



ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

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

Выходит три раза в год

3

2017

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор	СИДОРОВ А. В. – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: sidorov@bsu.by
Заместитель главного редактора	ДЕМИДЧИК В. В. – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Ответственный секретарь	ХРАМЦОВА Е. А. – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

Гельтман Д. В.	Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Давыденко О. Г.	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Зинченко А. И.	Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Кильчевский А. В.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А.	Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Медведев С. С.	Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Решетников В. Н.	Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Семак И. В.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Титок М. А.	Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А.	Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.

EDITORIAL BOARD

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

Физиология и клеточная биология

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

УДК 591.041

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ (R.Pe.D.1) И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ (L.Pe.D.1) НЕЙРОНОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*

М. ШАХРАНИ¹⁾, А. В. СИДОРОВ¹⁾

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

Выполнена оценка показателей спонтанной электрической активности интернейронов дыхательной (R.Pe.D.1) и локомоторной (L.Pe.D.1) сетей центральной нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis*. Установлены статистически достоверные различия в уровне потенциала покоя и частоты импульсации: $-58,1 \pm 3,3$ мВ и $0,91 \pm 0,14$ Гц (R.Pe.D.1); $-49,0 \pm 2,8$ мВ и $1,45 \pm 0,12$ Гц (L.Pe.D.1). Выявлено смещение кривой вольт-амперной характеристики мембраны R.Pe.D.1 вправо в области отрицательных токов и влево – в области положительных токов по сравнению с L.Pe.D.1. В отношении временных характеристик спайка отмечено возрастание длительности потенциала действия у L.Pe.D.1 по сравнению с таковыми для R.Pe.D.1: фазы реполяризации – в 3,6 раза, деполяризации – в 1,5 раза, следовой гиперполяризации – в 1,2 раза. Амплитуды спайка и его отдельных частей статистически достоверно не различались. Предполагается, что особенности электрических характеристик мембраны обуславливают функциональную специфичность идентифицированных нейронов центральной нервной системы *Lymnaea stagnalis*.

Ключевые слова: потенциал покоя; потенциал действия; вольт-амперная характеристика; нейронные сети; беспозвоночные.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (задание 1.08).

Образец цитирования:

Шахрани М., Сидоров А. В. Сравнительная характеристика электрофизиологических показателей идентифицированных дофаминергических (R.Pe.D.1) и серотонинергических (L.Pe.D.1) нейронов центральной нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 3–9.

For citation:

Shahrani M., Sidorov A. V. Comparative study of electrophysiological characteristics of identified dopamine-containing (R.Pe.D.1) and serotonin-containing (L.Pe.D.1) neurons within CNS of mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 3–9 (in Russ.).

Авторы:

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

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

Authors:

Mohamed Shahrani, postgraduate student at the department of human and animal physiology, faculty of biology. alshahranimohamed45@gmail.com

Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), docent; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology. sidorov@bsu.by

COMPARATIVE STUDY OF ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF IDENTIFIED DOPAMINE-CONTAINING (R.Pe.D.1) AND SEROTONIN-CONTAINING (L.Pe.D.1) NEURONS WITHIN CNS OF MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS*

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

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

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

Microelectrode technique was used to determine parameters of spontaneous electrical activity of two interneurons within lung respiration (R.Pe.D.1) and locomotion (L.Pe.D.1) neuronal networks of *Lymnaea stagnalis*. Significant differences were detected for rest potential value and spike frequency: -58.1 ± 3.3 mV and 0.91 ± 0.14 Hz (R.Pe.D.1); -49.0 ± 2.8 mV and 1.45 ± 0.12 Hz (L.Pe.D.1). For R.Pe.D.1, a voltage-current curve shifts to the right or to the left at the negative and positive currents respectively in comparison with L.Pe.D.1 were determined. The increase of single action potentials duration was observed in L.Pe.D.1 in comparison with R.Pe.D.1: 3.6-time for depolarization phase, 1.5-time for repolarization phase and 1.2-time for undershoot. Amplitudes of action potentials and all its parts (threshold, undershoot) did not vary significantly. We suggest that peculiarities of electrical properties of membrane underlie functional specificity of identified neurons within *Lymnaea's* CNS.

Key words: rest potential; action potential; voltage-current curve; neuronal circuits; invertebrates.

Acknowledgements. This work supported by State Program for Scientific Research «Fundamental and applied sciences for medicine» (task 1.08).

Введение

Неотъемлемым свойством нервных клеток является их способность к развитию возбуждения, определяющего способность организма воспринимать воздействие разнообразных раздражителей. Генерация и последующее распространение возникающих при этом электрических сигналов лежат в основе функционирования взаимосвязанных скоплений нейронов – нервных центров, участвующих в реализации поведенческой активности животных. Представления об уникальности практически каждой из клеток центральной нервной системы (ЦНС) постепенно завоевывают все большее число сторонников, начиная с введения в обиход нейрофизиологии идеи об идентифицированных нейронах в первой половине и середине XX в. [1; 2]. Вместе с тем электрофизиологические критерии весьма ограниченно используются при описании того или иного нейрона, уступая таким его характеристикам, как расположение, размеры, цвет (в случае окрашенных клеток) и т. п. [3]. Как правило, речь идет о констатации уровня мембранного потенциала и частоты генерации потенциала действия – критериев, способных изменяться в достаточно широких пределах в ходе возрастных, функциональных, пластических перестроек поведенческой активности [4–6]. С одной стороны, такое положение существенно затрудняет сравнение данных по электрической активности нейронов, полученных разными исследовательскими группами, с другой – и сами причины различий электрофизиологических свойств нейронов остаются малопонятными.

В составе ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) имеется пара симметрично расположенных гигантских клеток правого и левого pedalных ганглиев [7; 8]: R.Pe.D.1 (дофаминергический) и L.Pe.D.1 (серотонинергический). Оба относятся к полифункциональным вставочным нейронам, интегрированным в структуру центральных генераторов дыхательного (R.Pe.D.1) и локомоторного (L.Pe.D.1) ритмов [9; 10], т. е. характеризуются и функциональными отличиями друг от друга. Таким образом, цель настоящей работы состоит в следующем: 1) выявить количественные характеристики показателей спонтанной электрической активности указанных нейронов (потенциал покоя, частота генерации потенциала действия, вольт-амперная характеристика (ВАХ), временные и амплитудные характеристики спайка); 2) проанализировать их возможную взаимосвязь с выполняемой клеткой функцией в составе соответствующей нейронной сети.

Материалы и методы исследований

Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в осенний период года. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 0,5 л воды) при температуре 20 ± 1 °C. Воду меняли каждые три дня. Пищей служили листья салата и одуванчика (питание *ad libitum*). Использовали животных, имеющих одинаковые размеры (длина раковины – от 4,0 до 4,5 см) и массу (от 5 до 6 г).

Электрофизиологические исследования. Эксперименты были выполнены на препаратах изолированной ЦНС. Нейроны R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 идентифицировали по размеру и расположению в пределах ЦНС. Для размягчения периневральной оболочки и облегченного проникновения микроэлектродов в нейроны препараты предварительно обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV) (*Sigma*, США) с концентрацией 1 мг/мл, приготовленным на нормальном физиологическом растворе для *Lymnaea stagnalis* в течение 5 мин при температуре 20 °С. Электрическую активность нейронов регистрировали после промывки обработанного препарата свежим физиологическим раствором в течение 30 мин. Для перфузии (0,1 мл/мин) препаратов ЦНС использовали нормальный физиологический раствор с концентрацией в миллимолях: NaCl – 44,0; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4,0; MgCl₂ · 6H₂O – 1,5; HEPES – 10,0; pH 7,5 ± 0,03. Одновременную внутриклеточную регистрацию электрических параметров нейронов осуществляли с помощью Ag/AgCl-электродов и микроэлектродного усилителя MC-01M («Линтех», Беларусь). Микропипетки заполняли раствором KCl в концентрации 2,5 моль/л (сопротивление микроэлектрода составляло 10–20 МОм). В качестве индифферентного электрода использовали хлорированную серебряную проволоку. Для каждого препарата (нейрона) временные и амплитудные характеристики спонтанных потенциалов действия (спайков) определяли для трех произвольно выбранных спайков из участка нейрограммы длительностью 30 с (шаг квантования – 0,5 мс). При помощи специальных возможностей программы электронного осциллографа InputWin [11] оценивали параметры потенциала действия: амплитуды спайка, следовой гиперполяризации и порога, длительности фаз де- и реполяризации, следовой гиперполяризации. Для построения кривой вольт-амперной характеристики мембраны, отражающей зависимость входного сопротивления клетки от мембранного потенциала, последовательно подавали импульсы гипер- и деполяризующего тока в диапазоне от –2 до +2 нА (с шагом 0,5 нА) длительностью 3 с, одновременно фиксируя значение мембранного потенциала нейрона. Полученные данные представляли в графической форме.

Статистика. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [12]. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро – Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей для обеих клеток использовали параметрические методы оценки (*t*-критерий Стьюдента для независимых пар). Если хотя бы для одного нейрона нормальность распределения показателей не была подтверждена, применяли непараметрические методы (*U*-критерий Манна – Уитни для двух независимых выборок). В первом случае (для значений потенциала покоя и частоты генерации потенциала действия) данные представлены в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$, во втором – медианы (25-й и 75-й процентиля). При сравнении кривых ВАХ использовали метод дисперсионного анализа для повторных измерений (repeated measures ANOVA). Число наблюдений (*n*) указано для каждого показателя и типа нейрона отдельно. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*P*), равном или меньшем 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенный анализ выявил статистически значимые различия между нейронами R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 по ключевым показателям спонтанной электрической активности: уровню потенциала покоя и частоте генерации потенциала действия (рис. 1, *a, б*; рис. 2, *a*). В частности, отмечена более высокая (около 10 мВ) степень поляризации мембраны R.Pe.D.1 на фоне 1,6-кратного снижения частоты его спонтанной импульсации в сравнении с L.Pe.D.1.

В отношении кривой ВАХ мембраны стоит отметить изменение ее формы – смещение вправо, в область отрицательных токов для нейрона R.Pe.D.1, по сравнению с L.Pe.D.1. В области положительных токов кривая ВАХ для R.Pe.D.1 сдвинута влево. Это свидетельствует о росте выраженности свойств аномального и задержанного выпрямлений у мембраны нейрона R.Pe.D.1, подразумевающих меньшее сопротивление как входящему (гиперполяризующему), так и выходящему (деполяризующему) току.

Статистически значимые различия отмечены и для показателей потенциала действия нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 (рис. 2, *б*), в частности временных характеристик спайка (рис. 3, *a–в*). Отмечено возрастание длительности всех фаз потенциала действия у L.Pe.D.1 по сравнению с таковыми для R.Pe.D.1. Наибольшие различия выявлены для фазы реполяризации (в 3,6 раза), а наименьшие – для фазы деполяризации (в 1,5 раза) и следовой гиперполяризации (в 1,2 раза). В отношении амплитудных характеристик спайка статистически достоверных различий между нейронами R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 обнаружено не было ни для одного из оцениваемых показателей (рис. 3, *г–е*).

Нейроны R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 можно отнести к клеткам пейсмекерного типа, поскольку они, как правило, сохраняют способность к генерации потенциалов действия в составе изолированной ЦНС, т. е. в отсутствие внешних (афферентных) входов. В случае пейсмекеров фаза потенциалзависимой

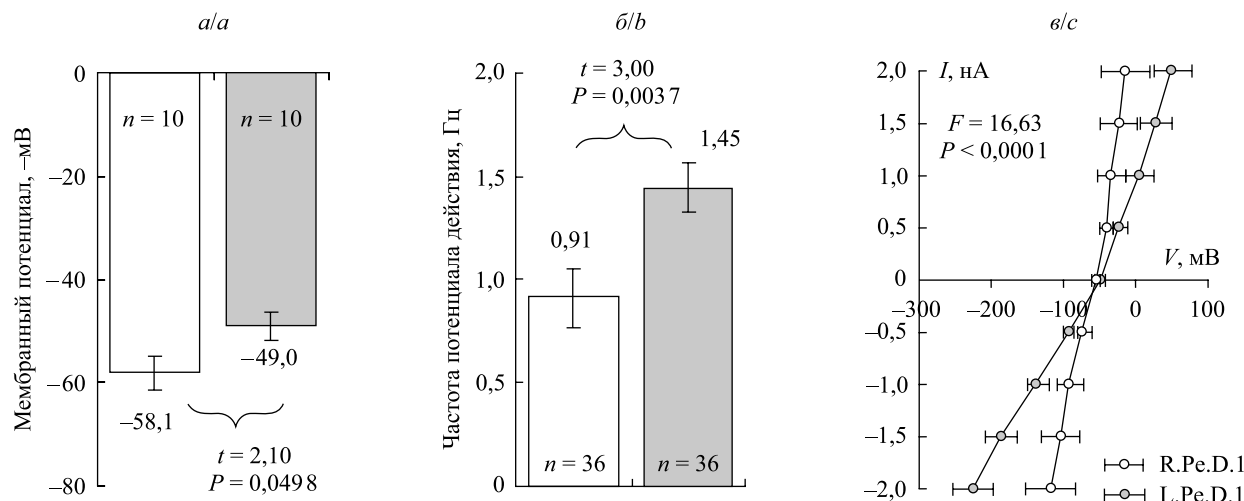


Рис. 1. Электрические характеристики мембраны нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1

ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis*: а – потенциал покоя; б – частота генерации потенциала действия; в – ВАХ. Представлены значения показателя (числа под столбиками (а) диаграммы и над ними (б)) и число наблюдений (n). Светлые столбцы диаграмм – нейрон R.Pe.D.1, серые – L.Pe.D.1. Число нейронов для анализа – 10 (для каждого типа). Указаны значение *t*-критерия Стьюдента, уровень значимости *P* (для а и б), значение *F*-критерия и *P* при дисперсионном анализе для повторных измерений (в)

Fig. 1. Electrical properties of membrane of the neurons R.Pe.D.1 and L.Pe.D.1 within CNS of mollusk *Lymnaea stagnalis*: а – rest potential; б – spiking frequency; в – voltage-current curve. Data (numbers above the columns) and the amount of observation (n) presented. Open columns – R.Pe.D.1, grey – L.Pe.D.1. Number of neurons studied – 10 (for each type). For parts а, б – Student's *t*-test and critical significance level (*P*) meanings presented. For part в – *F*-test and *P* meanings (repeated measures ANOVA) presented

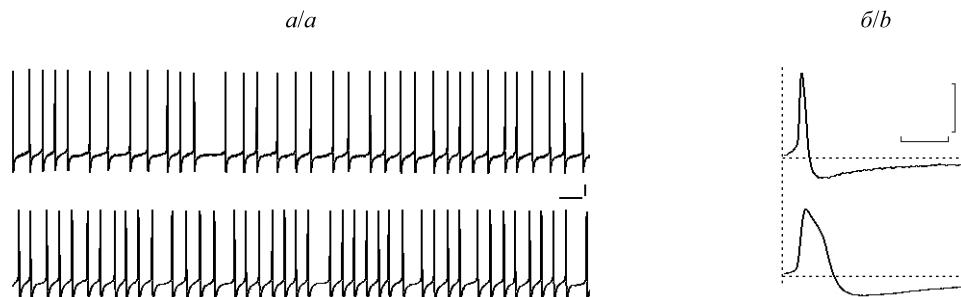


Рис. 2. Спонтанная электрическая активность (а) и форма спайка (б) нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1.

Калибровка: по времени – 1 с (а) и 50 мс (б), по амплитуде – 8 мВ (а) и 35 мВ (б). Верхняя нейронограмма в каждой части (а, б) рисунка – R.Pe.D.1, нижняя – L.Pe.D.1 (одновременная регистрация). Пунктирные линии (б) даны для наглядности изменений временных и амплитудных характеристик спайка

Fig. 2. Spontaneous electrical activity (а) and action potential shape (б) of the neurons R.Pe.D.1 and L.Pe.D.1. Calibration: time – 1 s (а) and 50 ms (б), amplitude 8 mV (а) and 35 mV (б).

Top trace in each part (а, б) of the figure – R.Pe.D.1, bottom trace – L.Pe.D.1 (simultaneous recording). Dashed lines (б) presented to show the differences in time-course and amplitude of the spike

деполяризации обеспечивается за счет открытия соответствующих ионных каналов [13]: натриевых, кальциевых, неселективных катионных рецепторных каналов. Развитие последующей реполяризации мембраны обеспечивается K^+ -каналами различных типов [14], в том числе Ca^{2+} -активируемым K^+ -каналом, открывающимся в ответ на поступление в клетку ионов кальция при деполяризации. В мембране R.Pe.D.1 насчитывается несколько типов калиевых каналов [15], а ее натриевая проницаемость определяется движением соответствующего иона по неселективным Na^+ -каналам утечки [16], используемым и для перемещения Ca^{2+} [17]. Сведения об ионных каналах мембраны L.Pe.D.1 не столь подробны, однако предполагается [3], что более пологий возврат потенциала к исходному значению в ходе реполяризации мембраны обусловлен дополнительной Ca^{2+} -проницаемостью. Поскольку амплитудные характеристики спайка в обоих исследованных нейронах не отличались друг от друга, можно предположить, что количество функционально активных ионных каналов в плазмалемме R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 находится примерно на одинаковом уровне. При этом отмеченные различия в длительности фаз спайка –

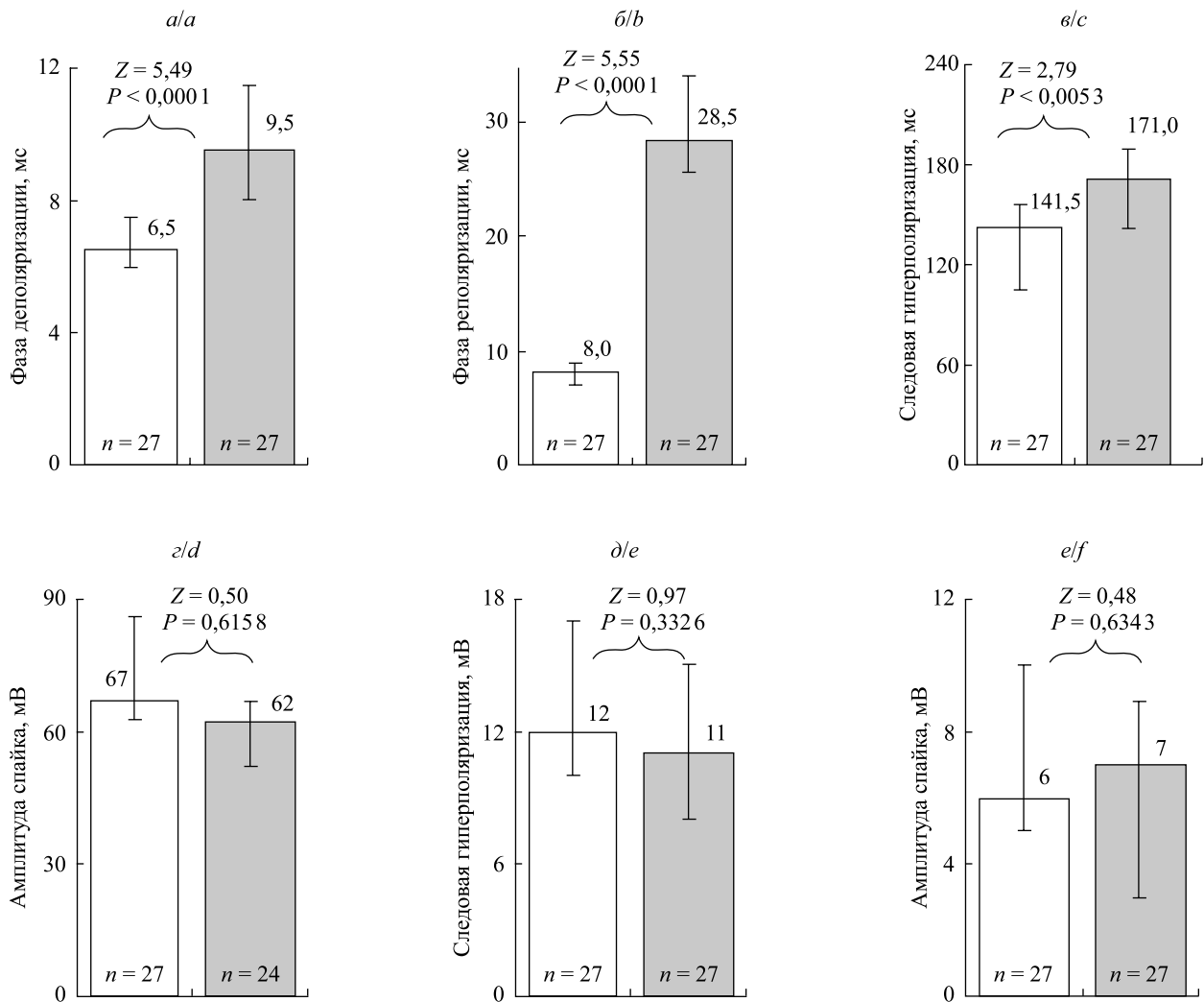


Рис. 3. Временные (а–в) и амплитудные (г–е) характеристики спайка нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1.

Представлены значения показателя (числа над столбцами диаграммы) и число наблюдений (*n*).

Светлые столбцы диаграмм – нейрон R.Pe.D.1, серые – L.Pe.D.1. Число нейронов для анализа – 10 (для каждого типа).

