микромицеты на территории г. Калинковичи. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020; 1:55–60.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-55-60>

For citation:

Lemeza NA, Hirilovich IS, Dasko JaS. Phytopathogenic micro-mycetes of the town of Kalinkovichi. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;1:55–60. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-55-60>

Авторы:

Николай Алексеевич Лемеза – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Иван Сергеевич Гирилович – кандидат биологических наук; инженер-дендролог ботанического сада.

Янина Сергеевна Дасько – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Н. А. Лемеза.

Authors:

Nikolai A. Lemeza, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
lemeza_na@mail.ru

Ivan S. Hirilovich, PhD (biology); engineer-dendrologist at the botanical garden.

Janina S. Dasko, student at the faculty of biology.

PHYTOPATHOGENIC MICROMYCETES OF THE TOWN OF KALINKOVICHI

N. A. LEMEZA^a, I. S. HIRILOVICH^a, Ja. S. DASKO^a

^a*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*

Corresponding author: N. A. Lemeza (lemeza_na@mail.ru)

As a result of the conducted researches in the territory of Kalinkovichi it was found 186 species of phytopathogenic fungi and fungus-like organisms, belonging to 4 divisions – Oomycota, Ascomycota, Basidiomycota and Deuteromycota. The detected micromycetes were parasitizing on 165 species of feeding plants from 45 families. The division of Ascomycota in the town of Kalinkovichi is represented by 70 species of 19 genera, the division of Basidiomycota – 32 species from 9 genera, the division of Deuteromycota – 47 species from 18 genera and the division of Oomycota – 37 species from 7 genera.

Keywords: micromycetes; oomycetes; ascomycetes; basidiomycetes; deuteromycetes; powdery mildew fungi; rust fungi.

Введение

Изучение видового состава, распространения, вредоносности и некоторых экологических особенностей фитопатогенных микромицетов как важнейших консортов любой экосистемы представляет несомненную научную и практическую значимость. Подобные исследования направлены на разработку новых и повышение эффективности уже существующих методов борьбы с грибными болезнями растений, которые ежегодно приводят во всем мире к значительному (более 30 %) снижению урожайности сельскохозяйственных культур и качества получаемой продукции, а также ухудшают декоративные свойства древесных, кустарниковых и травянистых растений в парках, скверах, садах, оранжереях и огородах.

В последние годы особый интерес представляют исследования микобиоты на урбанизированных территориях, в том числе обнаружение инвазивных видов и определение механизма их адаптации к экстремальным факторам городской среды, где в силу ряда причин создаются благоприятные условия для развития фитопатогенных микромицетов. В городах четко прослеживаются агрессивное влияние на растения выбросов промышленных предприятий и автотранспорта в виде газов, жидких аэрозолей, попадание в почву используемых солевых растворов, реагентов и вредных веществ с дорожного покрытия, загрязнение водоемов промышленными и бытовыми отходами и т. д. Постоянное воздействие на растительные организмы многочисленных неблагоприятных факторов техногенной среды отрицательно влияет на их жизнедеятельность, в результате чего резко снижается устойчивость растений, используемых в озеленении населенных пунктов, к фитопатогенным грибам.

Подобные целенаправленные исследования на территории г. Калинковичи Гомельской области, где работает ряд промышленных предприятий, ранее не проводились.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили дикорастущие и культурные растения, пораженные фитопатогенными микромицетами и произрастающие в различных экологических условиях г. Калинковичи. Полевые исследования в целях выявления пораженных растений осуществлялись детально-маршрутным и стационарным методами в течение вегетационных периодов 2015–2018 гг. Собранный материал обрабатывался по общепринятой методике. Идентификация фитопатогенных микромицетов выполнялась по [1–12], а питающих растений – по [13; 14].

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных исследований на территории полесского районного центра Калинковичи выявлено 186 видов фитопатогенных грибов и грибоподобных организмов, относящихся к 4 отделам – Oomycota, Ascomycota, Basidiomycota и Deuteromycota. При этом отдел Ascomycota был представлен

70 видами из 19 родов, отдел Basidiomycota – 32 видами из 9 родов, отдел Deuteromycota – 47 видами из 18 родов, а отдел Oomycota – 37 видами из 7 родов. Обнаруженные микромицеты паразитировали на 165 видах питающих растений из 45 семейств. Главным образом они развивались на листьях, стеблях, бутонах, цветках и плодах травянистых, реже древесных растений, а также на растительных остатках. Приводим краткий обзор полученных результатов.