Указаны значение *Z* (*U*-критерий Манна – Уитни) и уровень значимости *P*.

Длительность фаз деполяризации (а), реполяризации (б) и следовой гиперполяризации (в) потенциала действия, амплитуда спайка (г), следовой гиперполяризации (д) и порога (е)

Fig. 3. Action potential time-course (a–c) and its amplitude characteristics (d–f) in the neurons R.Pe.D.1 and L.Pe.D.1.

Duration of depolarization (a), repolarization (b) and undershoot (c) phases of the spike,

amplitudes of action potential (d), undershoot (e) and threshold (f).

Data (numbers above the columns) and the amount of observation (*n*) presented. Open columns – R.Pe.D.1, grey – L.Pe.D.1.

Number of neurons studied – 10 (for each type). Presented *Z* (Mann – Whitney *U*-test) and critical significance level (*P*) meanings

следствие уменьшения (для R.Pe.D.1) или увеличения (для L.Pe.D.1) времени открытого состояния ионных каналов, обеспечивающих возникновение потенциала действия. Заметим, что пролонгированная деполяризация мембраны L.Pe.D.1, будучи следствием возрастания длительности потенциала действия, в области нервного окончания (синапса) способствует увеличению эффективности синаптической передачи [2] и особенно поддержанию тонических влияний на двигательные нейроны (А-кластер pedalных ганглиев) локомоторной сети [8].

Рассмотренные нейроны являются составными частями так называемых сетевых осцилляторов – синаптически взаимодействующих нейронов, обеспечивающих реализацию специфического нейронного паттерна [18]. Интеграция клеток в единую нейронную сеть во многом зависит от электрических характеристик их мембран. В случае аномального и задержанного выпрямлений, отмеченных для R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1, одинаковый по величине отрицательный или положительный ток, приложенный к мембране, вызовет большее по амплитуде смещение мембранного потенциала от исходного уровня. Такое «облегченное» развитие гипер- и деполяризации способствует реализации как торможения, так и возбуждения на мембране нейронов, в том числе и посредством синаптических входов. При этом

данный эффект будет сильнее выражен у R.Pe.D.1, что, возможно, объясняет его большую полифункциональность по сравнению с L.Pe.D.1, позволяя рассматривать данную клетку как один из ключевых элементов всей ЦНС *Lymnaea*, а не только его респираторной сети [7; 19]. При этом отличия в уровне потенциала покоя и частоте спонтанной импульсации рассматриваемых клеток являются отражением их различной функциональной специфичности. В случае R.Pe.D.1 речь идет о преимущественно фазовой активности, обеспечивающей *периодическую* реализацию легочного дыхания [9; 20], а для L.Pe.D.1 – тонической составляющей, обуславливающей в итоге почти *постоянное* биение ресничек подошвы ноги моллюска при его движении [10].

Заключение

Таким образом, особенности электрических характеристик мембраны могут обуславливать функциональную специфичность идентифицированных нейронов ЦНС *Lymnaea stagnalis*. Различия в ионной проводимости их плазматических мембран приводят к изменению исключительно временных характеристик спайка, определяющих характер синаптических влияний R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 на другие нейроны сети.

Библиографические ссылки

1. Arvanitaki A., Chalazonitis N. Configuration modales de l'activité, propres à différents neurones d'un même centre // J. Physiol. (P.). 1958. Vol. 50. P. 122–125.
2. Kandel E. R. Cellular Basis of Behaviour. San Francisco : WH Freeman and Company, 1976.
3. Benjamin P. R., Winlow W. The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurones in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis* (L.) // Comp. Biochem. Physiol. 1981. Vol. 70A. P. 293–307.
4. McComb C., Meems R., Syed N., et al. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea* // J. Neurophysiol. 2003. Vol. 90. P. 983–992.
5. Sidorov A. V. Effect of acute temperature change on lung respiration of the mollusk *Lymnaea stagnalis* // J. Therm. Biol. 2005. Vol. 30, № 2. P. 163–171.
6. Spencer G. E., Kazmi M. H., Syed N. I., et al. Changes in the activity of a CPG neuron after the reinforcement of an operantly conditioned behavior in *Lymnaea* // J. Neurophysiol. 2002. Vol. 88. P. 1915–1923.
7. Winlow W., Haydon P. G., Benjamin P. R. Multiple postsynaptic actions of the giant dopamine-containing neuron R.Pe.D.1 of *Lymnaea stagnalis* // J. Exp. Biol. 1981. Vol. 94. P. 137–148.
8. Winlow W., Haydon P. G. A behavioral and neuronal analysis of the locomotory system of *Lymnaea stagnalis* // Comp. Biochem. Physiol. 1986. Vol. 83A. P. 13–21.
9. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. In vitro reconstruction of the respiratory central pattern generator of the Mollusk *Lymnaea* // Science. 1990. Vol. 250. P. 282–285.
10. Цыганов В. В. Координация активности моноаминергических педальных нейронов у пресноводных улиток // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2000. Т. 86. С. 369–378.
11. Солтанов В. В., Бурко В. Е. Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных // Новости мед.-биол. наук. 2005. № 1. С. 91–95.
12. Glantz S. Primer of Biostatistics. New York : McGraw-Hill, Inc., 1994.
13. Harris-Warrick R. M. Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems // Curr. Opin. Neurobiol. 2002. Vol. 12. P. 646–651.
14. Grillner S., Wallen P., Hill R., et al. Ion channels of importance for the locomotor pattern generation in the lamprey brainstem-spinal cord // J. Physiol. 2001. Vol. 533. P. 23–30.
15. Sakakibara M., Okuda F., Nomura K., et al. Potassium currents in isolated statocyst neurons and RPeD1 in the pond snail, *Lymnaea stagnalis* // J. Neurophysiol. 2005. Vol. 94. P. 3884–3892.
16. Lu T. Z., Kostecki W., Sun C. L. F., et al. High sensitivity of spontaneous spike frequency to sodium leak current in a *Lymnaea* pacemaker neuron // Eur. J. Neurosci. 2016. Vol. 44. P. 3011–3022.
17. Senatore A., Monteil A., van Minnen J., et al. NALCN ion channels have alternative selectivity filters resembling calcium channels or sodium channels // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e55088.
18. Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion // Neuron. 2006. Vol. 52. P. 751–766.
19. Сидоров А. В. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск : БГУ, 2011.
20. Syed N. I., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. Neural elements of the central pattern generator (CPG) // J. Comp. Physiol. 1991. Vol. 169A. P. 557–568.

References

1. Arvanitaki A., Chalazonitis N. Configuration modales de l'activité, propres à différents neurones d'un même centre. *J. Physiol. (P.)*. 1958. Vol. 50. P. 122–125 (in Fr.).
2. Kandel E. R. Cellular Basis of Behaviour. San Francisco : WH Freeman and Company, 1976.
3. Benjamin P. R., Winlow W. The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurones in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 1981. Vol. 70A. P. 293–307.

4. McComb C., Meems R., Syed N., et al. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 2003. Vol. 90. P. 983–992.
5. Sidorov A. V. Effect of acute temperature change on lung respiration of the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *J. Therm. Biol.* 2005. Vol. 30, No. 2. P. 163–171.
6. Spencer G. E., Kazmi M. H., Syed N. I., et al. Changes in the activity of a CPG neuron after the reinforcement of an operantly conditioned behavior in *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 2002. Vol. 88. P. 1915–1923.
7. Winlow W., Haydon P. G., Benjamin P. R. Multiple postsynaptic actions of the giant dopamine-containing neuron R.Pe.D.1 of *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 1981. Vol. 94. P. 137–148.
8. Winlow W., Haydon P. G. A behavioral and neuronal analysis of the locomotory system of *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. Vol. 83A. P. 13–21.
9. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the Mollusk *Lymnaea*. *Science*. 1990. Vol. 250. P. 282–285.
10. Tsyganov V. V. Coordination of the activity of monoaminergic pedal neurons in fresh water snails. *Ross. Fiziol. Zh. im I. M. Sechenova*. 2000. Vol. 86. P. 369–378 (in Russ.).
11. Soltanov V. V., Burko V. E. Computer programs for electrophysiological data-processing. *News of Biomed. Sci.* 2005. No. 1. P. 91–95 (in Russ.).
12. Glantz S. Primer of Biostatistics. New York : McGraw-Hill, Inc., 1994.
13. Harris-Warrick R. M. Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002. Vol. 12. P. 646–651.
14. Grillner S., Wallen P., Hill R., et al. Ion channels of importance for the locomotor pattern generation in the lamprey brainstem-spinal cord. *J. Physiol.* 2001. Vol. 533. P. 23–30.
15. Sakakibara M., Okuda F., Nomura K., et al. Potassium currents in isolated statocyst neurons and RPeD1 in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 2005. Vol. 94. P. 3884–3892.
16. Lu T. Z., Kostelecki W., Sun C. L. F., et al. High sensitivity of spontaneous spike frequency to sodium leak current in a *Lymnaea* pacemaker neuron. *Eur. J. Neurosci.* 2016. Vol. 44. P. 3011–3022.
17. Senatore A., Monteil A., van Minnen J., et al. NALCN ion channels have alternative selectivity filters resembling calcium channels or sodium channels. *PLoS One*. 2013. Vol. 8. P. e55088.
18. Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron*. 2006. Vol. 52. P. 751–766.
19. Sidorov A. V. Nerve centers functional activity in invertebrates. Minsk : BSU, 2011 (in Russ.).
20. Syed N. I., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. Neural elements of the central pattern generator (CPG). *J. Comp. Physiol.* 1991. Vol. 169A. P. 557–568.

Статья поступила в редколлегию 31.08.2017.
Received by editorial board 31.08.2017.

УДК 577.118

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАЗЕИНАТА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДЕФИЦИТА ЖЕЛЕЗА И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНОЙ АНЕМИИ У КРЫС

А. И. КОХАНОВСКИЙ¹⁾, Н. М. ОРЁЛ²⁾, Е. Ю. КОХАНОВСКАЯ³⁾

¹⁾УО «Белорусский государственный экономический университет»,
пр. Партизанский, 26, 220070, г. Минск, Беларусь

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

³⁾Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь

Исследована эффективность применения казеината железа при моделировании железодефицитной анемии у крыс. Установлено, что после приема казеината железа с массовой долей элементарного железа 3,65 % уровень сывороточного железа достоверно увеличивался в течение 4 ч. После однократного внутрижелудочного введения казеината железа в дозе 2 г/кг крысам с экспериментальной алиментарной анемией у них статистически значимо увеличился гематокрит и возросло количество эритроцитов и гемоглобина.

Ключевые слова: железо; железодефицитная анемия; железопротеиновые соединения; казеин; казеинат железа.

THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF IRON CASEINATE FOR CORRECTING IRON DEFICIENCY AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS UNDER THE EXPERIMENTAL MODEL OF ALIMENTARY ANEMIA IN RATS

A. I. KAKHANOUSKI^a, N. M. AROL^b, K. Y. KAKHANOUSKAYA^c

^aBelarusian State Economic University, 26 Partyzanski Avenue, Minsk 220070, Belarus

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

^cBelarusian State Medical University, 83 Dzjarzhinski Avenue, Minsk 220116, Belarus

Corresponding author: K. Y. Kakhanouskaya (e.kohanovskaya@gmail.com)

Objective of given research was to study the possibility using of iron caseinate as a feed additive for the prevention of iron deficiency anemia. In experiments on rats, it was established that after the intake of iron caseinate with a mass

Образец цитирования:

Кохановский А. И., Орёл Н. М., Кохановская Е. Ю. Эффективность использования казеината железа для коррекции дефицита железа и гематологических показателей в условиях экспериментальной модели алиментарной анемии у крыс // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 10–13.

For citation:

Kakhanouski A. I., Arol N. M., Kakhanouskaya K. Y. The effectiveness of the use of iron caseinate for correcting iron deficiency and hematological parameters under the experimental model of alimentary anemia in rats. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 10–13 (in Russ.).

Авторы:

Александр Иванович Кохановский – преподаватель факультета довузовской подготовки.

Наталья Михайловна Орёл – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Екатерина Юрьевна Кохановская – ассистент кафедры общей химии факультета довузовской подготовки и профориентации.

Authors:

Aliaksandr I. Kakhanouski, lecturer at the faculty of pre-university training.

a.kakhanouski@yandex.by

Nataliya M. Arol, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

oryoln47@tut.by

Katsiaryna Y. Kakhanouskaya, assistant at the general chemistry department, faculty of pre-university training and vocational guidance.

e.kohanovskaya@gmail.com

fraction of elemental iron of 3.65 %, the serum iron level increased significantly within 4 hours. In the model of iron deficiency anemia, after a single intake of iron caseinate at a dose of 2 g/kg, the number of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit increased.

Key words: iron; iron deficiency anemia; iron-protein compounds; casein; caseinate of iron.

Введение

Несмотря на широкую распространенность железа в природе, многие организмы испытывают недостаток этого элемента. Особенно это актуально для молодняка сельскохозяйственных животных.

Железодефицитная анемия у поросят в настоящее время является одной из важнейших проблем в свиноводстве. В качестве профилактики развития железодефицитной анемии у поросят в рацион подсосных свиноматок вводят добавки на основе солей железа. Эффективность таких препаратов достаточно высокая, но они способны вызывать серьезные побочные явления, что может приводить к развитию патологических процессов и даже к гибели животных [1]. В связи с этим вопрос разработки дешевых и безопасных биодобавок и препаратов железа для сельскохозяйственных животных остается актуальным.

В кормах естественного происхождения железо находится в виде комплексных соединений с белками, поэтому можно предположить, что именно такие его формы будут и достаточно безвредны, и терапевтически эквивалентны при железодефиците. Железопротеиновые соединения не получили распространения в сельском хозяйстве, тем не менее отсутствие побочных эффектов делает их весьма перспективными для применения в животноводстве в качестве биодобавки к корму.

При производстве молока часто по различным причинам имеет место выбраковка сырья, которое направляется на производство технического казеина. Поэтому получение казеината железа и применение его в качестве железопротеиновой кормовой добавки могли бы способствовать профилактике алиментарной анемии у поросят.

Цель настоящей работы – изучение эффективности применения казеината железа при моделировании железодефицитной анемии у крыс.

Материалы и методы исследований

Казеин молока получен кислотным способом [2]. В раствор ренатурированного казеина добавляли насыщенный раствор сульфата железа(II) до выпадения казеината железа в осадок, который отделяли центрифугированием [3]. Массовую долю элементного железа в казеинате железа определяли методом Сендела в модификации С. Г. Кузнецова [4, с. 218].

В экспериментах в качестве лабораторных животных использовали аутбредных белых крыс в возрасте 2 месяцев массой 190 ± 10 г. Для изучения биодоступности железа из казеината железа лабораторные животные были распределены на 11 групп (по 6 особей в каждой) так, чтобы разброс по массе внутри группы не превышал 10 %, а между группами – 2 %.

После голодной диеты в течение 12 ч животным групп № 2–11 посредством зонда внутрижелудочно вводили суспензию казеината железа в дозе 2 г/кг массы тела. Животным группы № 1 вводили суспензию казеина.

После предварительного интрацеребрального наркоза тиопенталом натрия в дозе 12,5 мг/кг у всех животных групп № 2–10 из правого предсердия проводили забор проб крови с интервалом 30 мин, у группы № 11 – через 12 ч после приема препарата.

Уровень железа в сыворотке крови определяли по цветной реакции с сульфонированным β -фенантролином [4].

Для оценки фармакологической эффективности действия казеината железа на лабораторных животных была получена модель анемии [5]. Для этого подопытные животные в течение 8 месяцев содержались на рационе, в котором отсутствовало железо. По истечении этого срока была проведена верификация модели анемии путем определения гематологических показателей: RBC, $10^{12}/л$; HGB, г/л; Hct, %, – при помощи гематологического анализатора Medonic (Швеция).

Далее, животным с моделью анемии перорально ввели казеинат железа в дозе 2 г/кг. Контрольным животным вместо казеината железа вводили суспензию казеина.

После однократного перорального введения по истечении 14 сут у всех животных с моделью анемии определяли уровень эритроцитов, концентрацию гемоглобина и гематокрит.

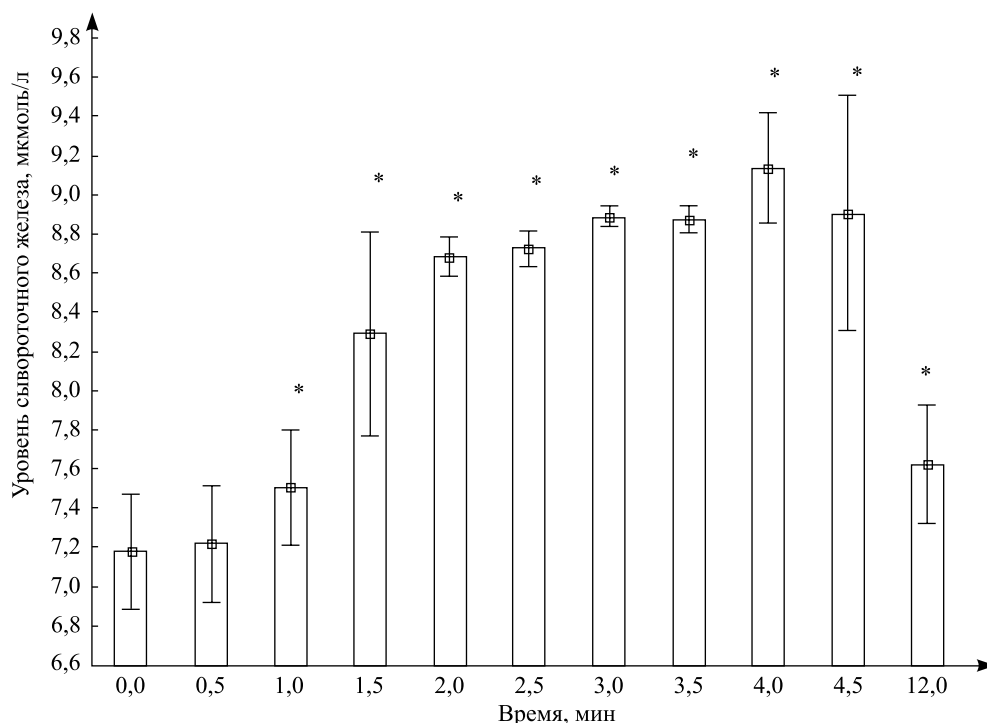
Результаты экспериментов обрабатывали с использованием пакета прикладных программ *Statistica 7.0 for Windows* [6]. Статистическую значимость изменений исследуемых параметров устанавливали при уровне значимости $p \leq 0,05$. Полученные данные представлены на рисунке в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты исследований и их обсуждение

После получения казеината железа определяли содержащуюся в нем массовую долю элементного железа, которая составила 3,65 %.

Для изучения усвояемости животными железа из казеината железа после его перорального введения исследовали количество сывороточного железа в течение 12 ч с интервалом 30 мин.

Из данных, представленных на рисунке, видно, что количество сывороточного железа у животных до введения препарата в среднем составило 7,2 мкмоль/л. Через 30 мин после его перорального введения уровень сывороточного железа не повысился, поскольку, возможно, казеин еще не переварился и железо, связанное с казеином, не начало поступать в кровь. Уровень железа в сыворотке начал расти через 1 ч после введения казеината железа (7,8 мкмоль/л) и через 4 ч достиг 129,6 % по отношению к контролю. По истечении 4,5 ч концентрация железа в сыворотке крови начала постепенно снижаться и через 12 ч достоверно не превышала значений, установленных до введения препарата.



Изменение количества сывороточного железа у подопытных животных через 12 ч после перорального введения казеината железа в дозе 2 г/кг массы тела. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия от контроля (группа № 1) по результатам теста Фридмана ($p = 0,003$, $n = 6$)

Change in the amount of serum iron in experimental animals within 12 hours after oral administration of iron caseinate at a dose of 2 g/kg of body weight. Star marked statistically significant differences from the control (group No. 1) according to the results of the Friedman test ($p = 0,003$, $n = 6$)

Таким образом, у подопытных животных пероральное введение обогащенного железом казеина вызвало статистически значимое повышение сывороточного железа, что указывает на усвояемость железа из казеината железа.

На модели железодефицитной анемии у крыс изучали фармакологическую эффективность применения казеината железа путем определения ряда гематологических показателей (таблица).

Гематологические показатели животных с моделью железодефицитной анемии через 14 сут после введения казеината железа ($n = 6$)

Hematological parameters of animals with a model of iron deficiency anemia ($n = 6$)

Гематологические показатели	Животные без применения казеината железа	Животные после применения казеината железа
RBC, $10^{12}/л$	$3,51 \pm 0,55$	$7,92 \pm 0,37^{0,0340}$
HGB, г/л	$94,75 \pm 6,56$	$135 \pm 5,31^{0,0002}$
Hct, %	$30,76 \pm 1,83$	$41,67 \pm 1,79^{0,0191}$

Примечание. Верхний индекс – статистически значимые различия (p) по сравнению с контролем по результатам теста Манна – Уитни.

Из результатов, представленных в таблице, видно, что у животных после введения казеината железа в дозе 2 г/кг по истечении 14 сут наблюдается статистически значимое увеличение в крови количества эритроцитов (в 2,26 раза), гемоглобина (в 1,43 раза), гематокрита (в 1,36 раза), что может быть следствием устранения дефицита железа в организме.