Оомицеты включали 37 видов из 2 семейств – Albuginaceae и Peronosporaceae – порядка Peronosporales. Большинство видов (22) относились к роду *Peronospora*, остальные – к родам *Hyaloperonospora*, *Paraperonospora* и *Plasmopara* (по 3 вида), *Albugo* и *Bremia* (по 2 вида), *Pseudoperonospora* (1 вид). Среди представителей рода *Peronospora* многие были широко распространены во всех геоботанических подзонах республики, в том числе выявленных и на территории г. Калинин. Прежде всего это виды *Peronospora alta* Fuckel на *Plantago major* L.; *P. polygoni* Halst. на *Polygonum aviculare* L.; *P. sisymbrii-officinalis* Gäum. на *Sisymbrium officinale* (L.) Scop.; *P. trifoliorum* de Bary на *Trifolium pratense* L., *T. medium* L.; *P. flava* Gäum. на *Linaria vulgaris* Mill.; *Bremia lactucae* Regel на *Arctium lappa* L., *A. tomentosum* Mill., *Lactuca serriola* L., *Sonchus arvensis* L. и др. Ежегодно отмечалось интенсивное развитие *Hyaloperonospora parasitica* (Pers.) Constant., *H. erophilae* (Gäum.) Göker, *H. berteroae* (Gäum.) Göker, *H. barbareae* (Gäum.) Göker, *Albugo candida* (Pers.) Roussel на растениях семейства Brassicaceae. Такие виды, как *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et M. A. Curtis) Rostovzev, *Plasmopara viticola* (Berk. et M. A. Curtis) Berl. et De Toni, *Pl. nivea* (Unger) J. Schröt., *Paraperonospora leptosperma* (de Bary) Constant., *P. tanacetii* (Gäum.) Constant., *Peronospora farinosa* (Fr.) Fr., *Albugo bliti* (Biv.) Kuntze, имели ограниченное распространение, но вызывали высокую степень поражения в местах произрастания питающих растений. Значительно реже встречались *Bremia cirsii* (Jacq. ex Uljan.) J. F. Tao et Y. N. Yu, *Paraperonospora sulphurea* (Gäum.) Constant., *Peronospora aestivalis* Syd., *P. arthuri* Farl., *P. chelidonii* Miyabe, *P. cyparissiae* de Bary, *P. meliloti* Syd., *P. rumicis* Corda, *P. verna* Gäum., *P. violae* de Bary.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что представители порядка Peronosporales паразитировали на 44 видах питающих растений из 40 родов 20 семейств. Наибольшее количество видов питающих растений (10) относились к семейству Asteraceae. Семейства Brassicaceae и Fabaceae включали по 6 видов, Caryophyllaceae, Polygonaceae, Plantaginaceae, Ranunculaceae и Scrophulariaceae – по 2 вида, остальные – по 1 виду питающих растений.

Аскомицеты были представлены 70 видами из 19 родов 7 порядков. Преобладающее число видов (53) принадлежали к 7 родам порядка Erysiphales. Из них доминирующими по видовому составу являлись роды *Erysiphe* (28), *Podosphaera* (10), *Golovinomyces* (8), *Phyllactinia* (3), *Sawadaea* (2). Роды *Blumeria* и *Neoerysiphe* включали по 1 виду.

Многие виды мучнисторосяных грибов – *Erysiphe adunca* (Wallr.) Fr., *E. palczewskii* (Jacq.) U. Braun et S. Takam., *E. buhrii* U. Braun, *E. berberidis* DC., *E. flexuosa* (Peck) U. Braun et S. Takam., *E. cruciferarum* Opiz ex L. Junell, *E. polygoni* DC., *E. trifoliorum* (Wallr.) U. Braun, *Golovinomyces ambrosiae* (Schwein.) U. Braun et R. T. A. Cook, *G. asterum* (Schwein.) U. Braun, *G. depressus* (Wallr.) V. P. Heluta, *G. magnicellulatus* (U. Braun) V. P. Heluta, *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr.) de Bary, *P. xanthii* (Castagne) U. Braun et S. Takam., *Sawadaea bicornis* (Wallr.: Fr.) Nomma – встречались практически повсеместно и вызывали высокую степень поражения питающих растений.

Ограниченное распространение среди эризифальных грибов имели такие виды, как *Erysiphe corylacearum* U. Braun et S. Takam., *E. fraxinicola* U. Braun et S. Takam., *E. ulmi* Castagne, *E. alphitoides* (Griffon et Maubl.) U. Braun et S. Takam., *E. syringae* Schwein., *E. necator* Schwein., *Golovinomyces cynoglossi* (Wallr.) V. P. Heluta и др.

Мучнисторосяные грибы паразитировали на 96 видах питающих растений из 84 родов 32 семейств.

Другие порядки аскомицетов включали небольшое количество видов. Так, порядок Rhytismatales был представлен 6 видами, Нуроскреales – 4, Taphrinales – 3, Phyllachorales – 2, а Diaporthales и Pleosporales – 1 видом каждый. Относящиеся к перечисленным порядкам виды имели ограниченное распространение в культурфитоценозах города. В частности, такие представители ритизмовых, как *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fr. (выявлена на *Acer platanoides* и *A. ginnala*), *Rh. salicinum* (Pers.) Fr. (обнаружена на представителях рода *Salix*), *Lophodermium pinastri* (Schrad.) Chevall., *L. seditiosum* Minter et al. (выявлены на *Pinus sylvestris*), вызывали образование на листьях черных стром. Виды, относящиеся к порядку гипокрейнных (*Nectria cinnabarina* (Tode) Fr., *Neonectria ditissima* (Tul. et C. Tul.) Samuels et Rossman), образовывали на поврежденных ветвях и стволах древесных и кустарниковых растений оранжевые стромы. Также было отмечено поражение грибом *Ophiognomonium leptostyla* (Fr.) Sogonov растения *Juglans regia* L., *Phyllachora graminis* (Pers.) Fuckel – *Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub, *Polystigma rubrum* (Pers.) DC. – *Prunus domestica* L., *Didymella applanata* (Niessl) Sacc. – *Rubus idaeus* L. Тафриновые грибы

(*Taphrina padi* (Jacz.) Mix, *T. pruni* (Fuckel) Tul., *T. populina* Fries) вызывали повреждения плодов черемухи и сливы, листьев тополей.

Таким образом, аскомицеты паразитировали на 104 видах питающих растений из 84 родов 32 семейств.

Базидиомицеты включали 32 вида из 9 родов порядка Pucciniales. Среди ржавчинных (пукциниевых) грибов доминирующими являлись виды, относящиеся к родам *Puccinia* (17), *Uromyces* (5), *Phragmidium* (3), *Melampsora* (2). Роды *Coleosporium*, *Cumminsia*, *Gymnosporangium*, *Melampsoridium*, *Pucciniastrum* были представлены по 1 виду каждый.

Широкое распространение получили такие виды, как *Phragmidium mucronatum* (Pers.) Schldl., *Ph. potentillae* (Pers.) P. Karst., *Melampsora epitea* Thüm., *Uromyces polygoni-avicularis* (Pers.) G. H. Oth, *U. pisi-sativi* (Pers.) Liro, *U. rumicis* (Schumach.) G. Winter, *Puccinia calcitrapae* DC., *P. chrysanthemi* Roze, *P. helianthi* Schwein., *P. hieracii* (Röhl.) H. Mart., *P. malvacearum* Bertero ex Mont., *P. opizii* Bubák, *P. punctiformis* (F. Strauss) Röhl., *P. tanacetii* DC., *Coleosporium tussilaginis* (Pers.) Lév. и др. Реже встречались *Cumminsia mirabilissima* (Peck) Nannf., *Melampsora magnusiana* G. H. Wagner, *Melampsoridium betulinum* (Pers.) Kleb., *Pucciniastrum areolatum* (Fr.) G. H. Oth, *Gymnosporangium cornutum* Arthur ex F. Kern, *Puccinia agrostidis* Plowr., *P. porri* (Sowerby) G. Winter, *P. carthami* Corda, *P. menthae* Pers., *P. poarum* Nielsen, *Uromyces lupinicola* Bubák и др. Следует отметить, что среди пукциниевых преобладали полноцикловые виды.