Сравнение полученных результатов с имеющимися в литературе данными, характеризующими применяемый в медицине противоанемический протектор гидроксид-полимальтозный комплекс железа (препарат «Мальтофер») [7], показывает, что казеинат железа по фармакокинетическим и фармакодинамическим параметрам не уступает этому препарату. При введении казеината железа уровень железа в сыворотке крови у подопытных животных увеличивается постепенно и не достигает высоких концентраций, которые наблюдаются при инъекции препаратов солей железа. Это важно, так как ионизированное железо в высоких концентрациях обладает токсическим действием. Количества железа, усвоенного из казеината железа, достаточно для устранения дефицита железа в организме, что способствует нормализации эритропоэза.

Заключение

Для проведения исследований был получен казеинат железа с массовой долей элементного железа 3,65 %. В экспериментах на лабораторных животных установлено, что связанное с казеином железо усваивается в пищеварительном тракте, о чем свидетельствует нарастание его концентрации в сыворотке крови в течение 4 ч. Повышение уровня гематологических показателей у крыс в модели железодефицитной анемии после введения казеината железа говорит о его фармакологической эффективности.

Библиографические ссылки

1. Николадзе М. Г., Карпутъ И. М. Полисахаридно-белковый препарат в профилактике иммунного дефицита у поросят при алиментарной анемии // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. 2000. № 4. С. 64–69.
2. Симоненко С. В., Димитриева С. Е., Агаркова Е. Ю. и др. Исследование сохранности белкового компонента козьего молока под воздействием ультрафиолетового излучения // Тр. Белорус. гос. ун-та : науч. журн. [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://elibrary.by/handle/123456789/16276> (дата обращения: 20.09.2017).
3. Осинцева М. А., Брагинский В. И., Осинцев А. М. Исследование возможности обогащения магнием молочных белков во время их коагуляции // Техника и технология пищевых производств. 2012. № 4. С. 1–6.
4. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики : справочник / под ред. И. П. Кондрахина. М. : КолосС, 2004.
5. Красникова И. М. Моделирование и экспериментальная терапия железодефицитной анемии у крыс // Сиб. мед. журн. (Иркутск). 2002. № 2. С. 26–27.
6. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М. : Медиа Сфера, 2002.
7. Мальтофер. Препарат следующего поколения: фармакокинетика [Электронный ресурс]. 2011. URL: <https://medi.ru/info/3878> (дата обращения: 20.09.2017).

References

1. Nikoladze M. G., Carput' I. M. Polysaccharide-protein preparation in the prevention of immune deficiency in piglets with alimentary anemia. *Proc. Natl. acad. of sci. of Belarus. Agrar. sci. ser.* 2000. No. 4. P. 64–69 (in Russ.).
2. Simonenko S. V., Dimitrieva S. E., Agarkova E. Yu., et al. Investigation of the safety of the protein component of goat's milk under the influence of ultraviolet radiation. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta : nauchn. zh.* 2009. URL: <http://elibrary.by/handle/123456789/16276> (date of access: 20.09.2017) (in Russ.).
3. Osintseva M. A., Braginsky V. I., Osintsev A. M. Investigation of the possibility of magnesium enrichment of milk proteins during their coagulation. *Food processing: techniques and technology.* 2012. No. 4. P. 1–6 (in Russ.).
4. Kondrakhin I. P. (ed.). *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics : handbook.* Moscow : KolosS, 2004 (in Russ.).
5. Krasnikova I. M. Modeling and experimental therapy of iron deficiency anemia in rats. *Sib. Med. J. (Irkutsk).* 2002. No. 2. P. 26–27 (in Russ.).
6. Rebrova O. Yu. *Statistical analysis of medical data. Using of the application package Statistica.* Moscow : Media Sfera, 2002 (in Russ.).
7. Maltofer. The drug of the next generation: pharmacokinetics. 2011. URL: <https://medi.ru/info/3878> (date of access: 20.09.2017) (in Russ.).

Статья поступила в редакцию 04.07.2017.
Received by editorial board 04.07.2017.

УДК 579.841.11579.236

АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНАЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AURANTIACA* В ОТНОШЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ И МАЛИГНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Е. Г. ВЕРЕМЕЕНКО¹⁾, Е. В. ЛЕОНЧИК¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

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

Выделены и проанализированы водорастворимые и жирорастворимые фракции феназиновых антибиотиков из штамма *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162 и полученных на его основе штаммов-продуцентов, способных к сверхпродукции феназинов. Анализ цитотоксической и цитостатической активностей выделенных водорастворимых феназиновых комплексов показывает, что малигнизированные клетки проявляют к данным соединениям гораздо большую чувствительность по сравнению с нормальными клетками. В подтверждение этого был проведен микроскопический анализ образцов культур малигнизированных и нормальных клеток, подвергшихся обработке различными фракциями феназиновых антибиотиков, выделенных из исследуемых штаммов. Он показал, что на вторые сутки культивирования в культурах малигнизированных линий появляется большое количество клеток (от 7 до 96 %), погибающих путем апоптоза, реже – некроза, тогда как в культуре фибробластов такого массового цитотоксического эффекта обнаружено не было. Цитотоксичность жирорастворимых фракций крайне высока для всех исследованных культур клеток, что может быть связано с присутствием диметилсульфоксида (ДМСО) и его способностью усиливать цитотоксические свойства феназинов.

Ключевые слова: твердофазная экстракция; феназины; фибробласты мыши; цитотоксическая активность; HeLa; MCF-7; *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162.

ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE PHENAZINE COMPLEX OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AURANTIACA* IN RELATION TO NORMAL AND MALIGNANT CELL LINES

E. G. VEREMEENKO^a, K. V. LIIVONCHYK^a, N. P. MAXIMOVA^a

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

Corresponding author: E. G. Veremeenko (veremeenkokatya@yandex.ru)

In the course of the experiment, water-soluble and fat-soluble fractions of phenazine antibiotics from the *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162 and derived on its basis producer strains capable of overproducing phenazines were obtained and analyzed. Analysis of the cytotoxic and cytostatic activity of isolated water-soluble phenazine complexes

Образец цитирования:

Веремеенко Е. Г., Леончик Е. В., Максимова Н. П. Анализ биологической активности феназинового комплекса бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* в отношении нормальных и малигнизированных клеточных линий // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 14–20.

For citation:

Veremeenko E. G., Liavonchik K. V., Maximova N. P. Analysis of the biological activity of the phenazine complex of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* in relation to normal and malignant cell lines. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 14–20 (in Russ.).

Авторы:

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

Екатерина Владимировна Леончик – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – Е. Г. Веремеенко.

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

Authors:

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

veremeenkokatya@yandex.ru

Katerina V. Liavonchik, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

katerinaleoao@gmail.com

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

nataliamaximova@yahoo.com

shows that malignant cells show much greater sensitivity to these compounds, compared to normal cells. In support of this, a microscopic analysis of samples of cultures of malignant and normal cells, subjected to treatment with various fractions of phenazine antibiotics isolated from the strains studied, was carried out. He showed that on the second day of cultivation in cultures of malignant lines, a large number of cells (from 7 to 96 %) died by apoptosis, less often necrosis, whereas in a culture of fibroblasts such a massive cytotoxic effect was not found. The cytotoxicity of liposoluble fractions is extremely high for all cell cultures studied, which may be due to the presence of DMSO and its ability to enhance the cytotoxic properties of phenazines.

Key words: solid-phase extraction; phenazine; mouse fibroblasts; cytotoxic activity; HeLa; MCF-7; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162.

В настоящее время серьезной проблемой в медицине стало появление большого количества патогенных для человека штаммов бактерий и грибов, а также типов опухолей, проявляющих множественную резистентность к используемым в медицинской практике препаратам. Это существенно осложняет лечение целого ряда заболеваний, которые еще десятилетие назад не рассматривались как трудно поддающиеся терапии. В связи с этим актуальным становится поиск новых, высокоактивных соединений, позволяющих преодолеть множественную резистентность к ряду медицинских препаратов и решить вышеназванные проблемы. Наибольшее предпочтение в решении этой задачи сегодня отдается ароматическим гетероциклическим соединениям. Установлено, что химическая структура такого типа характерна для большинства биологически активных молекул, регулирующих процессы в организмах высших эукариот. Кроме того, именно ароматические гетероциклы являются одними из наиболее токсических веществ в отношении целого ряда прокариотических и эукариотических микроорганизмов.

К ароматическим гетероциклам, синтезируемым бактериями, относятся и феназиновые антибиотики. В настоящее время известно около 6 тыс. соединений этого класса, обладающих огромным разнообразием биологического действия, что позволяет использовать данные вещества в терапии различных заболеваний, например кандидозов, малярии и др. [1].

Существенным преимуществом феназиновых соединений является то, что благодаря наличию разнообразных заместителей, связанных с ароматическим ядром, некоторые из них имеют чрезвычайно широкий спектр активностей, которые не ограничиваются только антимикробным действием, но проявляют также нейропротекторные и антиоксидантные свойства. Производные феназинов уже довольно давно активно используются в медицинской практике как противорвотные средства и нейролептики, а также в ветеринарии в качестве глистогонных препаратов [2]. В настоящее время активно ведутся работы по изучению свойств природных производных феназиновых антибиотиков, относящихся к классу так называемых сложных феназинов, у которых заместители имеют разветвленную структуру [3]. Уже известно, что феназиномицин и лавандоцианин, выделенные из штаммов *Streptomyces* sp. CL190 и *Streptomyces* sp. CL9659, проявляют высокую активность *in vivo* в отношении опухолей у грызунов, а также ярко выраженную цитотоксичность к андромицинустойчивой лейкозной клеточной линии P388 мышей [4]. У *P. aeruginosa* HRW.1-S3 обнаружены два феназиновых соединения – PDC и PCA, обладающие цитотоксической активностью в отношении клеточных линий HeLa (рак шейки матки), MCF-7 (рак груди), DU145 (рак простаты), HT29 (рак толстого кишечника) [5].

Цель настоящей работы – анализ цитотоксической и цитостатической активностей выделенных феназиновых комплексов в отношении нормальных и малигнизированных клеток.

Материалы и методика исследований

В работе использовали штамм *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 из коллекции кафедры генетики БГУ (коллекционный номер – ВКМВ-162), полученные на его основе штаммы-продуценты, способные к сверхпродукции феназинов B-162/255, B-162/55, B-162/17, B-162/255/15, B-162/2, B-162/18, клетки линии HeLa (перевиваемая линия карциномы шейки матки) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), а также фибробласты мыши (в качестве контроля).

Культивирование бактерий осуществляли в стандартных питательных средах: в питательной среде для продукции антибиотиков (ПСА), предложенной в [6], питательном бульоне (ПБ), приготовленном на основе сухого концентрата, производства ФГУП «НПО «Микроген»» (Махачкала).

Клетки культивировали во влажной атмосфере (5 % CO₂, 37 °C) в CO₂-инкубаторе (*Shellab*, США), используя для двух культур опухолей среду DMEM с глутамином, феноловым красным, с содержанием глюкозы 4,5 г/л (НПП «ПанЭко», Россия). Среда культивирования содержала 10 % эмбриональной

сыворотки теленка и антибиотик «Гентамицин» в концентрации 10 мкг/мл. Пересадку линий проводили через каждые два дня на вентилируемые матрасики объемом 25 мл (*Corning*, США). Пересадку культур осуществляли при достижении высокой плотности клеток на 1 мл раствора (более 10⁶ клеток/мл) через каждые 2 дня с разведением культуры до плотности 5 · 10⁵ клеток/мл. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Пересадку клеточных культур выполняли в ламинар-боксе в стерильных условиях [7].

Твердофазная экстракция феназиновых комплексов из культуральной жидкости проводилась на колонках фирмы *Agilent SampliQ C18* (США), наполненных фенилсиликагелем (*Agilent*, США). Клетки переносились в пробирки для центрифугирования с добавлением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в конечной концентрации 10 %. Далее, при 14 000 об/мин в течение 15 мин проводили центрифугирование. В это время дважды промывали колонки 5 мл 60 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислотой, затем дважды – 5 мл высокоочищенной деионизированной воды (MQ) и раствором 10 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислотой. Обязательным условием было не допустить просыхания колонки. После центрифугирования супернатант собирался в новые пробирки и переносился на ранее кондиционированную колонку для твердофазной экстракции (ТФЭ) с фенилсиликагелем. Далее, феназины элюировались с ТФЭ-колонки раствором 60 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислотой [8].

Для выделения жирорастворимых феназиновых антибиотиков из культуральной жидкости пользовались методикой, описанной в [6].

Спектрофотометрический анализ проводили с использованием спектрофотометра *NanoDrop Thermo Scientific 2000* (США). В качестве растворителя использовали 100 % метанол, а также раствор 60 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислоты. Водорастворимые феназины перерастворяли в стерильном физиологическом растворе, а жирорастворимые – в ДМСО.

Цитотоксический эффект феназиновых комплексов определяли *in vitro* с помощью МТТ-метода (теста) [9; 10]. Оптическая плотность регистрировалась на планшетном ридере *Multiscan Ascent (ThermoLabsystems*, Финляндия), измерения выполнялись при длине волны 570 нм, затем вычиталось измеренное фоновое поглощение при 650 нм.

Расчет препаратиндуцированной гибели клеток выполнялся по [11, формула].

Концентрация препарата, которая вызывает гибель 50 % клеток (LC₅₀), может быть рассчитана графически по дозозависимой кривой. Для вычисления LC₅₀ применяют также специальную компьютерную программу, составленную в *Excel*.

Микроскопический анализ проводили с использованием микроскопа *Zeiss Axiovert 25* (Германия).

Результаты исследований и их обсуждение

Известно, что феназиновые антибиотики обладают способностью генерировать активные формы кислорода, которые, будучи чрезвычайно реакционно-способными, представляют серьезную угрозу для клетки [12]. Влияние активных форм кислорода наиболее выражено в отношении клеток, проявляющих высокую метаболическую активность и отличающихся интенсивной пролиферацией. Обе эти характеристики присущи большинству малигнизированных клеток. В связи с этим феназиновые антибиотики являются перспективными соединениями для разработки на их основе противораковых препаратов. Однако создание таких препаратов требует детального анализа влияния феназинов на нормальные клетки организма. По нашим данным, в настоящее время результаты подобных экспериментов в специализированной литературе опубликованы не были. Благодаря разнообразию заместителей, связанных с гетероциклическим ароматическим кольцом феназинов, различные типы этих соединений могут проявлять самые различные свойства. В задачу наших исследований входил поиск таких феназиновых комплексов, которые ввиду различий в их химическом составе обладали бы максимальным цитотоксическим действием в отношении малигнизированных линий, но как можно меньше влияли на нормальные клетки.

В исследованиях проводился анализ антираковой активности 12 фракций из 7 штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*, для которых ранее были продемонстрированы выраженные отличия в антимикробной активности [13]. В качестве линий малигнизированных клеток были взяты коллекционные культуры MCF-7, HeLa. Моделью нормальных клеток служили мышинные фибробласты. Полученные результаты исследований проиллюстрированы в табл. 1–3.

Показано, что в культуральной жидкости бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* присутствуют как водорастворимые, так и жирорастворимые фракции феназиновых антибиотиков, а это дополнительно указывает на их различный химический состав и наличие в суммарном феназиновом комплексе нескольких типов антибиотиков данной группы. Микроскопический анализ образцов культур малиг-

низированных и нормальных клеток, подвергшихся обработке различными фракциями феназиновых антибиотиков, выделенных из исследуемых штаммов, показал, что на вторые сутки культивирования в культурах малигнизированных линий появляется большое количество клеток (от 7 до 96 %), погибающих путем апоптоза (реже – некроза), тогда как в культуре фибробластов такого массового цитотоксического эффекта обнаружено не было. Вместе с тем цитотоксичность жирорастворимых фракций была крайне высока и одинакова для всех исследованных культур клеток, что может быть связано с присутствием ДМСО, используемого в качестве растворителя (см. табл. 1–3). Вероятнее всего, данное соединение обладает способностью усиливать цитотоксические свойства феназинов. Кроме того, имеются литературные свидетельства о том, что ДМСО может являться токсичным для клеток и сам по себе.

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет говорить о том, что и некоторые водорастворимые фракции проявляют выраженное цитотоксическое действие (в частности, фракции 2–4 у всех исследованных штаммов) в отношении и малигнизированных, и нормальных клеток, причем как в высоких, так и в низких концентрациях, и, следовательно, не могут быть рассмотрены в качестве основы для создания медицинских препаратов ввиду их высокой токсичности. Однако в ходе наших исследований также были обнаружены фракции из различных штаммов (например, штамм В-162/17, фракции 4, 5, 7), проявляющие цитотоксичность в отношении культур клеток MCF-7 и HeLa, но не приводящие к гибели мышинных фибробластов (контроль). Примечательно, что на культуру клеток HeLa могут оказывать цитотоксическое действие и фракции, в которых концентрация феназиновых антибиотиков относительно низка. Таким примером являются фракции 5–7 штамма В-162 (см. табл. 2). Стоит отметить, что культура клеток линии HeLa оказалась наиболее чувствительной к феназиновым комплексам из проанализированных нами культур – ее рост полностью подавляется феназиновыми комплексами, выделенными из штамма В-162/17, культивируемого на среде М9.

Таблица 1

Влияние феназиновых фракций штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*
на клеточную линию MCF-7

Table 1

Effect of phenazine fractions of *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* on the MCF-7 cell line

Номер фракции	Штамм													
	В-162/255		В-162/55		В-162		В-162/18		В-162/17		В-162/17 (на среде М9)		В-162/15	
	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г
1	–	–	27,71	57,87	19,72	63,91	53,14	64,36	38,06	91,97	12,68	48,07	52,31	95,14
2	48,98	96,56	56,69	95,89	43,56	96,55	68,31	85,87	53,24	96,97	5,26	62,14	13,14	90,28
3	38,08	91,12	23,91	94,52	40,13	94,45	63,45	59,37	53,21	87,71	17,26	43,91	41,75	96,81
4	23,16	97,45	0,89	63,04	37,47	84,64	20,67	51,37	38,49	90,15	15,38	53,3	33,31	55,02
5	7,74	73,29	6,18	46,55	18,51	83,6	10,56	32,97	14,67	53,39	13,48	26,52	17,45	78,82
6	14,37	59,72	4,32	79,45	5,51	37,13	26,76	29,65	13,52	20,93	17,05	5,5	1,31	75,6
7	14,11	38,19	13,78	42,32	5,28	60,88	28,93	65,53	9,51	59,87	42,91	77,07	0,87	–
8	38,33	27,13	17,43	11,9	6,75	35,33	25,41	35,28	44,04	15,41	26,85	40,67	4,48	13,93
9	41,68	32,86	5,93	14,5	10,44	68,33	15,67	31,37	24,37	62,86	30,54	63,56	20,20	60,69
10	11,17	50,73	–	–	7,02	32,31	–	–	42,31	67,18	47,69	73,3	–	–
11	48,98	64,95	–	–	–	–	–	–	17,89	12,7	31,38	51,9	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	4,67	56,58	12,21	53,68	–	–
ДМСО	60,48	84,85	53,18	86,62	55,60	80,92	59,09	16,73	59,59	96,69	56,91	81,97	57,12	27,74

Примечание. К – концентрация феназинов, мг/л; Г – гибель клеток, %; прочерк означает отсутствие феназинов. Феназины во фракциях от 1 до 12 растворены в физиологическом растворе.

Таблица 2

Влияние феназиновых фракций штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*
на клеточную линию HeLa

Table 2

Effect of phenazine fractions of *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* on the HeLa cell line

Номер фракции	Штамм															
	B-162/255		B-162/55		B-162		B-162/18		B-162/17		B-162/17 (на среде M9)		B-162/15		B-162/2	
	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г
1	—	—	—	—	—	—	10,97	98,36	7,29	100	8,22	100	3,65	13,36	—	—
2	55,94	30,39	—	—	78,61	100	60,79	88,54	50,2	68,52	5,19	100	74,07	100	—	—
3	80,32	100	—	—	25,38	9,1	59,23	54,55	—	—	2,09	100	41,27	91,96	—	—
4	—	—	—	—	15,16	45,72	19,74	32,09	26,81	100	9,47	100	15,97	11,68	—	—
5	16,28	100	1,02	100	1,52	100	7,00	69,72	3,78	100	9,83	100	11,9	100	16,88	100
6	2,97	100	2,06	100	0,26	64,58	10,82	100	1,47	34,9	6,94	100	1,58	37,78	—	—
7	—	—	—	—	1,72	55,1	4,46	100	7,82	100	0,93	100	—	—	—	—
8	1,05	56,1	—	—	—	—	2,55	44,69	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ДМСО	24,75	79,66	1,44	100	15,34	82,4	30,02	99,63	47,10	87,77	6,70	100	34,42	87,06	2,96	100

Таблица 3

Влияние феназиновых фракций штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*
на клеточную линию фибробластов мыши

Table 3

Effect of phenazine fractions of *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* on the mouse fibroblast cell line

Номер фракции	Штамм															
	B-162/255		B-162/55		B-162		B-162/18		B-162/17		B-162/17 (на среде M9)		B-162/15		B-162/2	
	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г
1	—	—	—	—	—	—	10,97	45,37	7,29	94,88	8,22	95,95	3,65	97,91	—	—
2	55,94	29,26	—	—	78,61	27,88	60,79	30,17	50,2	29,95	5,19	36,96	74,07	92,03	—	—
3	80,32	34,71	—	—	25,38	7,17	59,23	49,15	—	—	2,09	57,89	41,27	34,17	—	—
4	—	—	—	—	15,16	3,33	19,74	2,84	26,81	24,46	9,47	95,73	15,97	17,22	—	—
5	16,28	80,75	1,02	23,38	1,52	52,79	7,00	56,65	3,78	57,97	9,83	97,77	11,9	17,24	16,88	17,59
6	2,97	36,21	2,06	23,53	0,26	51,31	10,82	87,72	1,47	37,2	6,94	42,99	1,58	18,68	—	—
7	—	—	—	—	1,72	14,79	4,46	19,26	7,82	11,04	0,93	15,95	—	—	—	—
8	1,05	17,92	—	—	—	—	2,55	14,71	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ДМСО	24,75	85,13	1,44	88,65	15,34	87,23	30,02	85,07	47,10	86,34	6,70	94,59	34,42	77,13	2,96	91,94

Особый интерес представляет то, что аналогичные по номерам фракции из разных штаммов проявляют различную биологическую активность в отношении одной и той же клеточной культуры, причем цитотоксический эффект не всегда коррелирует с концентрацией феназиновых антибиотиков, по-видимому, он обусловлен их качественным составом. В предыдущих исследованиях было установлено, что во всех фракциях присутствует феназин-1-карбоксилат в относительно высоких концентрациях. Это соединение относится к мажорным феназинам, описанным ранее для бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*. Обнаруженные нами различные свойства фракций, предположительно, обусловлены наличием минорных феназиновых соединений, обладающих, вероятно, большей активностью, чем феназин-1-карбоксилат. На основании этого установление химического состава феназиновых фракций штаммов, продемонстрировавших наиболее положительные результаты, а также определение их оптимальной концентрации будут являться важнейшими задачами наших последующих исследований.