Наибольшее число видов пораженных ржавчинными грибами растений относились к семействам Asteraceae (12), Rosaceae (8), Poaceae (5), Fabaceae (4), Polygonaceae (3). Семейства Apiaceae, Lamiaceae и Malvaceae включали по 2 вида, остальные были представлены 1 видом каждое.

Базидиальные грибы развивались на 46 видах растений-хозяев, принадлежащих к 39 родам 16 семейств.

Дейтеромицеты включали 47 видов, относящихся к 2 классам – Hyphomycetes (23 вида из 10 родов) и Coelomycetes (24 вида из 8 родов).

Гифомицеты были представлены такими родами, как *Ramularia* (5 видов), *Fusicladium* (4 вида), *Monilia* (3 вида), *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Cladosporium* (по 2 вида), *Cercospora*, *Helminthosporium* и *Leptoxylum* (по 1 виду каждый). Наиболее широкое распространение среди гифомицетов получили *Cercospora microsora* Sacc. на *Tilia cordata* Mill., *C. ligustrina* Boerema на *Ligustrum vulgare* L., *Ramularia heraclei* (Oudem.) Sacc. на *Heracleum sibiricum* L., *R. tulasnei* Sacc. на *Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier, *R. urticae* Ces. на *Urtica urens* L., *Leptoxylum fumago* (Woron.) R. C. Srivast. на *Tilia cordata* Mill. и других растениях. *Botrytis cinerea* Pers., *B. paeoniae* Oudem., *Monilia cinerea* Bonard. на *Cerasus vulgaris* Mill., *M. cydoniae* Schellenb. на *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. имели ограниченное распространение. Гифомицеты развивались на живых органах (листьях, стеблях, плодах) 25 видов питающих растений из 12 семейств.

Целомицеты включали такие роды, как *Septoria* (6 видов), *Phyllosticta* (5 видов), *Gloeosporium* (4 вида), *Marssonina* (3 вида), *Ascochyta* и *Cylindrosporium* (по 2 вида), *Entomosporium* и *Polystigma* (по 1 виду). Интенсивное поражение растений вызывали *Phyllosticta sorbi* Westend. на *Sorbus aucuparia* L., *Ph. paviae* Desm. на *Aesculus hippocastanum* L., *Marssonina populi* (Lib.) Magnus на *Populus tremula* L., *M. rosae* (Lib.) Died. на *Rosa* sp. cult., *Septoria paeoniae* Westend. на *Paeonia lactiflora* Pall., *S. populi* Desm. на *Populus balsamifera* L., *P. suaveolens* Fisch. и др. Целомицеты паразитировали на 21 виде питающих растений из 12 семейств.

Дейтеромицеты выявлены на 38 видах питающих растений из 35 родов 18 семейств. Больше всего видов растений-хозяев отмечено в семействах Rosaceae (9) и Salicaceae (4). В составе других семейств обнаружено по 1–2 вида пораженных растений.

Анализ полученных результатов показывает, что для такой сравнительно небольшой территории, какую занимает г. Калинковичи, видовой состав фитопатогенных микромицетов достаточно велик (186 видов). Среди них значительное количество видов встречаются во всех геоботанических подзонах страны. Это обусловлено не только повсеместным произрастанием питающих их растений, но и экологическими условиями, которые в разных частях города заметно отличаются друг от друга.

Многие виды фитопатогенных грибов и грибоподобных организмов имеют широкое распространение по всей территории города и поражают как дикорастущие, так и культивируемые растения. Большинство питающих растений представлены травянистыми и древесными формами, среди которых есть ценные в народно-хозяйственном значении виды (цветочные, лекарственные, пищевые, декоративные древесные и кустарниковые растения).