Библиографические ссылки

1. Mavrodi D. V., Blankenfeldt W., Thomashow L. S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 417–445.
2. Nicolli Bellotti de Souza, Isabel M. de Andrade, Paula F. Carneiro, et al. Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro and in mice malaria studies // *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2014. Vol. 109, № 5. P. 546–552.
3. Haas D., Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizig *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. Vol. 41. P. 117–153.
4. Mavrodi D. V., Peever T. L., Mavrodi O. V., et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, № 3. P. 866–879.
5. Dasgupta D., Kumar A., Mukhopadhyay B., et al. Isolation of phenazine 1,6-di-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99, № 20. P. 8653–8665.
6. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains // *J. Bacteriol.* 1970. Vol. 103, № 1. P. 16–19.
7. William F. Scherer, Jerome T. Syverton. The Viral Range in Vitro of a Malignant Human Epithelial Cell (Strain HeLa, Gey) // *Am. J. Pathol.* 1954. Vol. 30, № 6. P. 1075–1083.
8. Шаниро М. А., Веремеенко Е. Г., Янцевич А. В. Оптимизация методов твердофазной экстракции феназиновой фракции из культуральной среды и клеток *Pseudomonas aeruginosa* // Биология – наука XXI века : сб. тез. XIX Междунар. школы-конференции молодых ученых (Пушино, 20–24 апр. 2015 г.). Пушино, 2015.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 65, № 1/2. P. 55–63.
10. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay // *J. Immunol. Methods.* 1990. Vol. 130, № 1. P. 149–151.
11. Черепович В. С., Шахлевич Е. В., Антоненко Е. В. и др. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности // *Мед. журн.* 2006. № 2. С. 106–108.
12. Веремеенко Е. Г. Получение, характеристика и применение продуцентов феназиновых антибиотиков бактерий *Pseudomonas aurantiaca* : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03. Минск, 2010.
13. Леончик Е. В., Веремеенко Е. Г. Изучение антагонистической активности бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* в отношении условно-патогенных для человека и животных микроорганизмов // Сборник работ 74-й научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета (Минск, 19 апр. 2017 г.). Минск : БГУ, 2017.

References

1. Mavrodi D. V., Blankenfeldt W., Thomashow L. S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 417–445.
2. Nicolli Bellotti de Souza, Isabel M. de Andrade, Paula F. Carneiro, et al. Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro and in mice malaria studies. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2014. Vol. 109, No. 5. P. 546–552.
3. Haas D., Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizig *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. Vol. 41. P. 117–153.
4. Mavrodi D. V., Peever T. L., Mavrodi O. V., et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, No. 3. P. 866–879.
5. Dasgupta D., Kumar A., Mukhopadhyay B., et al. Isolation of phenazine 1,6-di-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99, No. 20. P. 8653–8665.
6. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains. *J. Bacteriol.* 1970. Vol. 103, No. 1. P. 16–19.
7. William F. Scherer, Jerome T. Syverton. The Viral Range in Vitro of a Malignant Human Epithelial Cell (Strain HeLa, Gey). *Am. J. Pathol.* 1954. Vol. 30, No. 6. P. 1075–1083.

8. Shapiro M. A., Veremeenko E. G., Yantsevich A. V. Optimization of methods for solid-phase extraction of the phenazine fraction from the culture medium and cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biology – the science of the XXI century* : the collect. of theses of the XIX Int. school of the conf. of young sci. (Pushchino, 20–24 April, 2015). Pushchino, 2015 (in Russ.).
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983. Vol. 65, No. 1/2. P. 55–63.
10. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods*. 1990. Vol. 130, No. 1. P. 149–151.
11. Cherepovich V. S., Shakhlevich E. V., Antonenko E. V., et al. Optimization of the critical parameters of the MTT test for the evaluation of cellular and drug cytotoxicity. *Med. J.* 2006. No. 2. P. 106–108 (in Russ.).
12. Veremeenko E. G. The receiving, characteristic and application of producers phenazine antibiotics of bacteria *Pseudomonas aurantiaca* : dissertatsiya... kandidata biol. nauk : 03.02.03. Minsk, 2010 (in Russ.).
13. Leonchik E. V., Veremeenko E. G. The study of the antagonistic activity of bacteria *Pseudomonas chlororaphis* sbsp. *aurantiaca* in relation to opportunistic microorganisms for humans and animals. *Collection of works of the 74th scientific conference of students and postgraduate students of the Belarusian State University* (Minsk, 19 April, 2017). Minsk : BSU, 2017.

Статья поступила в редколлегию 15.09.2017.
Received by editorial board 15.09.2017.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.214+616-006.4

НОКДАУН ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА *KMT2A-AFF1* АССОЦИИРОВАН С ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫМ СПЛАЙСИНГОМ РНК В КЛЕТКАХ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ЧЕЛОВЕКА

В. В. ГРИНЕВ¹⁾, О. ХАЙДЕНРАЙХ²⁾

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

²⁾Детский онкологический центр Вульфсона, Северный институт исследований рака,
Ньюкаслский университет, здание Гершеля, NE1 7RU, г. Ньюкасл, Великобритания

Отмечено, что гибридный онкоген *KMT2A-AFF1* является продуктом транслокации t(4;11)(q21;q23). Этот онкоген, при условии появления в ранних предшественниках гемопоэза, выступает в роли одного из факторов генеза острого лимфобластного лейкоза у детей, механизм которого до конца не установлен. Показано, что активность онкогена *KMT2A-AFF1* оказывает влияние на транскриптом лейкозных клеток. Данный эффект реализуется двумя путями: через дифференциальную экспрессию множества генов, подконтрольных онкогену, а также через контроль дифференциального сплайсинга. Представленные результаты свидетельствуют об открытии нового действия онкогена *KMT2A-AFF1* и обеспечивают перспективы в изучении лейкоза, ассоциированного с транслокацией t(4;11)(q21;q23).

Ключевые слова: гибридный онкоген *KMT2A-AFF1*; нокдаун экспрессии; альтернативный сплайсинг РНК; лейкозные клетки человека.

Образец цитирования:

Гринев В. В., Хайденрайх О. Нокдаун гибридного онкогена *KMT2A-AFF1* ассоциирован с дифференциальным сплайсингом РНК в клетках острого лимфобластного лейкоза человека // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 21–27.

For citation:

Grinev V. V., Heidenreich O. The knockdown of the fusion oncogene *KMT2A-AFF1* is associated with differential RNA splicing in human acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 21–27 (in Russ.).

Авторы:

Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Олаф Хайденрайх – доктор философии; профессор молекулярной гематологии.

Authors:

Vasily V. Grinev, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

grinev_vv@bsu.by

Olaf Heidenreich, PhD (philosophy); professor of molecular haematology.

olaf.heidenreich@ncl.ac.uk

THE KNOCKDOWN OF THE FUSION ONCOGENE *KMT2A-AFF1* IS ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL RNA SPLICING IN HUMAN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS

V. V. GRINEV^a, O. HEIDENREICH^b

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

^bWolfson Childhood Cancer Research Centre, Nothorn Institute for Cancer Research, Newcastle University, Herschel Building, NE1 7RU, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

Corresponding author: V. V. Grinev (grinev_yv@bsu.by)

The fusion oncogene *KMT2A-AFF1* is the outcome of translocation t(4; 11)(q21; q23). If this occurred at the level of early hematopoietic progenitors, this oncogene plays the role of one of the factors in the genesis of children acute lymphoblastic leukemia, the mechanism of which is not fully understood. In this work, it was shown that the *KMT2A-AFF1* activity affects the state of transcriptome of leukemia cells. This effect is realized in two ways: through the differential expression of the target genes controlled by oncogene, and also through control of differential splicing. The presented results indicate the discovery of a new biological activity of oncogene *KMT2A-AFF1*, and it also opens new perspectives in study of t(4; 11)(q21; q23) positive leukemia.

Key words: fusion oncogene *KMT2A-AFF1*; knockdown of expression; alternative RNA splicing; human leukemia cells.

Хромосомные перестройки являются одними из наиболее частых генетических аномалий, ассоциированных с развитием лейкозов у человека. Среди них особо выделяется группа реципрокных не-гомологичных транслокаций, приводящих к образованию гибридных онкогенов. В частности, такая транслокация, как t(4; 11)(q21; q23), порождает гибридный локус *KMT2A-AFF1* [1]. Появление этого онкогена в гемопоэтических стволовых/прогениторных клетках человека является одним из факторов инициации и формирования острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей [2]. К сожалению, несмотря на длительную историю изучения, механизмы лейкозогенной активности онкогена *KMT2A-AFF1* в полной мере не расшифрованы [3].

Цель настоящей работы – выяснить, каково влияние вышеуказанного онкогена на качественный и количественный состав транскриптома лейкозных клеток. Для этого с помощью РНК-интерференции экспрессия онкогена *KMT2A-AFF1* в клетках ОЛЛ подавлялась, после чего по технологии RNA-Seq проводилось секвенирование транскриптома таких клеток, а полученные экспериментальные данные подвергались биоинформационному анализу.

Результаты наших исследований показывают, что влияние онкогена *KMT2A-AFF1* на состояние транскриптома лейкозных клеток реализуется двумя путями: через дифференциальную экспрессию множества генов, подконтрольных этому онкогену, а также через прямой или опосредованный контроль дифференциального сплайсинга. Полученные результаты являются первым свидетельством существования у онкогена *KMT2A-AFF1* новой биологической активности. Возможно, что именно измененное под влиянием этого онкогена состояние транскриптома и формирует фенотипические особенности лейкозных клеток при ОЛЛ.

Материалы и методы исследований

Представленное исследование основано на данных, полученных на клетках линии SEM (DSMZ № ACC 546), которая является модельной клеточной линией положительной по транслокации t(4; 11)(q21; q23) формы ОЛЛ. Клетки SEM были обработаны двумя типами коротких интерферирующих РНК (киРНК): контрольными – siAGF1, которые распознают РНК онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, но не онкогена *KMT2A-AFF1*, и активными – siAM4, позволяющими запускать искусственную РНК-интерференцию против *KMT2A-AFF1*. Обработка целевых клеток киРНК, выделение из них и очистка фракции полиаденилированной РНК, подготовка библиотек для секвенирования по технологии RNA-Seq и само секвенирование проводились на базе Детского онкологического центра Вульфсона при Ньюкаслском университете (г. Ньюкасл, Великобритания) согласно стандартным протоколам.

Файлы FASTQ, полученные в результате секвенирования транскриптома клеток SEM, подвергались стандартной процедуре предпроцессинга, после чего короткие секвенированные фрагменты РНК (прочтения или риды) картировались по эталонной сборке GRCh38.p7 генома человека с помощью

программы *Subjunc* [4]. Этот же алгоритм использовался для идентификации соединений экзонов – EEJs (от англ. *exon-exon junctions*) в зрелых молекулах РНК и количественной оценки их встречаемости в транскриптоме клеток SEM. Сбор количественной информации по экспрессии экзонов и генов в изучаемых клетках осуществлялся с помощью программы *featureCounts* [5].

Все количественные данные, полученные при секвенировании транскриптома клеток SEM по технологии RNA-Seq и после картирования прочтений, подвергались многоступенчатой фильтрации, нормализации и трансформации, коротко описанным в контексте дальнейшего изложения результатов. Линейное моделирование и идентификация генов, дифференциально экспрессированных в двух состояниях изучаемых клеток (после обработки контрольными или активными киРНК), проводились в соответствии с описанием в [6–8]. Для идентификации дифференциальных сплайсинговых событий использовались функциональные возможности программы *diffSplice* [6].

Статистические тесты и другие рутинные вычислительные процедуры проводились согласно общепринятым стандартам. Вся аналитическая работа, результаты которой представлены в настоящем исследовании, проведена в среде программирования *R* с использованием как уже готовых решений, доступных через репозиторий *Bioconductor*, так и с помощью оригинальных программ, написанных авторами исследования.

Результаты исследований и их обсуждение

Прямое или не прямое влияние гена на альтернативный сплайсинг можно обнаружить по дифференциальному сплайсингу. Под дифференциальным сплайсингом подразумевается альтернативный сплайсинг, зависящий от условий, в данном случае – от экспрессии изучаемого гена. Исходя из этого, нами проведен нокдаун онкогена *KMT2A-AFF1* в клетках ОЛЛ линии SEM, содержащих транслокацию t(4;11)(q21;q23), с помощью искусственно запускаемой РНК-интерференции и секвенирован транскриптом лейкозных клеток по технологии RNA-Seq. Дальнейшее картирование коротких прочтений и сбор количественной информации по экспрессии генов и идентифицированным EEJs были проведены так, как описано в разделе «Материалы и методы исследований».

Дифференциальный сплайсинг может быть как самостоятельным процессом, так и ассоциированным с дифференциальной экспрессией генов. В связи с этим первоначально нами с использованием функциональных возможностей *R/Bioconductor* библиотек *limma* [6] и *edgeR* [7] проведено линейное моделирование экспрессии генов в клетках SEM, обработанных контрольными siAGF1 и активными siAM4 киРНК. Количественные данные, необходимые для такого моделирования, были получены нами путем подсчета количества прочтений, перекрывающих экзоны генов человека. Координаты экзонов эталонной сборки GRCh38.p7 генома человека были взяты из 85-го выпуска базы данных *Ensembl* [9]. При этом все экзоны, в частности те, геномные координаты которых перекрываются, но отличаются по одному или обоим концам, были объединены в экзонные кластеры. Количество прочтений, попадающих в тот или иной кластер, было суммировано по генам и нормализовано относительно общего размера кластеров каждого гена.

Распределение уровней экспрессии генов в клетках SEM, как видно на рис. 1, а, носит бимодальный характер. Существенная часть генов характеризуется очень низким уровнем экспрессии, является шумом и не может быть использована в дальнейшем анализе.

Кроме того, те данные, которые отражают экспрессию действительно работающих генов, демонстрируют гетероскедастичность – высокую дисперсию при низких значениях экспрессии и, наоборот, низкую дисперсию при высокой экспрессии, что наглядно демонстрирует кривая локально взвешенной регрессии на рис. 1, б. С учетом таких особенностей данных нами не только отфильтрован шум, но также проведены *voom*-нормализация [10] и логарифмическая трансформация оставшихся данных для снижения влияния неоднородной дисперсии на результаты линейного моделирования.

Результаты линейного моделирования, выполненного по стандартной методологии [6–8] на нормализованных данных, показывают, что нокдаун онкогена *KMT2A-AFF1* приводит к дифференциальной экспрессии части генов в клетках SEM (рис. 1, в). Количество таких генов зависит от величины выбранных статистических порогов; так, при использовании консервативных величин этих порогов (минимум двукратное изменение экспрессии между условиями при $p < 0,001$ и $q < 0,1$) можно говорить о 65 генах с дифференциальной экспрессией. Полученные данные также указывают на то, что невозможно напрямую, без учета дифференциальной экспрессии генов, идентифицировать дифференциальные сплайсинговые события в клетках SEM.

С учетом вышеизложенного нами расширено стандартное линейное моделирование путем введения дополнительного этапа, позволяющего скорректировать те искажения, которые вносит дифференциальная экспрессия генов при обнаружении дифференциальных сплайсинговых событий. Для этого

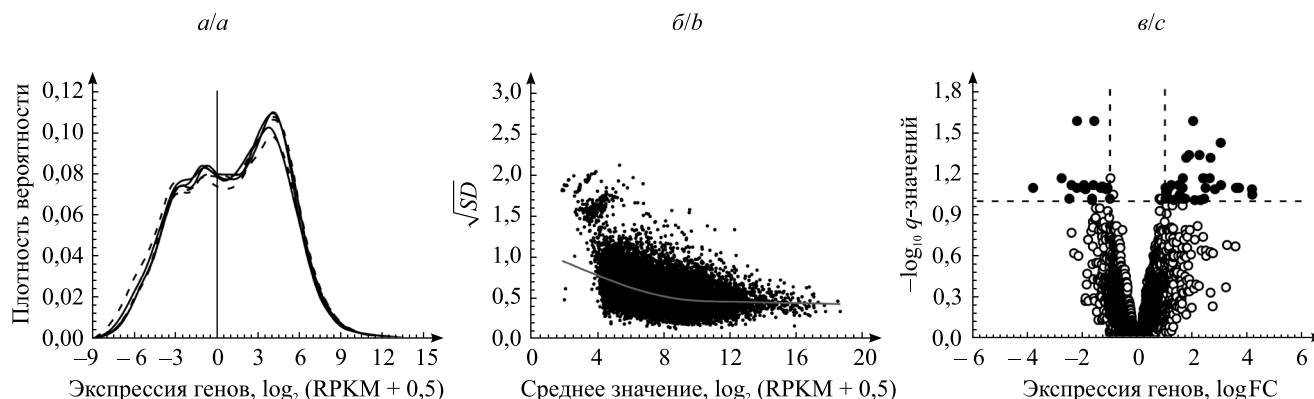


Рис. 1. Нокдаун онкогена *KMT2A-AFF1* приводит к дифференциальной экспрессии генов в клетках SEM:
а – распределение уровней экспрессии генов в клетках, обработанных контрольными siAGF1 (пунктирные кривые) и активными siAM4 (сплошные кривые) киРНК. Здесь и далее уровень экспрессии генов выражен в RPKM (от англ. *reads per kilobase per million*) или количестве прочтений из 1 млн прочтений в библиотеке RNA-Seq, приходящихся на 1 тыс. нуклеотидов экзонных кластеров гена. Вертикальная линия показывает положение порога экспрессии, использованного для фильтрации данных;
б – исходные данные, полученные при секвенировании транскриптома клеток SEM по технологии RNA-Seq, демонстрируют гетероскедастичность. Серая линия показывает прохождение кривой локально взвешенной регрессии;
в – согласно результатам линейного моделирования нокдаун онкогена *KMT2A-AFF1* в клетках SEM меняет экспрессию 65 генов. Ось абсцисс показывает $\log_2$ -трансформированную разницу ($\log FC$) в экспрессии генов между двумя условиями, а ось ординат отражает статистическую значимость этой разницы. Штриховые линии показывают положение порогов экспрессии и статистической значимости, которые были использованы при идентификации генов с дифференциальной экспрессией

Fig. 1. Knockdown of the *KMT2A-AFF1* oncogene leads to differential expression of genes in SEM cells:
а – distribution of the levels of gene expression in control siAGF1 (dashed lines) and active siAM4 (solid lines) siRNA treated cells. Here and below, the levels of gene expression are calculated in RPKM, or reads per kilobase per million. Vertical line is the expression threshold for data filtration;
б – raw RNA-Seq transcriptomic data from SEM cells demonstrate heteroscedasticity. Gray line is a locally weighed regression trend;
в – according to linear modeling, knockdown of the *KMT2A-AFF1* oncogene changes the expression of 65 genes in SEM cells. x-Axis shows the $\log_2$ transformed fold changes ($\log FC$) in gene expression between two states of cells. y-Axis demonstrates the statistical significance of $\log FC$. Dashed lines correspond to expression and significance thresholds which were used for identification of differentially expressed genes

в результате картирования RNA-Seq прочтений с помощью программы *Subjunc* [4] нами собраны данные обо всех потенциальных EEJs в виде матрицы сплайсинга. Далее, количественные данные последовательно нормализовались относительно размера библиотек RNA-Seq и преобразовывались в количество прочтений на миллион – CPM (от англ. *counts per million*). Поскольку данные RNA-Seq о сплайсинговых событиях, как и данные об экспрессии генов, проявляют гетероскедастичность (рис. 2, а), то к ним также были применены *voom*-нормализация [10] и логарифмическая трансформация.