Такое разнообразие видового состава фитопатогенных микромицетов на территории города обусловлено не только достаточно высокой видовой насыщенностью растений-хозяев, но и значительным антропогенным влиянием на растительные комплексы – парки, скверы, сады, клумбы и т. д. Постоянное воздействие на растительные организмы многочисленных неблагоприятных факторов техногенной среды отрицательно сказывается на жизнедеятельности растений и тем самым резко ослабляет их иммунитет. Нами установлено, что различные типы насаждений (парки, скверы, посадки вблизи зданий, обсадки дорог и др.) отличаются видовым составом не только используемых в озеленении растений, но и микромицетов. Подавляющее большинство видов пораженных патогенами растений встречаются в зонах повышенной загрязненности окружающей среды, т. е. в обсадах шоссе, автостоянок, вокзалов, гаражных кооперативов и промышленных предприятий, в рудеральных местах, живой изгороди, на придорожных клумбах и в аллеях. В относительно удаленных от дорог и промышленных предприятий местах (лесопарковые зоны, закрытые жилые комплексы и др.) обнаруживается меньшее количество пораженных грибами растений.

Библиографические ссылки

1. Азбукина ЗМ. *Низшие растения, грибы и мохообразные Дальнего Востока России. Грибы. Том 5. Ржавчинные грибы.* Владивосток: Дальнаука; 2005. 616 с.
2. Азбукина ЗМ. *Ржавчинные грибы Дальнего Востока.* Москва: Наука; 1974. 527 с.
3. Гелюта ВП. *Флора грибов Украины. Мучнисторосяные грибы.* Киев: Наукова думка; 1989. 256 с.
4. Гирилович ИС. *Грибopodobные организмы (порядок Peronosporales) Беларуси.* Минск: БГУ; 2013. 183 с.
5. Гирилович ИС. *Мучнисторосяные грибы (порядок Erysiphales) Беларуси.* Минск: БГУ; 2018. 279 с.
6. Журавлев ИИ, Селиванова ТН, Черемисинов НА. *Определитель грибных болезней деревьев и кустарников.* Москва: Лесная промышленность; 1979. 247 с.
7. Новотельнова НС, Пыстина КА. *Флора споровых растений СССР. Том 11. Грибы (3). Порядок Peronosporales (Семейства Pythiaceae, Phytophthoraceae, Peronosporaceae, Cystopaceae).* Ленинград: Наука; 1985. 363 с.
8. Купревич ВФ, Ульянищев ВИ. *Определитель ржавчинных грибов СССР. Часть 1.* Минск: Наука и техника; 1975. 336 с.
9. Маевский ПФ. *Флора средней полосы европейской части России.* 10-е издание. Москва: Товарищество научных изданий «КМК»; 2006. 600 с.
10. Сауткина ТА, Третьяков ДИ, Зубкевич ГИ, Козловская НВ, Парфенов ВИ, Блажевич РЮ и др. *Определитель высших растений Беларуси.* Парфенов ВИ, редактор. Минск: Дизайн ПРО; 1999. 472 с.
11. Ульянищев ВИ. *Определитель ржавчинных грибов СССР. Часть 2.* Ленинград: Наука; 1978. 384 с.
12. Хохряков МК, Доброзракова ТЛ, Степанов КМ, Летова МФ. *Определитель болезней растений.* 3-е издание. Санкт-Петербург: Лань; 2003. 592 с.
13. Braun U, Cook RTA. *Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildews).* Utrecht: CBS; 2012. 707 p. (CBS Biodiversity Series; volume 11).
14. Grigaliūnaitė V. *Lietuvos grybai. Tom 3. Knyga 1. Milteniečiai (Erysiphales).* Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas; 1997. 195 p.

References

1. Azbukina ZM. *Nizshie rasteniya, griby i mokhoobraznye Dal'nego Vostoka Rossii. Griby. Tom 5. Rzhavchinnye griby* [Lower plants, fungi and bryophytes of the Far East of Russia. Fungi. Volume 5. Rust fungi]. Vladivostok: Dal'nauka; 2005. 616 p. Russian.
2. Azbukina ZM. *Rzhavchinnye griby Dal'nego Vostoka* [Rust fungi of the Far East]. Moscow: Nauka; 1974. 527 p. Russian.
3. Gelyuta VP. *Flora gribov Ukrainy. Muchnistorosyanye griby* [Flora of mushrooms of Ukraine. Dry mildew fungi]. Kiev: Naukova dumka; 1989. 256 p. Russian.
4. Girilovich IS. *Gribopodobnye organizmy (poryadok Peronosporales) Belarusi* [Mushroom-like organisms (order Peronosporales) of Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2013. 183 p. Russian.
5. Girilovich IS. *Muchnistorosyanye griby (poryadok Erysiphales) Belarusi* [Dry mildew fungi (order Erysiphales) of Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2018. 279 p. Russian.
6. Zhuravlev II, Selivanova TN, Cheremisinov NA. *Opredelitel' gribnikh boleznei derev'ev i kustarnikov* [The determinant of fungal diseases of trees and shrubs]. Moscow: Lesnaya promyshlennost'; 1979. 247 p. Russian.
7. Novotel'nova NS, Pystina KA. *Flora sporovykh rastenii SSSR. Tom 11. Griby (3). Poryadok Peronosporales (Semeistva Pythiaceae, Phytophthoraceae, Peronosporaceae, Cystopaceae)* [Spore plants flora of the USSR. Volume 11. Mushrooms (3). Order Peronosporales (Families Pythiaceae, Phytophthoraceae, Peronosporaceae, Cystopaceae)]. Leningrad: Nauka; 1985. 363 p. Russian.
8. Kuprevich VF, Ul'yanishchev VI. *Opredelitel' rzhavchinnikh gribov SSSR. Chast' I* [The determinant of rust fungi of the USSR. Part 1]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1975. 336 p. Russian.
9. Maevskii PF. *Flora srednei polosy evropeiskoi chasti Rossii* [Flora of the middle zone of the European part of Russia]. 10th edition. Moscow: KMK Scientific Press Ltd.; 2006. 600 p. Russian.

10. Sautkina TA, Tret'yakov DI, Zubkevich GI, Kozlovskaya NV, Parfenov VI, Blazhevich RYu, et al. *Opredelitel' vysshikh rastenii Belarusi* [The determinant of higher plants of Belarus]. Parfenov VI, editor. Minsk: Dizain PRO; 1999. 472 p. Russian.
11. Ul'yanishchev VI. *Opredelitel' rzhavchinnykh gribov SSSR. Chast' 2* [The determinant of rust fungi of the USSR. Part 2]. Leningrad: Nauka; 1978. 384 p. Russian.
12. Khokhryakov MK, Dobrozrakova TL, Stepanov KM, Letova MF. *Opredelitel' boleznei rastenii* [Determinant of diseases of plants]. 3rd edition. Saint Petersburg: Lan'; 2003. 592 p. Russian.
13. Braun U, Cook RTA. *Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildews)*. Utrecht: CBS; 2012. 707 p. (CBS Biodiversity Series; volume 11).
14. Grigaliūnaitė B. *Lietuvos grybai. Tom 3. Knyga 1. Milteniečiai (Erysiphales)*. Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas; 1997. 195 p.

Статья поступила в редакцию 03.12.2019.
Received by editorial board 03.12.2019.

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ
INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 576.314:577.1(075.8)+577.352(075.8)

Орёл Н. М. Биохимия мембран и межклеточных коммуникаций [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 80 01 «Биология», 1-31 80 02 «Биохимия» / Н. М. Орёл ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск, 2019. 176 с. : ил. Библиогр.: с. 171–176. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/234270>. Загл. с экрана. Деп. 20.11.2019, № 011020112019.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов магистратуры. Содержание ЭУМК посвящено биохимии клеточных мембран, их строению, биогенезу, механизмам, обеспечивающим селективную проницаемость, транспорт, функционирование ассоциированных с мембранами ферментов, рецепторов, регуляторных веществ, формирование межклеточных контактов. В нем уделяется внимание методологии биохимических исследований этих клеточных структур, значению изучения биологических мембран и межклеточных коммуникаций для решения фундаментальных и прикладных задач биологии, медицины, сельского хозяйства.