Подготовленные таким образом данные использовались для расчета параметров линейных моделей, из которых с помощью функции *diffSplice* [6] извлекалась информация о дифференциальных событиях сплайсинга. К последним были отнесены те EEJs, которые на фоне других EEJs статистически значимо ($p < 0,0001$ и $q < 0,1$) и не менее чем двукратно отличались по частоте встречаемости в зрелых молекулах РНК генов при разных состояниях клеток SEM. С помощью такого подхода нам удалось идентифицировать 73 события дифференциального сплайсинга, ассоциированного с нокдауном онкогена *KMT2A-AFF1* и затрагивающего созревание молекул РНК 57 генов. Графически эти результаты отображены на рис. 2, б, с помощью графика-вулкана.

Интересно отметить, что 97,8 % всех сплайсинговых событий (как дифференциальных, так и недифференциальных), обнаруженных в клетках SEM, представлены EEJs, аннотированными в 85-м выпуске базы данных *Ensembl*. Лишь 2,2 % (или 2005 в абсолютном исчислении) таких событий являются уникальными для изучаемого типа клеток (рис. 2, в). Кроме того, из рис. 2, в, видно, что два состояния транскриптома клеток SEM (без нокдауна и с нокдауном онкогена *KMT2A-AFF1*) качественно отличаются лишь по 30 сплайсинговым событиям. Более же существенная разница между этими двумя состояниями клеток обнаруживается только при количественном анализе.

Преобладающим типом альтернативного сплайсинга среди идентифицированных дифференциальных EEJs являются изоформы интронов – незначительные вариации длины интронов по 5'- и 3'-концам одновременно (рис. 3, а), на долю которых приходится 39,7 %. Далее, идут такие варианты, как альтернативный первый или последний экзоны (16,4 и 9,6 % соответственно) и каскетные экзоны (12,3 %). На другие типы альтернативного сплайсинга приходится незначительная доля дифференциальных EEJs.

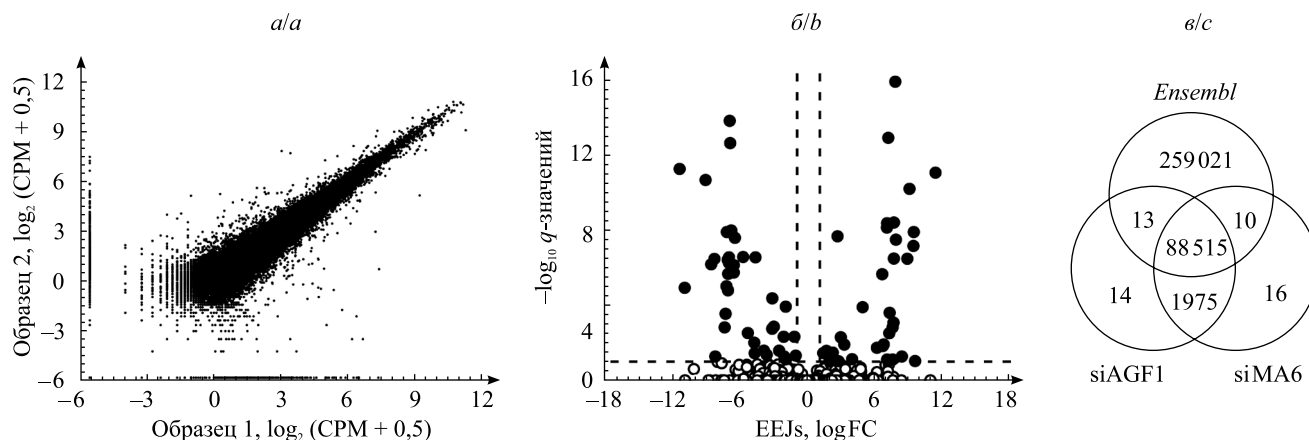


Рис. 2. Нокдаун онкогена *KMT2A-AFF1* приводит к дифференциальному сплайсингу РНК ряда генов, активных в клетках SEM: *a* – репрезентативная диаграмма сравнения двух образцов РНК, выделенных из клеток SEM и секвенированных по технологии RNA-Seq. Диаграмма основана на количественных данных о тех прочтениях, которые были картированы по EEJs; *b* – график-вулкан распределения EEJs между двумя состояниями клеток SEM. Ось абсцисс показывает logFC частоты встречаемости EEJs в зрелых молекулах РНК генов при разных состояниях изучаемых клеток, а ось ординат отражает статистическую значимость logFC. Штриховые линии показывают положение порогов, которые были использованы при идентификации дифференциальных сплайсинговых событий; *c* – диаграмма Венна, представляющая распределение всех EEJs, идентифицированных в исследовании, между клетками SEM, обработанными контрольными и активными кРНК. На диаграмме также представлено сравнение экспериментально обнаруженных EEJs с базой данных *Ensembl*

Fig. 2. Knockdown of the *KMT2A-AFF1* oncogene leads to differential RNA splicing of the sub-set of genes active in SEM cells: *a* – representative scatterplot of the two RNA-Seq sequenced RNA samples from SEM cells.

This plot is based on reads mapped to EEJs only;

b – volcano plot of EEJs distribution between two states of SEM cells. x-Axis shows the logFC of EEJs and y-axis demonstrates the statistical significance of this logFC. Dashed lines correspond to thresholds which were used for identification of differential splicing events;

c – Venn diagram shows the overlap between EEJs identified in control and active siRNA treated SEM cells and *Ensembl* EEJs

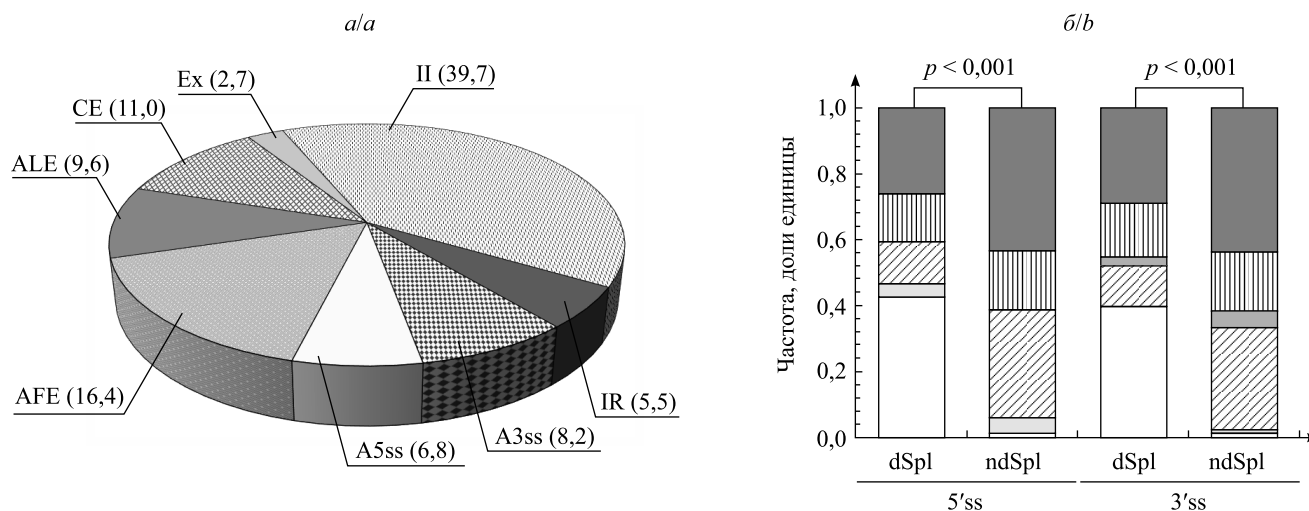


Рис. 3. Классификация дифференциальных EEJs, обнаруженных в клетках SEM:

a – распределение дифференциальных EEJs по типам альтернативного сплайсинга, %: альтернативный первый экзон (AFE), альтернативный последний экзон (ALE), кассетный экзон (CE), экзитрон (Ex), изоформа интрона (II), сохранение интрона (IR), альтернативный 3'-сайт сплайсинга (A3ss) и альтернативный 5'-сайт сплайсинга (A5ss); *b* – распределение сайтов сплайсинга (ss) недифференциальных (ndSpl) и дифференциальных (dSpl) EEJs среди функциональных типов экзонов человека: неаннотированные экзоны (□), 5'-UTR-экзоны (▤), CDS-экзоны (▨), 3'-UTR-экзоны (▧), экзоны некодирующих РНК (▩) и мультифункциональные экзоны (■)

Fig. 3. Classification of differential EEJs detected in SEM cells:

a – alternative splicing type based classification of differential EEJs, %: alternative first exon (AFE), alternative last exon (ALE), cassette exon (CE), exitron (Ex), intron isoform (II), intron retention (IR), alternative 3'-splice site (A3ss) and alternative 5'-splice site (A5ss);

b – the distribution of splice sites (ss) of non-differential (ndSpl) and differential (dSpl) EEJs among of functional type of human exons: non-annotated exons (□), 5'-UTR exons (▤), CDS exons (▨), 3'-UTR exons (▧), exons of non-coding RNA (▩) and multifunctional exons (■)

Особый тип альтернативного сплайсинга представляют экзитроны – участки CDS-экзонов, кодирующих белок, которые могут выступать в качестве интронов и удаляться во время сплайсинга [11]. Среди дифференциальных EEs нами обнаружены два таких события, причем оба затронули сплайсинг РНК генов *FUS* и *SON*, кодирующих факторы сплайсинга и принадлежащих к группе генов, аннотированных в базе данных *Gene Ontology* как гены факторов связывания РНК и сплайсинга. Членами данной группы статистически значимо ($p = 0,00913$) в 3,73 раза обогащен список генов, для которых был детектирован дифференциальный сплайсинг в настоящем исследовании. Эти данные указывают на существование петли ауторегуляции дифференциального сплайсинга, ассоциированного с нокдауном онкогена *KMT2A-AFF1* в клетках SEM.

Интересно отметить, что CDS-экзоны фигурируют в качестве объектов не только такого альтернативного сплайсинга, как экзитроны, но и функционального типа экзонов, частота вовлечения которого в дифференциальный сплайсинг ниже, чем в недифференциальный (см. рис. 3, б). В целом для дифференциального сплайсинга по сравнению с недифференциальным характерна статистически значимая (согласно критерию χ^2 $p < 0,001$) разница в распределении сайтов сплайсинга среди функциональных типов экзонов, причем с явным сдвигом в сторону экзонов, не аннотированных в 85-м выпуске базы данных *Ensembl* (см. рис. 3, б).

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что нокдаун онкогена *KMT2A-AFF1* в клетках ОЛЛ, положительных по транслокации t(4; 11)(q21; q23), сопровождается не только дифференциальной экспрессией некоторых генов, но и дифференциальным сплайсингом РНК ряда генов, в том числе генов, кодирующих факторы сплайсинга. Возможно, открытая нами и ранее неизвестная биологическая активность онкогена *KMT2A-AFF1* вносит вклад в развитие ОЛЛ, что, однако, требует дальнейших специализированных исследований.

Библиографические ссылки

1. Hensel J. P., Gillert E., Fey G. H., et al. Breakpoints of t(4; 11) translocations in the human MLL and AF4 genes in ALL patients are preferentially clustered outside of high-affinity matrix attachment regions // *J. Cell Biochem.* 2001. Vol. 82. P. 299–309.
2. Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications // *Oncogene.* 2008. Vol. 27. P. 5759–5773.
3. Ballabio E., Milne T. A. Molecular and epigenetic mechanisms of MLL in human leukemogenesis // *Cancers (Basel).* 2012. Vol. 4. P. 904–944.
4. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. P. e108.
5. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. FeatureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features // *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30. P. 923–930.
6. Ritchie M. E., Phipson B., Wu D., et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. P. e47.
7. Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics.* 2010. Vol. 26, № 1. P. 139–140.
8. Smyth G. K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments // *Stat. Appl. Genet. Molec. Biol.* 2004. Article 3.
9. Aken B. L., Ayling S., Barrell D., et al. The Ensembl gene annotation system // *Database (Oxford).* 2016. Vol. 2016. P. 1–19.
10. Law C. W., Chen Y., Shi W., et al. Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts // *Genome Biol.* 2014. Vol. 15. P. R29.
11. Yamile M., Markus H., Zahra A., et al. Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exitrons and their role in proteome plasticity // *Genome Res.* 2015. Vol. 25. P. 995–1007.

References

1. Hensel J. P., Gillert E., Fey G. H., et al. Breakpoints of t(4; 11) translocations in the human MLL and AF4 genes in ALL patients are preferentially clustered outside of high-affinity matrix attachment regions. *J. Cell Biochem.* 2001. Vol. 82. P. 299–309.
2. Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications. *Oncogene.* 2008. Vol. 27. P. 5759–5773.
3. Ballabio E., Milne T. A. Molecular and epigenetic mechanisms of MLL in human leukemogenesis. *Cancers (Basel).* 2012. Vol. 4. P. 904–944.
4. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. P. e108.
5. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. FeatureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30. P. 923–930.

6. Ritchie M. E., Phipson B., Wu D., et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. P. e47.
7. Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010. Vol. 26, No. 1. P. 139–140.
8. Smyth G. K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Molec. Biol.* 2004. Article 3.
9. Aken B. L., Ayling S., Barrell D., et al. The Ensembl gene annotation system. *Database (Oxford).* 2016. Vol. 2016. P. 1–19. DOI: 10.1093/database/baw093.
10. Law C. W., Chen Y., Shi W., et al. Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 2014. Vol. 15. P. R29.
11. Yamile M., Markus H., Zahra A., et al. Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exitrons and their role in proteome plasticity. *Genome Res.* 2015. Vol. 25. P. 995–1007.

Статья поступила в редколлегию 13.09.2017.
Received by editorial board 13.09.2017.

УДК 578.224

РАЗРАБОТКА И ПРОВЕРКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ ТИПА 2

Л. М. КРАВЧЕНКО¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾, К. В. КУДИН¹⁾

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

Разработан дизайн двух генетических конструкций, которые могут стать основой для создания ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2. Эти конструкции получены на базе коммерческого плазмидного вектора pVAX1, одна из них содержит полноразмерную природную открытую рамку считывания капсидного белка цирковируса, а вторая – открытую рамку считывания, соответствующую белку без первых тридцати *N*-концевых аминокислот. Для амплификации необходимых фрагментов вирусного белка были разработаны соответствующие праймеры. Экспрессию целевых последовательностей выявляли по наличию капсидного белка вируса в культуре трансфицированных клеток млекопитающих. Предварительная оценка возможности кальций-фосфатной трансфекции перевиваемых клеток эпителия эмбриона свиньи позволила установить нецелесообразность ее использования для дальнейших исследований разработанных генетических конструкций. Результаты экспериментов показали, что белок капсида цирковируса свиней типа 2 присутствует в лизатах трансфицированных клеток в низких количествах, при этом содержание укороченного варианта белка выше, чем нативного.

Ключевые слова: цирковирус; ДНК-вакцина; цирковирус свиней типа 2; интерфероны; кальций-фосфатная трансфекция.

DEVELOPMENT AND VERIFICATION OF THE FUNCTIONING OF GENETIC CONSTRUCTS FOR DNA VACCINE AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2

L. M. KRAVCHENKO^a, U. A. PRAKULEVICH^a, K. V. KUDZIN^a

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

Corresponding author: L. M. Kravchenko (lidia_kravchenko@tut.by)

In this research a design of two genetic constructions which may be used for creation of DNA vaccine for porcine circovirus type 2 (PCV-2) was developed. These constructions were derived from commercial plasmid vector pVAX1, one of them contains full-size natural open reading frame of circovirus capsid protein and the second contains an open reading frame corresponding to a protein without the first thirty *N*-terminal amino acids. The appropriate primers for amplification

Образец цитирования:

Кравченко Л. М., Прокулевич В. А., Кудин К. В. Разработка и проверка функционирования генетических конструкций для ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2 // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 28–37.

For citation:

Kravchenko L. M., Prakulevich U. A., Kudzin K. V. Development and verification of the functioning of genetic constructs for DNA vaccine against porcine circovirus type 2. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 28–37 (in Russ.).

Авторы:

Лидия Михайловна Кравченко – аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Прокулевич.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Кирилл Валерьевич Кудин – научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета.

Authors:

Lidia M. Kravchenko, postgraduate student at the department of microbiology, faculty of biology.

lidia_kravchenko@tut.by

Uladzimir A. Prakulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.

prakulevich@mail.ru

Kiryl V. Kudzin, researcher at the department of microbiology, faculty of biology.

kiryl.kudin@gmail.com

of the necessary viral protein fragments were developed. Expression of the target sequences was detected by the presence of the virus capsid protein in the culture of transfected mammalian cells. Preliminary possibility of calcium-phosphate transfection of the porcine cell line SPEV was assessed. The obtained results showed that this approach is inexpedient for further studies of target genetic constructs. The results of the experiments showed that the circovirus capsid protein is present in the lysates of transfected cells in low amounts, while the content of the truncated variant of the protein is higher than the native one.

Key words: circovirus; DNA vaccine; porcine circovirus type 2; interferons; calcium phosphate transfection.

Введение

Цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2) и ассоциированные с ним синдромы являются причиной огромных экономических потерь свиноводческих хозяйств по всему миру. Данный икосаэдрический безоболочечный вирус диаметром 17–22 нм – представитель семейства *Circoviridae* рода *Circovirus*. Вирусный геном размером 1767 нуклеотидов представлен кольцевой одноцепочечной ДНК, содержащей три открытые рамки считывания (ОРС), которые кодируют белок, обеспечивающий формирование капсидной оболочки вируса, белок, вовлеченный в патогенез вируса, и две формы репликазы [1; 2]. Единственный белок капсида ЦВС-2 состоит из 233 аминокислот и имеет массу 27,8 кДа. Первые 30 аминокислот *N*-концевого домена капсидного белка содержат три tandemных повтора (по 3–4 аргининовых остатка в каждом), причем два из них, ближайших к *N*-концу, кодируют исключительно редкие аргининовые кодоны AGG/AGA/CGG. Белок капсида содержит сигнал ядерной локализации, а благодаря наличию большого количества положительно заряженных остатков аргинина выполняет функцию связывания ДНК-вируса в области начала репликации [3].

Цирковирус свиней типа 2 является серьезной экономической проблемой, наносящей огромные убытки свиноводству по всему миру. Данный патоген обуславливает развитие ряда синдромов и болезней животных, объединенных одним термином – «цирковиральные болезни свиней», которые характеризуются мультисистемным истощением отъемышей, отставанием в росте и развитии, репродуктивной дисфункцией, поражением кожи, развитием респираторного и нефропатического синдромов. Используемые превентивные меры и профилактические препараты не решают проблемы распространения вируса. В настоящее время возбудитель обнаруживается практически в каждом свиноводческом хозяйстве, но степень проявления инфекции сильно зависит от ряда факторов: технологии содержания, микроклимата, наличия других возбудителей бактериальных и вирусных инфекций и т. д. [1; 4].

Несмотря на активные попытки предотвратить распространение ЦВС-2, эффективных профилактических и терапевтических мер против вируса до сих пор не разработано. В связи с этим приоритетным направлением исследований в области фармацевтической ветеринарии выступает создание инновационных иммунобиологических препаратов, в частности ДНК-вакцин. Использование таких вакцин для иммунизации животных является потенциально эффективной мерой в борьбе с ЦВС-2.

Преимущество ДНК-вакцин, по сравнению с вакцинами других типов, состоит в том, что они стимулируют запуск как конститутивных, так и индуцибельных защитных механизмов с участием Т-киллеров, антител и интерферонов, способствуя формированию длительного напряженного иммунитета [5]. В классическом варианте ДНК-вакцины состоят из плазмидных или вирусных векторов, содержащих гены возбудителей инфекционных заболеваний, продукты которых обладают иммуногенными свойствами. После введения ДНК-вакцины в организм животного белок патогена синтезируется в цитоплазме клеток и стимулирует развитие иммунного ответа. С разработкой таких вакцин связывают большие надежды на повышение эффективности профилактики не только инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии, но и аллергических, аутоиммунных и даже онкологических болезней. Конструирование и биотехнологическое производство ДНК-вакцин являются относительно простыми, кроме того, для иммунизации достаточно небольшого количества препарата, в результате все это позволяет снизить затраты на их создание [6].

Настоящее исследование посвящено созданию генетических конструкций для ДНК-вакцины против ЦВС-2 и выявлению антигенной активности в культуре клеток млекопитающих.

Материалы и методы исследований

Плазмиду pET-ORIP, полученную ранее в лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ, использовали в качестве матрицы, содержащей целевую ОРС капсидного белка цирковируса [7]. Данная плазида сконструирована на основе вектора экспрессии pET-24b (*Novagen*, Австралия), в который введена амплифицированная природная рамка трансляции, кодирующая белок капсида ЦВС-2.

Плазмида pVAX1 (*Invitrogen*, США) выступала в качестве вектора для клонирования области генома ЦВС-2, содержащей полноценный ген белка капсида для экспрессии в клетках млекопитающих.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась на аппарате Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Model 9902) (*Applied Biosystems*, Великобритания) в смеси стандартного состава с использованием Pfu-полимеразы [8]. Дизайн праймеров PCVF-long, PCVF-trunk и PCVrev (синтезированы фирмой «Праймтех», Беларусь) для ПЦР осуществляли с помощью программы *Primer3* [9]. Были подобраны оптимальные временные и температурные параметры циклов амплификации. Первичная денатурация проводилась в течение 5 мин при 94 °С, затем следовали 30 циклов: денатурация – при 94 °С в течение 15 с, отжиг праймеров – при 44 °С в течение 15 с, элонгация – при 72 °С в течение 1,5 мин, заключительная полимеризация – при 72 °С в течение 5 мин.