УДК 57(075.3)

Селивёрстова А. В. Биология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для слушателей подготов. отд-ния и подготов. курсов фак. доунив. образования / А. В. Селивёрстова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск, 2019. 379 с. Библиогр.: с. 378–379. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/237574>. Загл. с экрана. Деп. 16.01.2020, № 000116012020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Биология» предназначен для реализации требований образовательной программы подготовки слушателей подготовительного отделения и подготовительных курсов факультета доуниверситетского образования к участию в централизованном тестировании в учреждениях высшего образования Республики Беларусь. Содержание ЭУМК предполагает изучение основных разделов курса биологии: «Вирусы», «Прокариоты», «Протисты», «Грибы», «Лишайники», «Растения», «Животные», «Человек», «Общая биология».

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

- Потапович А. И., Сухан Т. О., ШUTOва Т. Г., Костюк В. А. Рецептор-опосредованный эндоцитоз – важный путь поступления желатиновых наночастиц в клетки 3
- Мацкевич В. С., Шикер А. А., Звонарев С. Н., Лицкевич К. С., Туровец О. А., Смолич И. И., Соколик А. И., Демидчик В. В. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистидиновых комплексов 11

БИОХИМИЯ

- Пристуна К. В., Кукулянская Т. А., Храмова Е. А. Анализ содержания фенольных антиоксидантов и аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса..... 20
- Губич О. И., Бандык Я. А., Залеская Н. А., Окорокова С. С., Капаник А. И., Герасимова А. Э. Исследование адаптогенных, сахароснижающих и гепатопротекторных свойств клитории тройчатой (*Clitoria ternatea* L.) на экспериментальных моделях *in vivo* 27

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

- Руткевич Д. А., Королева Е. С., Храмова Е. А. Изучение влияния *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 на трансгенные растения *Nicotiana tabacum* в условиях абиотического стресса..... 39

ЗООЛОГИЯ

- Волосач М. В. Минирующие мухи (Diptera: Agromyzidae) – фитофаги жимолостей (*Lonicera* L.) и снежноягодников (*Symphoricarpos* Duhamel) в декоративных зеленых насаждениях Беларуси 47

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Лемеза Н. А., Гирилович И. С., Дасько Я. С. Фитопатогенные микромицеты на территории г. Калинковичи 55
- Аннотации депонированных в БГУ работ..... 61

CONTENTS

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

- Potapovich A. I., Suhan T. O., Shutava T. G., Kostyuk V. A.* Receptor-mediated endocytosis is an important way for gelatin nanoparticles penetration into cells 3
- Mackievic V. S., Shyker A. A., Zvanarou S. M., Litskevich K. S., Turovets O. A., Smolich I. I., Sokolik A. I., Demidchik V. V.* Growth inhibition and induction of programmed cell death in the root of *Helianthus annuus* L. triggered by nickel ions and nickel-histidine complexes..... 11

BIOCHEMISTRY

- Pristupa K. V., Kukulianskaya T. A., Khramtsova E. A.* Analysis of the low-molecular weight antioxidants of transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions..... 20
- Hubich A. I., Bandyk Y. A., Zalesskaya N. A., Okarakava S. S., Kapanic A. I., Herasimava A. E.* The investigation of adaptogenic, hypoglycemic and hepatoprotective properties of *Clitoria ternatea* L. on experimental models *in vivo* 27

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

- Rutkevich D. A., Karaleva K. S., Khramtsova E. A.* The influence of bacteria *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 on *Nicotiana tabacum* transgenic plants under abiotic stress conditions 39

ZOOLOGY

- Volosach M. V.* Mining flies (Diptera: Agromyzidae) – phytophages of honeysuckles (*Lonicera* L.) and snowberries (*Symphoricarpos* Duhamel) in green areas in Belarus 47

SHORT COMMUNICATIONS

- Lemeza N. A., Hirilovich I. S., Dasko Ja. S.* Phytopathogenic micromycetes of the town of Kalinkovichi 55
- Indicative abstracts of the papers deposited in BSU 61

*Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.
Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).*

**Журнал Белорусского
государственного университета. Биология.
№ 1. 2020**

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 *О. А. Семенец*
Технический редактор *В. В. Пижкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 27.02.2020.

Тираж 100 экз. Заказ 88.

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

© БГУ, 2020

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 1. 2020**

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 *O. A. Semenets*
Technical editor *V. V. Pishkova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 27.02.2020.

Edition 100 copies. Order number 88.

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, 2020