В работе использовали ферменты рестрикции *Nhe*I, *Hind*III, *Xho*I (*Thermo Fisher Scientific*, США). Рестрикцию осуществляли в условиях, рекомендованных фирмой-изготовителем.

Лигирование производили посредством T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Для клонирования рекомбинантных плазмид использовали бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue F':Tn10(TcR) proA⁺B⁺ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1, gyrA96(NalR) thi hsdR17 (rk⁻mk⁺) glnV44 relA1 lac из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ.

Ca²⁺-зависимую трансформацию клеток *E. coli* XL-1 Blue осуществляли в соответствии со стандартным экспериментальным протоколом [10].

Получение рекомбинантной векторной ДНК из клеток *E. coli*, а также выделение и очистку фрагментов ДНК после реакций амплификации, лигирования, рестрикции и электрофореза осуществляли с помощью наборов GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit и GenJET™ (*Thermo Fisher Scientific*, США), придерживаясь указаний в методике фирмы-производителя.

Исследование экспрессии целевых генов изучали на культурах клеток СПЭВ (перевиваемые клетки эпителия эмбриона свиньи) и НЕК 293Т (перевиваемые клетки почки эмбриона человека). Клетки культивировали в матрасах на ростовой среде DMEM (*Lonza*, Бельгия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (*HyClone*, США), в инкубаторе в течение 24–72 ч при температуре (37 ± 1) °С в атмосфере с объемной долей углекислого газа (5,0 ± 0,5) % и относительной влажностью (75 ± 5) %.

Трансфекцию используемых клеточных линий осуществляли кальций-фосфатным методом по стандартной методике [11]. Клетки засевали в 21 мл полноценной ростовой среды (концентрация – 2–3 · 10⁵ клеток/мл), затем вносили в лунки стерильного 6-луночного планшета для тканевых культур и инкубировали при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂ на протяжении 24 ч (исходя из расчета, что на момент трансфекции конfluence культуры должна быть 25–35 %), после чего проводили трансфекцию. Предварительно нагревали буфер HEPES в концентрации 1 моль/л (pH 7,3), раствор CaCl₂ в концентрации 0,5 моль/л и буфер HEBS 2х до комнатной температуры, затем готовили растворы для трансфекции. Для приготовления реакционной смеси на одну лунку планшета в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл добавляли 10 мкг плазмидного вектора и доводили объем до 100 мкл водой, буфером HEPES в концентрации 1 моль/л, затем добавляли 100 мкл раствора CaCl₂ в концентрации 0,5 моль/л. Тщательно перемешивали полученную смесь. Медленно, по каплям, выливали содержимое первой пробирки в другую стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл буфера HEBS 2х, параллельно тщательно перемешивая раствор аэрацией. Выдерживали раствор на протяжении 30 мин при комнатной температуре, после чего медленно, по каплям, добавляли преципитат на поверхность растущей культуры клеток, перемешивая содержимое планшета круговым движением.

В эксперименте с измененными условиями вместо буферного раствора HEBS использовали HEBS с декстрозой (табл. 1).

Трансфекция клеток коммерческой плазмидой pVAX1/lacZ (*Invitrogen*, США) являлась положительным контролем эксперимента. Контролем роста клеток служили лунки, куда не вносили растворы для трансфекции ДНК. На следующий день заменяли среду, в которой культивируются клетки. При необходимости перед заменой среды проводили глицириновый шок: инкубировали клетки с раствором глицерина в концентрации 15 % в течение 3 мин. Затем продолжали инкубацию культуры на протяжении следующих 72 ч при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Потом удаляли клетки с поверхности планшета, отмывали в фосфатном буфере. Клетки разрушали трехкратным циклом замораживания (на льду в присутствии этанола) и оттаивания (при 37 °С).

Эффективность трансфекции оценивали при помощи β-галактозидазного теста. Данный тест проводили стандартным способом, используя в качестве субстрата ферментативной реакции *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (ОНФГ) [12]. Измеряли оптическую плотность (ОП) с применением спектрофотометра SpectraMax M2 (*Molecular Devices*, США) при длине волны 420 нм.

Таблица 1

Состав буферов

Table 1

Composition of buffers

Состав	Количество	Состав	Количество
Буфер HEBS 2x		Буфер HEBS 2x с декстрозой	
HEPES	1,19 г	HEPES	1,192 г
NaCl	1,636 г	KCl	74,6 мг
Na ₂ HPO ₄	0,0213 г	Декстроза	0,216 г
Дистиллированная вода	100 мл	NaCl	1,636 г
pH	7,0	Na ₂ PO ₄ · 7H ₂ O	4,02 г
		Дистиллированная вода	100 мл
		pH	7,05

Наличие целевого белка определяли с помощью реакции иммуноферментного анализа (ИФА), осуществляемой по стандартной методике [13]. Перед проведением ИФА все пробы доводили до концентрации белка 20 мкг/мл. Предварительно концентрацию белка в используемых образцах измеряли при помощи набора BCA Protein Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific*, США) в соответствии с протоколом производителя. При постановке ИФА использовали сыворотку с антителами к капсидному белку цирковируса свиней Anti-PCV-2 polyclonal antiserum (*Accurate Chemical & Scientific Co.*, США) и вторичные антитела с ферментативной меткой – Goat polyclonal secondary antibody to pig IgG-H & L (HRP) (*Abcam*, Великобритания). Для проявления реакции добавляли субстратную смесь 1-Step TMB-ELISA (*Thermo Fisher Scientific*, США). Оценивали интенсивность окрашивания при помощи спектрофотометра при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля выступали лизаты клеток, которые не подвергались трансфекции. Положительным контролем специфичности используемых антител являлся рекомбинантный очищенный белок капсида ЦВС-2. Реакционную смесь без исследуемых проб использовали для обнуления показателей спектрофотометра.

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

Результаты исследований и их обсуждение

Известно, что ДНК-вакцинная конструкция содержит гены возбудителя заболевания, продукты которых впоследствии будут активировать иммунный ответ. ЦВС-2 имеет единственный структурный белок, формирующий капсидную оболочку и обладающий иммуногенностью при попадании в организм животного-хозяина. В связи с этим на первом этапе разработки ДНК-вакцинной конструкции против ЦВС-2 необходимо было получить нуклеотидную последовательность, кодирующую вирусный белок капсида. Для этого амплифицировали фрагмент ранее созданной конструкции pET-ORIP, который соответствует последовательности белка капсида вируса. Цель амплификации – получение двух вариантов ОРС капсидного белка: кодирующей полноразмерный продукт и укороченной, которая соответствует белку капсида без N-концевой последовательности, содержащей сигнал ядерной локализации (т. е. без первых 30 аминокислотных остатков). Для амплификации указанных ОРС были написаны соответствующие нуклеотидные последовательности двух прямых праймеров и одного обратного (табл. 2).

Полноразмерная ОРС белка капсида ЦВС-2 была амплифицирована с помощью праймеров PCVF-long и PCVrev. Рамка считывания, соответствующая укороченному варианту капсидного белка, амплифицирована прямым праймером PCVF-trunk, сайт отжига для которого находится на 112 нуклеотидов дальше от стартового кодона полноразмерной последовательности, и обратным – PCVrev. При дизайне используемых праймеров в их состав включили навески нуклеотидов, соответствующие дополнительным сайтам рестрикции NheI, HindIII, XhoI и последовательности Козак.

Таблица 2

Основные характеристики разработанных праймеров

Table 2

Basic properties of the designed primers

Праймер	Сиквенс 5' → 3'	Количество нуклеотидов, ед.	Температура плавления, °C	GC, %	Ампликон, п. о.	Сайт рестрикции
PCVF-long	АГТАТГ CTAGCACC ATGGCGACGTAT ACAAGGAG	35	50	40	707	Nhe I
PCVF-trunk	АТТАТАА AGCTT AACATGGGGAGAAG GAAAAATGG	35	49	34	597	Hind III
PCVrev	АТТТТГ CTCGAG TTAAGGGATAAGTGG	27	55	41	—	Xho I

Примечание. Жирным шрифтом выделены последовательности сайтов рестрикции, подчеркиванием – последовательность Козак.

При помощи полимеразной цепной реакции к 5'-концам каждого из двух вариантов ОРС белка ЦВС-2 присоединена последовательность Козак (ACCATGG), окружающая стартовый кодон и важная для инициации трансляции в клетках эукариот, а к 3'-концам добавлен терминирующий кодон (ТАА) [14]. Также в результате амплификации к 5'-концу последовательности, кодирующей полноразмерный капсидный белок, добавлен сайт рестрикции для фермента *Nhe*I, а к 5'-концу укороченного варианта ОРС – *Hind*III. На 3'-концах данных нуклеотидных последовательностей расположен сайт рестрикции для фермента *Xho*I. Полученные ампликоны очищали от посторонних примесей, обрабатывали рестриктазами *Nhe*I либо *Hind*III (в зависимости от типа ОРС) и *Xho*I, а затем по отдельности лигировали с аналогично разрезанным вектором pVAX1 (рис. 1).

Коммерческий плазмидный вектор pVAX1 обеспечивает проникновение, сохранение рекомбинантной ДНК в клетках млекопитающих и содержит регуляторные элементы для эукариотической системы экспрессии генов. Формирование функциональной мРНК продукта возможно благодаря наличию

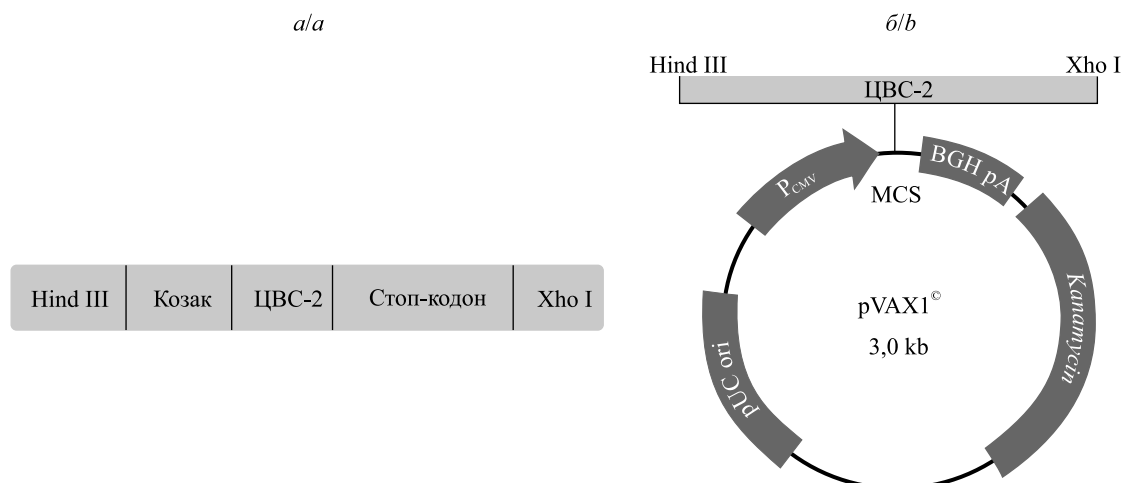


Рис. 1. Схематическое изображение разработанной ДНК-вакцинной конструкции:

а – структура целевой последовательности: *Hind*III, *Xho*I – сайты для рестриктаз, последовательность Козак (ACCATGG), ЦВС-2 – ОРС укороченного капсидного белка цирковируса, стоп-кодон;

б – вектор pVAX1 с клонированной целевой последовательностью:

ЦВС-2 – ОРС укороченного белка капсиды цирковируса, *Hind*III, *Xho*I – сайты рестрикции, использованные для клонирования, P_{CMV} – цитомегаловирусный промотор, MCS – множественный сайт для клонирования генов,

BGH pA – последовательность сигнала полиаденилирования гормона роста быка,

Kanamycin – ген устойчивости к канамицину, pUC ori – точка начала репликации плазмиды pUC

Fig. 1. Schematic depiction of the developed DNA-vaccine construct:

а – structure of the target sequence: *Hind*III, *Xho*I – sites for restriction enzymes, Kozak sequence (ACCATGG), PCV-2 – ORF of the truncated capsid protein of circovirus, stop codon (TAA);

б – vector pVAX1 with the cloned sequence: PCV-2 – ORF of the trunked capsid protein of PCV-2,

*Hind*III, *Xho*I – sites for restriction enzymes, P_{CMV} – cytomegalovirus promoter, MCS – multiple cloning site,

BGH pA – bovine growth hormone polyadenylation signal, *Kanamycin* resistance gene, pUC ori – origin of pUC

в векторе цитомегаловирусного промотора и последовательности сигнала полиаденилирования гена гормона роста быка.

Каждой полученной конструкцией по отдельности проводили Ca^{2+} -зависимую трансформацию клеток *E. coli* XL-1 Blue, а клоны трансформантов проверяли на наличие обоих вариантов целевых ОРС ПЦР-анализом с использованием соответствующих праймеров. На электрофореграмме идентифицированы фрагменты ДНК размером около 700 и 600 п. о., что соответствует размерам областей генома, кодирующих полную и укороченную ОРС капсидного белка ЦВС-2 (рис. 2).

Таким образом, подтверждено получение двух генетических конструкций с ОРС капсидного белка цирковируса свиней на основе вектора pVAX1.

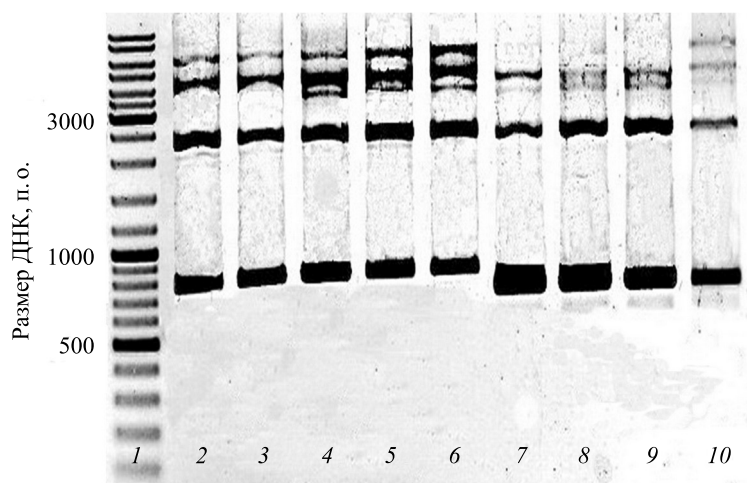


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК после ПЦР-анализа образцов трансформированных клеток: 1 – маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 2–6 – фрагменты полноразмерных ОРС капсидного белка ЦВС-2; 7–10 – фрагменты укороченных ОРС капсидного белка ЦВС-2

Fig. 2. DNA electrophoresis after PCR of transformants: 1 – markers of molecular weight of DNA GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 2–6 – fragments of full-length ORFs of the circovirus capsid protein; 7–10 – fragments of truncated ORFs of circovirus capsid protein

Для проверки функционирования полученных генетических конструкций определяли экспрессию целевых ОРС по наличию капсидного белка вируса ЦВС-2 в культуре клеток млекопитающих. С этой целью вводили плазмидную ДНК в культивируемые клетки млекопитающих методом кальций-фосфатной трансфекции из-за относительной простоты, дешевизны и доступности данного метода. Фосфат кальция облегчает связывание ДНК с поверхностью клетки, благодаря чему возможно проникновение молекулы внутрь [15].

Изначально в исследовании использовали свиную клеточную линию СПЭВ, так как клонированные ОРС должны впоследствии экспрессироваться в организме свиньи. В специальной литературе мало сведений об эффективном способе трансфекции клеток СПЭВ, хотя в некоторых работах указано, что кальций-фосфатный метод является наиболее предпочтительным по сравнению с электропорацией и ДЕАЕ-декстрановым [16].

В связи с этим определяли, подходит ли такая трансфекция для СПЭВ. Пробную трансфекцию проводили с использованием коммерческой плазмиды pVAX1/lacZ с геном β-галактозидазы на двух клеточных линиях: СПЭВ и НЕК 293Т. Человеческая клеточная линия НЕК 293Т выбрана в качестве контроля соблюдения методики кальций-фосфатной трансфекции, которая успешно применяется для данного типа клеток [11]. Эффективность трансфекции проверяли путем спектрофотометрического анализа цветной ферментативной реакции: если β-галактозидаза синтезируется в клетках, то при взаимодействии с соответствующим субстратом наблюдается желтое окрашивание раствора.

Кальций-фосфатную трансфекцию проводили с использованием буферного раствора HEBS, а реакционную смесь перед добавлением к клеткам инкубировали на протяжении 30 мин. Результаты оценки эффективности трансфекции показали, что клетки СПЭВ практически не содержат плазмид, так как показатель ОП в образцах близок к нулевому значению (среднее значение ОП составляет $0,041 \pm 0,01$ ед., $n = 4$). Визуально наблюдалось очень бледно-желтое окрашивание раствора, что указывает на возможную трансфекцию только незначительного количества клеток. В то же время лизаты клеток НЕК 293Т давали в реакции с субстратом ярко-желтое окрашивание, а показатель ОП составил $3,7 \pm 0,425$ ед. ($n = 4$).

Затем в целях улучшения уровня трансфекции клеточной линии СПЭВ кальций-фосфатным методом изменили условия эксперимента. Для этого использовали буферный раствор HEBS, содержащий декстрозу, который применяется для трансфекции клеток животных [17]. Также изменили время, отведенное на образование комплекса ДНК – фосфат кальция, и применили глицериновый шок для клеток, способствующий повышению эффективности поглощения плазмидной ДНК [11]. Результаты проведения трансфекции с измененными условиями представлены в табл. 3 и 4, где указаны средние значения ОП исследуемых образцов (также рассчитано стандартное отклонение).

Таблица 3

Результаты трансфекции клеточной линии СПЭВ с разными условиями эксперимента, ед.

Table 3

Results of the SPEV cell line transfection with different experimental conditions, units

Раствор	Время инкубирования реакционной смеси, мин			
	20	30	40	50
HEBS	0,0103 ± 0,0082	0,0127 ± 0,0009	0,0120 ± 0,0071	0,0084 ± 0,0011
HEBS + глицериновый шок	0,0149 ± 0,0012	0,0154 ± 0,0010	0,0153 ± 0,0084	0,0110 ± 0,0052
HEBS с декстрозой	0,0060 ± 0,0036	0,0110 ± 0,0009	0,0069 ± 0,0012	0,0045 ± 0,0015
HEBS с декстрозой + глицериновый шок	0,0072 ± 0,0014	0,0087 ± 0,0001	0,0190 ± 0,0076	0,0088 ± 0,0029
Клетки без плазмид	0,0088 ± 0,0009			

Экспериментальные данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют об очень низкой эффективности трансфекции клеточной линии СПЭВ. Значения оптической плотности для образцов трансфицированных клеток практически не отличаются от таких же показателей для клеток контроля, куда плазмиды pVAX1/lacZ не вносились.

Таблица 4

Результаты трансфекции клеточной линии HEK 293T с разными условиями эксперимента, ед.

Table 4

Results of the HEK 293T cell line transfection with different experimental conditions, units

Раствор	Время инкубирования реакционной смеси, мин			
	20	30	40	50
HEBS	3,633 ± 0,179	3,828 ± 0,233	3,670 ± 0,230	2,988 ± 0,108
HEBS + глицериновый шок	3,746 ± 0,246	3,890 ± 0,110	3,750 ± 0,165	3,190 ± 0,273
HEBS с декстрозой	0,285 ± 0,018	0,723 ± 0,022	0,618 ± 0,070	0,130 ± 0,090
HEBS с декстрозой + глицериновый шок	0,300 ± 0,088	0,730 ± 0,105	0,720 ± 0,032	0,184 ± 0,050
Клетки без плазмид	0,045 ± 0,016			

Исследование показало, что применение буферного раствора с декстрозой приводит к значительному снижению эффективности трансфекции. При использовании этого раствора также наблюдалось формирование осадка из фосфата кальция на дне лунок планшета. Токсическое воздействие данного раствора исключается, так как в лунках, в которые его вносили, рост клеток не отличался от роста клеток контроля (к которым реакционная смесь не добавлялась). Возможно, такие результаты связаны с наличием примеси неизвестного происхождения или декстроза препятствует взаимодействию преципитата с клетками.

Данные, полученные в ходе проведенных экспериментов, показали, что время инкубирования кальций-фосфатной смеси с ДНК перед добавлением к культуре клеток и действие глицеринового шока не дают значимой для нашей работы разницы в эффективности трансфекции, хотя для инкубирования смеси в течение 50 мин показатель ОП отчетливо ниже. Кроме того, при выдерживании реакционной смеси более 30 мин формируются видимые частицы преципитата, что приводит к снижению эффективности трансфекции.

Таким образом, полученные результаты показали, что для дальнейших исследований с применением методики кальций-фосфатной трансфекции нецелесообразно использовать свиную клеточную линию СПЭВ. Отличие полученных нами данных от приведенных в работе [16], где кальций-фосфатная трансфекция клеток СПЭВ указывалась как предпочтительная (по сравнению с электропорацией и ДЕАЕ-декстрановым методом), может быть связано с использованием в нашей работе другой сублинии СПЭВ. Возможны также изменения некоторых свойств клеточной линии в процессе многократного пассирования.

После проведенных экспериментов можно выделить наиболее оптимальные условия кальций-фосфатной трансфекции клеточной линии НЕК 293Т: использование буферного раствора NEBS, выдерживание реакционной смеси в течение 30 мин перед добавлением к клеткам, применение глицеринового шока. Клетки НЕК 293Т и указанные условия трансфекции применяли при проведении дальнейших исследований.

Клетки НЕК 293Т трансфицировали целевыми генетическими конструкциями с ОРС капсидного белка ЦВС-2. Параллельно проводили контроль трансфекции, используя плазмиду pVAX1/*lacZ*. Лизаты трансфицированных клеток исследовали на наличие капсидного белка цирковируса свиней с помощью иммуноферментного анализа, при этом использовали сыворотку с антителами к капсидному белку цирковируса свиней и вторичные антитела с ферментативной меткой. После завершения реакции ИФА результаты оценивали по спектрофотометрическому измерению образцов лизированных клеток. Полученные средние значения (по нескольким лункам планшета) оптической плотности образцов представлены на рис. 3.

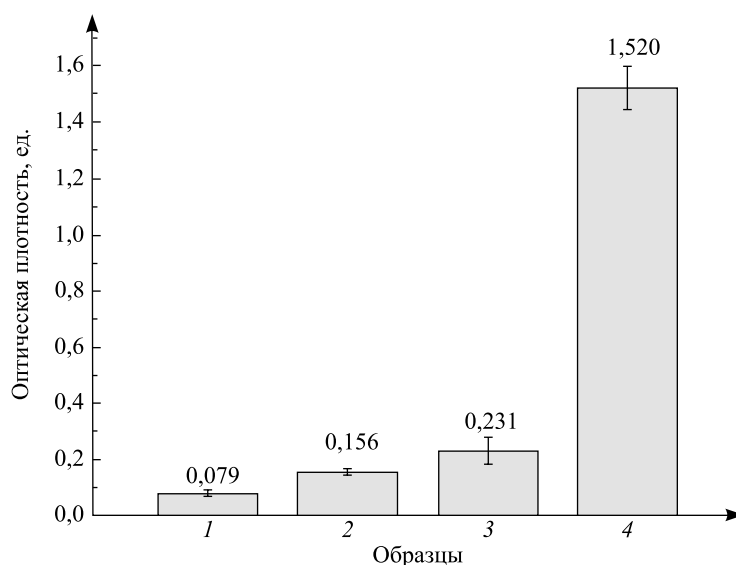


Рис. 3. Уровень сигнала капсидного белка цирковируса свиней в лизатах клеток НЕК 293Т:

- 1 – лизат клеток, не подвергавшихся трансфекции; 2 – лизат клеток, в которые вводились плазмиды с ОРС полноразмерного капсидного белка ЦВС-2; 3 – лизат клеток, в которые вводились плазмиды с ОРС укороченного капсидного белка ЦВС-2; 4 – образец очищенного рекомбинантного белка капсида цирковируса ЦВС-2 (положительный контроль)

Fig. 3. The signal level of the circovirus capsid protein in the lysates of HEK 293T cells:

- 1 – lysate of HEK 293T cells without transfection; 2 – lysate of cells transfected with plasmids carrying full-length PCV-2 capsid protein ORF; 3 – lysate of cells transfected with plasmids carrying truncated PCV-2 capsid protein ORF; 4 – purified recombinant capsid protein of PCV-2 (positive control)

Результаты ИФА показали, что белок капсида ЦВС-2 в лизатах клеток присутствует, хотя его содержание низкое. Поскольку эффективность трансфекции клеток контрольной плазмидой высокая, то на результаты ИФА она не влияет. Возможными причинами низкого уровня сигнала может быть малая концентрация рекомбинантного белка в лизатах, обусловленная слабой экспрессией целевого гена в клетках НЕК 293Т. Однако четко просматривается, что укороченная ОРС экспрессируется с большей эффективностью, нежели нативная.

Заключение

Таким образом, в результате проведенной работы получены две генетические конструкции на основе плазмидного вектора рVAX1: с полноразмерной и с укороченной ОРС капсидного белка ЦВС-2. Экспрессию целевых ОРС, содержащихся в полученных конструкциях, исследовали по наличию белковых продуктов в трансфицированных клетках млекопитающих. Уровень экспрессии укороченного варианта ОРС оказался выше, чем полноразмерного. В целом можно отметить функциональность данных генетических конструкций, так как оба варианта циркувирусного белка детектируются в клетках после трансфекции. Полученные конструкции могут стать основой для создания ДНК-вакцины против ЦВС-2.

Библиографические ссылки

1. Modrow S., Falke D., Truyen U., et al. Molecular Virology. Berlin : Springer, 2013.
2. Knipe D. M., Howley P. M., Meng X.-J. Fields Virology : in 2 vol. Philadelphia : LWW, 2013. Vol. 2 : Specific virus families.
3. Liu Q., Tikoo S. K., Babiuk L. A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 // Virology. 2001. Vol. 285, № 1. P. 91–99.
4. Донник И. М., Петрова О. Г., Исаева А. Г. и др. Клинические признаки заболеваний, ассоциированных с циркувирусной инфекцией свиней и сопутствующие инфекции // Аграр. вестн. Урала. 2013. № 3. С. 20–23.
5. Coban C., Koyama S., Takeshita F., et al. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines // Human Vaccines. 2008. № 4. P. 453–456.
6. Попов Ю. А., Микшиш Н. И. Генетические (ДНК) вакцины // Пробл. особо опасных инфекций. 2010. № 10. С. 20–25.
7. Прокулевич В. А., Кудин К. В. Экспрессия открытой рамки трансляции белка капсида ЦВС-2 в клетках *E. coli* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. : в 5 т. / редкол.: Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. Минск : Беларус. навука, 2013. Т. 5. С. 131–141.
8. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Oxford : BIOS Scientific Publisher, 2000.
9. Primer 3plus [Electronic resource]. 2006. URL: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> (date of access: 20.01.2015).
10. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E. Current protocols in molecular biology. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, 1993. Vol. 1.
11. Martin J. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation // Nucleic acids research. 1996. Vol. 24, № 4. P. 596–601.
12. Enzymatic assay of β -galactosidase [Electronic resource]. 2011. URL: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/bgactosidase73.pdf (date of access: 15.05.2016).
13. Immunoassay and other bioanalytical techniques / ed. by J. M. van Emon. USA : CRC Press, 2007.
14. Pereira V. B., Zurita-Turk M., Saraiva T. D., et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications // World J. of Vaccines. 2014. Vol. 4. P. 50–71.
15. Transfection [Electronic resource]. 2013. URL: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection> (date of access: 03.05.2016).
16. Тугизов Ш. М. Структурно-функциональный анализ мембранных белков вирусов в генетически трансформированных клетках : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.06. М., 1996.
17. Protocol for calcium phosphate transfection of 293T cells [Electronic resource]. 2004. URL: <http://delangelab.rockefeller.edu/protocols.html> (date of access: 03.05.2016).

References

1. Modrow S., Falke D., Truyen U., et al. Molecular Virology. Berlin : Springer, 2013.
2. Knipe D. M., Howley P. M., Meng X.-J. Fields Virology : in 2 vol. Philadelphia : LWW, 2013. Vol. 2 : Specific virus families.
3. Liu Q., Tikoo S. K., Babiuk L. A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*. 2001. Vol. 285, No. 1. P. 91–99.
4. Donnik I. M., Petrova O. G., Isayeva A. G., et al. Klinicheskiye priznaki zabolevaniy assotsirovannykh s tsirkovirusnoy infektsiyey sviney i soputstvuyushchiye infektsii. *Agrarnyy vestnik Urala*. 2013. No. 3. С. 20–23 (in Russ.).
5. Coban C., Koyama S., Takeshita F., et al. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Human Vaccines*. 2008. No. 4. P. 453–456.
6. Popov Yu. A., Mikshish N. I. Genetic (DNA) Vaccines. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2010. No. 10. С. 20–25 (in Russ.).
7. Prakulevich U. A., Kudzin K. V. Expression of the open reading frame of PCV2 capsid protein in *E. coli* cells. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty* : sb. nauchn. tr. : in 5 vol. Minsk : Belaruskaya navuka, 2013. Vol. 5. P. 131–141 (in Russ.).
8. McPherson M. J., Moller S. G. PCR. Oxford : BIOS Scientific Publisher, 2000.
9. Primer 3plus. 2006. URL: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> (date of access: 20.01.2015).
10. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E. Current protocols in molecular biology. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, 1993. Vol. 1.
11. Martin J. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic acids research*. 1996. Vol. 24, No. 4. P. 596–601.

12. Enzymatic assay of β -galactosidase. 2011. URL: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/bgactosidase73.pdf (date of access: 15.05.2016).
13. Van Emon J. M. (ed.). Immunoassay and other bioanalytical techniques. USA : CRC Press, 2007.
14. Pereira V. B., Zurita-Turk M., Saraiva T. D., et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications. *World J. of Vaccines*. 2014. Vol. 4. P. 50–71.
15. Transfection. 2013. URL: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection> (date of access: 03.05.2016).
16. Tugizov Sh. M. Strukturno-funktsionalnyy analiz membrannykh belkov virusov v geneticheski transformirovannykh kletkakh : dissertatsiya... doktora biol. nauk : 03.00.06. Moscow, 1996 (in Russ.).
17. Protocol for calcium phosphate transfection of 293T cells. 2004. URL: <http://delangelab.rockefeller.edu/protocols.html> (date of access: 03.05.2016).

Статья поступила в редколлегию 15.09.2017.
Received by editorial board 15.09.2017.

УДК 577.29:616-006.446.8

СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО СЕГМЕНТ GC-БОГАТОЙ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА *RUNX1-RUNX1T1*

А. А. САВРИЦКАЯ¹⁾, И. Н. ИЛЮШЁНОК¹⁾, В. В. ГРИНЕВ¹⁾

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

Отмечено, что молекулярное клонирование GC-богатых областей генома с помощью полимеразной цепной реакции, равно как и создание на их основе векторных конструкций, может быть нетривиальной задачей. В ходе настоящего исследования осуществлена оптимизация условий амплификации сегмента внутренней промоторной области гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*. Сконструирован многоцелевой лентивирусный вектор второго поколения, несущий вставку данной области. Проанализированы возникшие при работе с целевой последовательностью проблемы и пути их разрешения, на основании чего сформулированы методологические рекомендации по клонированию GC-богатых областей генома.

Ключевые слова: гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1*; молекулярное клонирование; GC-богатая область; полимеразная цепная реакция.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю признательность Александру Александровичу Мигасу (научный отдел РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, г. Минск, Беларусь) за помощь в проведении секвенирования по Сэнгеру.

Авторы А. А. Саврицкая, И. Н. Ильюшёнков внесли равный вклад в работу.

DEVELOPMENT OF THE LENTIVIRAL VECTOR WITH GC-RICH SEGMENT OF THE PROMOTER REGION OF FUSION ONCOGENE *RUNX1-RUNX1T1*

Н. А. SAURYTSKAYA^a, I. M. ILYUSHONAK^a, V. V. GRINEV^a

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

Corresponding author: I. M. Ilyushonak (nov.ilyushonok@gmail.com)

As is known, a PCR-cloning of GC-rich regions and development the vectors with such sequences can be non trivial. In this work we performed an optimization of PCR-amplification protocol for segment of internal promoter region of fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* and developed of multipurpose lentiviral vector with insertion of this sequence. We generalize our experience of dealing with GC-rich sequences in some methodological recommendations.

Образец цитирования:

Саврицкая А. А., Ильюшёнков И. Н., Гринев В. В. Создание лентивирусного вектора, несущего сегмент GC-богатой промоторной области гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 38–44.

For citation:

Saurytskaya H. A., Ilyushonak I. M., Grinev V. V. Development of the lentiviral vector with GC-rich segment of the promoter region of fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 38–44 (in Russ.).

Авторы:

Анна Андреевна Саврицкая – студентка биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Гринев.

Илья Николаевич Ильюшёнков – ассистент кафедры генетики биологического факультета.

Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Hanna A. Saurytskaya, student at the faculty of biology.
anna.kassy.s@gmail.com

Ilya M. Ilyushonak, assistant at the department of genetics, faculty of biology.

nov.ilyushonok@gmail.com

Vasily V. Grinev, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
grinev_vv@bsu.by

Key words: fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*; molecular cloning; GC-rich region; polymerase chain reaction.

Acknowledgements. Authors are sincerely grateful to Alexandr Migas (Department of Research, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus) for assistance in Sanger sequencing.

Authors H. A. Saurytskaya, I. M. Ilyushonak contribution is equal.

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – группа неопластических заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом популяции незрелых и аномально дифференцированных лейкоцитов, проникающих в костный мозг, кровяное русло, образующих инфильтраты в других органах и тканях [1]. Наиболее часто встречающаяся цитогенетическая аномалия, ассоциированная с ОМЛ, – транслокация $t(8;21)(q22;q22)$, которая фиксируется в 4–12 % случаев *de novo* ОМЛ у взрослых и 12–30 % случаев *de novo* ОМЛ у детей [2], а также в образцах здоровых доноров [3; 4]. Результат этой аномалии – образование гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, являющегося одним из драйверов малигнизации клеток крови при ОМЛ; тем не менее механизмы, вовлекающие его в лейкозогенез, остаются дискуссионными. Экспрессия этого онкогена находится под контролем двух канонических промоторов гена *RUNX1*. Оба промотора остаются активными в лейкозных бластах, причем большая часть мРНК транскрибируется в области внутреннего промотора [5]. Показано, что эти промоторы важны для нормального функционирования *RUNX1* в ходе эмбриогенеза, однако неизвестно, играют ли они какую-либо роль в процессах малигнизации клетки, ассоциированных с гибридным онкогеном. Существуют также свидетельства наличия у гибридного онкогена неаннотированных промоторных областей [6].

Удобным инструментом, позволяющим пролить свет на указанные выше неясности, являются генно-инженерные манипуляции с малигнизированными клетками. В частности, при помощи системы CRISPR возможно осуществить избирательное подавление транскрипции с интересующего нас промотора. Активность предсказанной промоторной области можно верифицировать, клонировав ее в состав вектора в качестве промотора для репортерного гена. Экспрессию гибридного онкогена (или его отдельных изоформ) можно подавить с помощью РНК-интерференции.

Однако практически в любых генно-инженерных экспериментах нам потребуется положительный контроль – векторная конструкция, несущая экспрессионную кассету с промотором, активным в лейкозных клетках. Хороший кандидат на роль такого промотора – внутренний промотор гибридного онкогена; помимо выполнения функции положительного контроля он также может быть полезен для оценки эффективности блокирования транскрипции с помощью системы CRISPR. Удобным целевым вектором для клонирования такой системы является векторная система на основе лентивируса. Исследовательский опыт, накопленный авторами, свидетельствует о том, что подобные системы способны с высокой эффективностью осуществлять трансгенез лейкозных клеток. Стоит, однако, заметить, что создание указанного вектора не является тривиальной задачей, поскольку внутренний промотор *RUNX1-RUNX1T1* локализован в одной из самых крупных GC-богатых областей человеческого генома.

Материалы и методы исследований

Работа с клеточными культурами. Клетки модельной клеточной линии острого миелоидного лейкоза Kasumi-1 культивировались в полноценной среде RPMI-1640 (Lonza, Швейцария), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, при температуре 37 °C и 5 % концентрации CO₂ в атмосфере. Культура бактерий *E. coli* XL-1 Blue выращивалась на плотной питательной среде LB по стандартной методике.

Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Выделение геномной ДНК из клеток Kasumi-1 осуществлялось методом высаливания [7], в последующем 200 нг этой ДНК использовались в качестве матрицы при постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* осуществлялось стандартным методом щелочного лизиса. Очистка фрагментов ДНК из агарозного геля выполнялась при помощи набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва).

Полимеразная цепная реакция. Для каждой из использованных нами полимераз готовился двукратный премикс, содержащий, кроме самого фермента, специфический буфер и дезоксирибонуклеотидтрифосфаты в концентрациях, указанных производителем (Thermo Fisher Scientific, Литва). Праймеры использовались в конечной концентрации 300 нмоль/л. Более детально схемы различных ПЦР рассмотрены в разделе «Результаты исследований и их обсуждение».

Молекулярное клонирование. Для аденилирования 3'-концов продукта ПЦР готовились 10 мкл реакционной смеси, содержащей 200 нг ДНК, 0,2 ммоль/л дезоксиаденилтрифосфата и 1 ед. ДНК-полимеразы

DreamTaq (*Thermo Fisher Scientific*, Литва) в соответствующем буфере, после чего данная смесь прогревалась при 72 °С в течение 20 мин. Далее, фрагмент лигировался в промежуточный Т-вектор pTZ57R/T в буфере DreamTaq-полимеразы с добавлением аденозинтрифосфата (АТФ). Рестрикция и лигирование в лентивирусный вектор осуществлялись в соответствии с рекомендациями производителя реагентов (*Thermo Fisher Scientific*, Литва). Трансформация компетентных клеток *E. coli* XL-1 Blue проводилась с помощью Transform Aid Bacterial Transformation Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Литва).

ПЦР-скрининг бактериальных трансформантов. Изолированные колонии трансформантов рассеивались на плотную агаризованную питательную среду методом истощающего штриха и прорастивались в течение ночи при 37 °С. Далее, изолированную бактериальную колонию переносили в 10 мкл охлажденной на ледяной бане деионизированной воды и прогревали при 98 °С в течение 10 мин. В дальнейшем 1 мкл указанной смеси использовался в качестве матрицы при постановке ПЦР.

Результаты исследований и их обсуждение

Определение границ полноразмерной промоторной области и попытка ее клонирования. На первом этапе работы нами были установлены предполагаемые границы интересующего нас промоторного региона гибридного онкогена. Термином «промоторный регион» здесь и далее обозначается сегмент ДНК, обладающий промоторной активностью и включающий области кор-промотора с классическими регуляторными элементами, такими как ТАТА-бокс, а также смежные области, несущие сайты посадки транскрипционных факторов и *цис*-регуляторные элементы (энхансеры и сайленсеры) при их наличии.

С помощью базы данных промоторов млекопитающих MPromDB [8] нами получены координаты границ предсказанной промоторной области. Она была локализована в координатах chr21:34886843-34889690 (сборка генома человека GRCh38) и имела размер 2848 п. о. Данная область перекрывается с одной из крупнейших GC-богатых областей в геноме человека [9]. Для ее клонирования нами были опробованы несколько вариантов ПЦР-амплификации: 1) амплификация со «стандартными» (фланкирующими последовательность) праймерами; 2) амплификация с длинными (70 п. о.) мегапраймерами, фланкирующими последовательность; 3) тагдаун ПЦР (понижение температуры отжига с 63 до 58 °С с 2 циклами амплификации на каждый градус и 20 циклами амплификации при 58 °С) со «стандартными» праймерами. Для повышения специфичности также использовался диметилсульфоксид (ДМСО) в различных концентрациях. Однако указанная стратегия клонирования не принесла ожидаемых результатов.

Поиск минимального сегмента, обладающего промоторной активностью, и подбор условий для его амплификации. Поскольку попытка клонирования крупной GC-богатой области оказалась безуспешной, было решено клонировать ее сегмент меньшего размера, сохраняющий при этом промоторную активность. Согласно литературным данным [10] таким сегментом выступает область с координатами [–190, +111] по отношению к 1 нуклеотиду экзона 4а; она имеет хромосомные координаты chr21:34888583-34888883. Несмотря на то что последовательность также является GC-богатой (более 70 % GC-оснований), ее размер значительно меньше исходной области, что облегчает задачу клонирования. Нами были сконструированы праймеры для амплификации данного сегмента ДНК: прямой (5'-CGGGCTGCGTACAGTAGC-3') и обратный (5'-ACTTCSTTCTGGCGTCCCTAG-3'). Длина ампликона составила 328 п. о.

Проведенная нами комплексная оптимизация условий амплификации включала как варьирование параметров ПЦР-программы, так и испытание различных параметров реакционной смеси. Эффективность амплификации оценивалась по воспроизводимости, выходу целевого продукта и наличию неспецифических продуктов.

В исследовании использовались два типа полимераз: DreamTaq и Phusion High Fidelity (HF) (*Thermo Fisher Scientific*, Литва), и для HF-полимеразы, помимо обычного буфера, применялся специальный буфер для амплификации GC-богатых матриц. Также в реакцию с DreamTaq-полимеразой дополнительно вводился ДМСО в концентрации от 1 до 5 %. Как выяснилось, амплификация в стандартных буферах с DreamTaq- и HF-полимеразой не позволяет получить целевой фрагмент. Использование диметилсульфоксида при амплификации с DreamTaq дает возможность получить детектируемый целевой продукт, однако его выход и воспроизводимость реакции низкие. Максимальный выход продукта наблюдался при использовании HF-полимеразы в сочетании с буфером для амплификации GC-богатых последовательностей (рис. 1, а).

Кроме того, использование HF-полимеразы в специальном буфере позволяет добиться максимальной воспроизводимости реакции. Указанные выше результаты достигаются при следующих условиях реакции: первичная денатурация составляет 98 °С в течение 1 мин, денатурация равна 98 °С в течение 10 с, отжиг праймеров осуществляется при 62 °С в течение 10 с, элонгация – при 72 °С в течение 10 с.

В данном протоколе время денатурации и отжига праймеров было сильно сокращено в сравнении со стандартными условиями амплификации. Это обеспечило защиту ДНК от депуринизации, происходящей при высоких температурах, и снижение количества неспецифических продуктов за счет сокращения времени отжига.

Клонирование целевого фрагмента в промежуточный вектор и секвенирование. В качестве промежуточного вектора для клонирования и секвенирования целевого фрагмента был избран вектор для ТА-клонирования pTZ57R/T, являющийся частью специализированного набора InsTAclone PCR Cloning Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Литва). С учетом того что HF-полимераза не оставляет на 3'-концах ПЦР-продукта непарных адениновых нуклеотидов, по которым осуществляется клонирование в вектор, выделенный из агарозного геля целевой фрагмент подвергался обработке DreamTaq-полимеразой в присутствии АТФ. ПЦР-скрининг клонов на наличие вставки проводился с применением специфических для вставки праймеров и HF-полимеразы, поскольку амплифицировать фрагмент с помощью DreamTaq, даже используя целевой ПЦР-продукт в качестве ДНК-матрицы, нам не удалось.

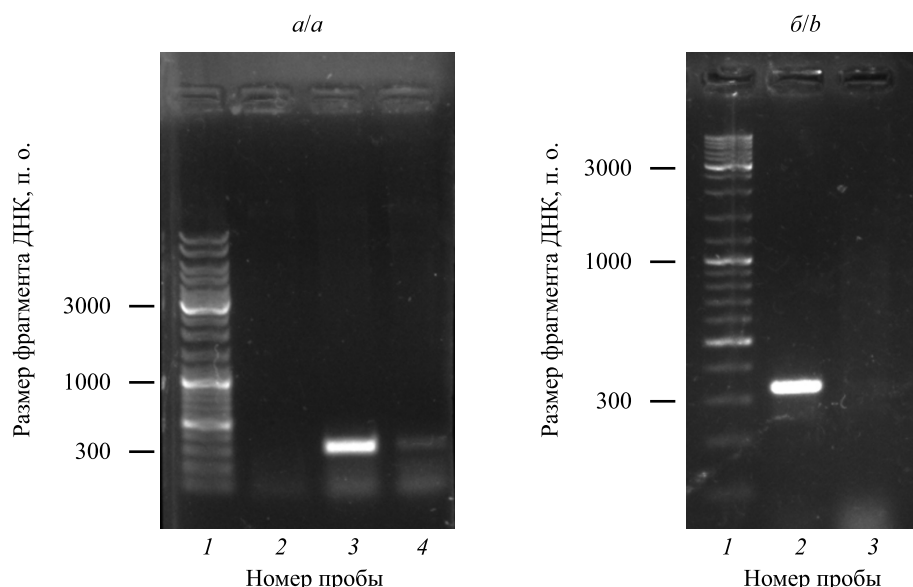


Рис. 1. Оптимизация условий ПЦР-амплификации:

a – подбор оптимального состава ПЦР-смеси для амплификации целевой области. Дорожка 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва), дорожка 2 – стандартная амплификация с DreamTaq-полимеразой, дорожка 3 – амплификация с HF-полимеразой в буфере для амплификации GC-богатых последовательностей, дорожка 4 – амплификация с DreamTaq-полимеразой с добавлением 3 % ДМСО;

б – оптимизация протокола ПЦР-скрининга бактериальных трансформантов. Дорожка 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва), дорожка 2 – амплификация на лизате бактерий, приготовленном в заранее прогретом амплификаторе, дорожка 3 – амплификация на лизате бактерий, приготовленном в амплификаторе без предварительного нагрева

Fig. 1. Optimization of PCR conditions:

a – optimisation of PCR mixture composition. Lane 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Lithuania), lane 2 – standard PCR with DreamTaq polymerase, lane 3 – PCR with Phusion High Fidelity polymerase in GC-buffer, lane 4 – PCR with DreamTaq polymerase and 3 % DMSO;

b – optimization of PCR protocol for screening of bacterial transformants. Lane 1 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Lithuania), lane 2 – preparation of bacterial lysate with amplification preheat, lane 3 – preparation of bacterial lysate without amplification preheat

Скрининг рекомбинантных плазмид проводился с бактериальными лизатами, полученными путем прогревания клеточных суспензий при 98 °C. Как мы установили, «узким» местом данной методики является момент переноса клеточной суспензии с ледяной бани в амплификатор или горячую водяную баню – их необходимо прогреть до рабочей температуры заранее, так как даже кратковременное пребывание образца при комнатной температуре приводит к значительному снижению выхода целевого продукта, что отражено на рис. 1, б.

Из обнаруженных таким образом клонов выделяли плазмидную ДНК, после чего проводили секвенирование вставки методом Сэнгера. Результаты секвенирования подтвердили образование неспецифических продуктов в ходе реакции: как оказалось, половина из секвенированных клонов содержат близкую к целевому ампликону по размеру вставку постороннего фрагмента ДНК, несмотря на геле-электрофорезную очистку. Тем не менее нам удалось обнаружить вектор, несущий целевой фрагмент без нуклеотидных замен.

Клонирование целевого фрагмента в лентивирусный вектор доставки. В качестве основы для создания целевого вектора использовался лентивирусный вектор второго поколения pHR-SINcPPT-SIEW. Он является частью трехкомпонентной системы, в которую также входят вектор pMD2.G, кодирующий белковую часть гликопротеина VSV-G вируса везикулярного стоматита, и пакующий вектор pCMV_dR8.91, кодирующий полипептид gag-pol [11]. Его запаковываемая в вирусные частицы область фланкирована немодифицированными длинными концевыми повторами (5'-LTR и 3'-LTR) с делетированной U3-областью (рис. 2). Она содержит: Ψ-последовательность – сигнал упаковки, перекрывающийся с первыми 350 нуклеотидами гена *gag*, рамка считывания которого закрыта синтетическим стоп-кодоном (GaG SL4, на рис. 2 обозначена как Ψ-область); RRE – элемент, ответственный за связывание с белком rev; cPPT – центральный полипуриновый тракт; *eGFP* – маркерный ген, кодирующий зеленый флуоресцирующий белок и находящийся под контролем конститутивного промотора PSFFV вируса Френд.

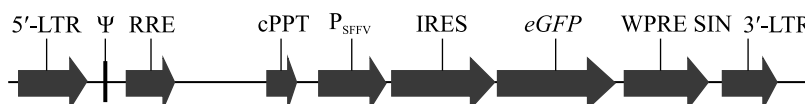


Рис. 2. Схема пакующей области вектора pHR-SINcPPT-SIEW

Fig. 2. The scheme of packed region of pHR-SINcPPT-SIEW vector

Согласно дизайну эксперимента промотор PSFFV целевого вектора удаляется с помощью рестриктазы *EcoRI* и заменяется исследуемым сегментом ДНК, под контролем которого оказывается ген, кодирующий белок *eGFP*, отделенный от промоторного региона областью IRES. Наличие IRES позволяет сохранять открытую рамку считывания маркерного гена *eGFP* неизменной и поддерживать его функциональность: даже если бы в составе промоторного региона нами был клонирован стартовый кодон (что весьма вероятно при клонировании крупной области, предсказанной биоинформатически), трансляция мРНК *eGFP* все равно начнется с IRES, следовательно, белок не получит добавочных аминокислот с N'-конца.

Скелет вектора, полученный после обработки pHR-SINcPPT-SIEW *EcoRI*, имел размер 9683 п. о. Он лигировался с фрагментом длиной 352 п. о., полученным после обработки промежуточного вектора рестриктазами *XbaI* и *SalI*. Трансформация клеток *E. coli* и приготовление бактериальных лизатов для скрининга на этом этапе осуществлялись, как описано выше. Для ПЦР-скрининга были использованы обратный праймер к последовательности IRES и один из праймеров, направленных на вставку, что дало возможность не только обнаружить целевую вставку, но и определить ее ориентацию. Ампликон в таком случае частично включает в свой состав последовательность IRES и имеет размер порядка 500 п. о. (рис. 3).

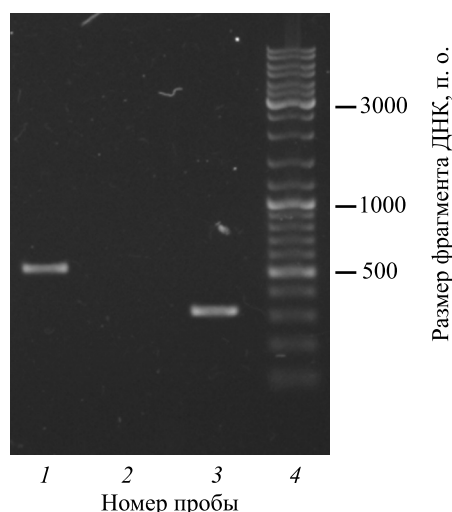


Рис. 3. Скрининг трансформантов, несущих целевой вектор со вставкой в нужной ориентации: дорожка 1 – проверка клона на наличие вставки с прямой ориентацией; дорожка 2 – проверка клона на наличие вставки с обратной ориентацией; дорожка 3 – положительный контроль, амплификация на матрице промежуточного вектора с праймерами ко вставке; дорожка 4 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва)

Fig. 3. PCR screening of bacterial clones with target vector:

lane 1 – PCR detection of target fragment in direct orientation; lane 2 – PCR detection of target fragment in reverse orientation; lane 3 – a positive control with the intermediate vector, containing the target sequence; lane 4 – GeneRuler Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Lithuania)

Заключение

Поставленная задача по созданию многоцелевого вектора, несущего вставку GC-богатой области промотора гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, была нами успешно реализована. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что молекулярное клонирование GC-богатых фрагментов ДНК может представлять серьезные трудности, связанные, по-видимому, с неспецифической посадкой праймеров, образованием вторичных структур, препятствующих продвижению полимеразы, а также с депуринизацией матрицы под действием высоких температур.

Решить указанные проблемы достаточно трудно, однако использование ряда методических приемов позволяет достичь необходимого результата даже при работе с последовательностями высокой сложности. Среди таких приемов – максимальное снижение длины ампликона, сокращение продолжительности этапов денатурации, отжига и элонгации (вплоть до 10–15 с), использование специализированных буферных систем и добавок, таких как ДМСО. Праймеры, предназначенные для ПЦР-амплификации целевой области, должны иметь сайты посадки в областях с минимальным количеством GC-нуклеотидов. При отсутствии сайтов посадки подходящего размера следует разместить в областях со сниженным содержанием GC-праймеров хотя бы 3'-концы праймеров. Полезным, несмотря на отсутствие эффекта в нашем случае, может быть тагдаун ПЦР.

Тем не менее даже строгое следование указанным рекомендациям не гарантирует подбора максимально эффективного протокола амплификации и тем более успешной его адаптации для другого типа полимеразы. В последнем случае будет невозможно осуществить высокоточный синтез целевого фрагмента (если протокол оптимизирован для обычной Taq-полимеразы) либо потребуются проводить промежуточные ПЦР-скрининги, используя более дорогой фермент (при оптимизации для высокоточной ДНК-полимеразы).

На основании вышеизложенного уже во время разработки общего плана исследования этапа клонирования GC-богатой области необходимо уделить пристальное внимание – заранее определить возможные проблемы, пути оптимизации условий амплификации, подготовить необходимые для этого реагенты и выделить достаточно времени. Это поможет добиться необходимого результата в сжатые сроки, не выходящие за рамки запланированных в исследовательском проекте.

Библиографический список

1. Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D. Acute Myeloid Leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2015. Vol. 373, № 12. P. 1136–1152.
2. Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications // *Oncogene*. 2008. Vol. 27, № 44. P. 5759–5773.
3. Basecke J., Cepek L., Mannhalter C., et al. Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia // *Blood*. 2002. Vol. 100, № 6. P. 2267–2268.
4. Mori H., Colman S. M., Xiao Z., et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99, № 12. P. 8242–8247.
5. Markova E. N., Kantidze O. L., Razin S. V. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line // *Gene*. 2012. Vol. 510, № 2. P. 142–146.
6. Migas A. A., Mishkova O. A., Ramanouskaya T. V., et al. RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells // *Leuk. Res.* 2014. Vol. 38, № 9. P. 1102–1110.
7. Sambrook J., Russel W. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA // *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 1. P. 524–580.
8. Gupta R., Wikramasinghe P., Bhattacharyya A., et al. Annotation of gene promoters by integrative data-mining of ChIP-seq Pol-II enrichment data // *BMC Bioinformatics*. 2010. 11 (Suppl. 1): S65.
9. Levanon D., Glusman G., Bangsow T., et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1 // *Gene*. 2001. Vol. 262. P. 23–33.
10. Ghazi M. C., Bernstein Y., Negreanu V., et al. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. Vol. 93, № 5. P. 1935–1940.
11. Гринев В. В., Радишевская А. А., Хейденрайх О. Эффективный перенос трансгена в лейкозные клетки человека с помощью лентивирусного вектора второго поколения // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География*. 2008. № 3. С. 82–86.

References

1. Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015. Vol. 373, No. 12. P. 1136–1152.
2. Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications. *Oncogene*. 2008. Vol. 27, No. 44. P. 5759–5773.
3. Basecke J., Cepek L., Mannhalter C., et al. Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2002. Vol. 100, No. 6. P. 2267–2268.

4. Mori H., Colman S. M., Xiao Z., et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99, No. 12. P. 8242–8247.
5. Markova E. N., Kantidze O. L., Razin S. V. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line. *Gene*. 2012. Vol. 510, No. 2. P. 142–146.
6. Migas A. A., Mishkova O. A., Ramanouskaya T. V., et al. RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21) (q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* 2014. Vol. 38, No. 9. P. 1102–1110.
7. Sambrook J., Russel W. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 1. P. 524–580.
8. Gupta R., Wikramasinghe P., Bhattacharyya A., et al. Annotation of gene promoters by integrative data-mining of ChIP-seq Pol-II enrichment data. *BMC Bioinformatics*. 2010. 11 (Suppl. 1): S65. DOI: 10.1186/1471-2105-11-S1-S65.
9. Levanon D., Glusman G., Bangsow T., et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene*. 2001. Vol. 262. P. 23–33.
10. Ghazi M. C., Bernstein Y., Negreanu V., et al. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. Vol. 93, No. 5. P. 1935–1940.
11. Grinev V. V., Radziskeuskaya A. A., Heidenreich O. Effective transgene transfer to human leukemic cells with the second generation lentiviral vector. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2008. No. 3. P. 82–86 (in Russ.).

Статья поступила в редакцию 15.09.2017.

Received by editorial board 15.09.2017.

УДК 579.841

РАЗРАБОТКА ОБЩЕЙ КОНЦЕПЦИИ РЕГУЛИРУЕМОЙ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА ШИКИМАТКИНАЗЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ШИКИМАТНОГО ПУТИ У БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

ЮЙ ЧАО¹⁾, М. Ю. ШОНИНА¹⁾, А. В. ЛАГОДИЧ¹⁾

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

Показана возможность трансформации штаммов *B. subtilis*, перспективных для создания штаммов-продуцентов шикимовой кислоты. Получены исходные ампликоны для создания генетических конструкций, предназначенных для интеграции в состав бактериальной хромосомы. Среди ампликонов выявлен генетический полиморфизм, который может являться следствием мутагенеза, используемого при получении штаммов – продуцентов триптофана. На основе метода полимеразной цепной реакции разработана система для быстрого скрининга трансформантов на наличие рекомбинационных перестроек генома и интегративной конструкции в составе бактериальной хромосомы трансформированного штамма.

Ключевые слова: трансформация; интеграция; инаktivация; шикимовая кислота; шикиматкиназа; ПЦР-скрининг; *Bacillus subtilis*.

DESIGN OF THE GENERAL CONCEPT OF REGULATED INACTIVATION OF THE GENE SHIKIMATKINASE FOR MODIFICATION OF THE SHIKIMAT WAY IN BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*

Yu CHAO^a, M. Y. SHONINA^a, A. V. LAHODZICH^a

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

Corresponding author: A. V. Lahodzich (lagodichav@bsu.by)

In this work demonstrated the possibility of the transformation strains of *B. subtilis* used to create strains-producers of shikimic acid. For 6 strains of *B. subtilis*, with the ability to increased synthesis of tryptophan, produced amplicons region of the genome containing genes *tmrB* and *aroI*. RFLP-analysis of the received amplicons showed their genetic polymorphism, which may be the result of mutagenesis used when receiving strains-producers of tryptophan. Based on the PCR method designed a system for fast screening of transformants for the presence of recombination and genome rearrangements presence integrative structure comprising bacterial strains used chromosomes from transformants.

Key words: transformation; integration; inactivation; shikimic acid; shikimatkinase; PCR-screening; *Bacillus subtilis*.

Образец цитирования:

Юй Чао, Шонина М. Ю., Лагодич А. В. Разработка общей концепции регулируемой инаktivации гена шикиматкиназы для модификации шикиматного пути у бактерий *Bacillus subtilis* // Журн. Беларус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 45–53.

For citation:

Yu Chao, Shonina M. Y., Lahodzich A. V. Design of the general concept of regulated inactivation of the gene shikimatkinase for modification of the shikimat way in bacteria *Bacillus subtilis*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 45–53 (in Russ.).

Авторы:

Юй Чао – аспирант кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Лагодич.

Мария Юрьевна Шонина – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Лагодич.

Алексей Викторович Лагодич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Yu Chao, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

cygoodluck1989@gmail.com

Maria Y. Shonina, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

shonina89@gmail.com

Aliaksei V. Lahodzich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

lagodichav@bsu.by

Введение

Создание новых безопасных, малотоксичных, низкодозных и в то же время весьма эффективных медицинских препаратов на основе доступного сырья – одна из главных задач современной фармацевтической и медицинской химии [1]. По этой причине весьма целесообразными являются поиск альтернативных источников этого сырья и модификация существующих способов его получения.

Шикимовая кислота, благодаря своим хиральным свойствам, находит широкое применение в фармацевтической и косметической промышленности и служит ключевым соединением, используемым при синтезе ряда препаратов, применяемых для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых штаммами вируса гриппа [2–4]. На основе шикимовой кислоты синтезируются вещества, активно используемые при химиотерапии раковых заболеваний [1]. Производные шикимовой кислоты – монопальмитилоксишикимовая и триацетилшикимовая кислоты – обладают антикоагулянтной и антитромботической активностью и снижают свертываемость крови при внутримышечном введении [5].

У растений и микроорганизмов шикимовая кислота является предшественником большого числа различающихся в функциональном отношении первичных и вторичных метаболитов, таких как ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан), лигнин, фолиевая кислота, тетрациклин, убихиноны, фенольные и карболовые соединения, алкалоиды [6; 7], поэтому многие ее производные представляют интерес для сельского хозяйства и используются в качестве гербицидов и антибактериальных средств. Их применение основано на способности блокировать шикиматный путь у организмов указанных систематических групп без негативного эффекта для млекопитающих и человека [8].

Высокая востребованность шикимовой кислоты для получения различных медицинских препаратов, а также наличие широкого круга потенциальных областей применения обуславливают постоянный поиск и апробацию различных способов ее получения [9].

Цель настоящей работы – изучение возможности модификации шикиматного пути у бактериальных штаммов *B. subtilis*, обладающих способностью к повышенному синтезу триптофана, и разработка стратегии для получения на их основе продуцентов шикимовой кислоты.

Материалы и методы исследований

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использовали бактериальные штаммы – *E. coli* DH5a [10] и XL-1 Blue [11], типовой штамм *B. subtilis* – 168 trpC2 [12], штаммы из коллекции кафедры генетики биологического факультета БГУ, характеризующиеся повышенным уровнем синтеза триптофана, – *B. subtilis* КМБУ 2003, *B. subtilis* ВКПМ 5434, *B. subtilis* ВНИИ Генетика-15 [13] и производные последнего – C10, D3 и D4, полученные путем ступенчатого мутагенеза данного штамма и последующего отбора мутантов, резистентных к структурным аналогам триптофана (уровень продукции L-триптофана составляет 10–12 г/л), плазмиды pLAV1, pAL1 и pAL2 [14].

Среды и реактивы. Бактериальные культуры выращивали в жидких и на плотных питательных средах различного состава LB [15] либо в минимальной среде Spizizen [12]. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара, источником углерода служила глюкоза в конечной концентрации 0,2 % (для бактерий *E. coli*) и 0,5 % (для *B. subtilis*). Аминокислоты, основания и витамины добавляли в концентрации 20; 10 и 1 мкг/мл соответственно.

В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков «Хлорамфеникол» в концентрации 5–15 мкг/мл и «Ампициллин» в концентрации 50–100 мкг/мл (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь). Препарат «Ампициллин» растворяли в стерильной воде, «Хлорамфеникол» – в 96 % этиловом спирте. IPTG и б-галактозидазу (*Thermo Fisher Scientific*, Литва) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя и использовали в концентрации 500 ммоль/л и 50 мкг/мл соответственно.

Методы исследований. Рестрикцию ДНК осуществляли в условиях, рекомендуемых изготовителями ферментов (*Thermo Fisher Scientific*, Литва, и *Jena Bioscience*, Германия). В качестве реперной ДНК при определении размеров рестрикционных фрагментов использовали синтетические реперы: DNA Ladder Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Литва) и 1 kb ДНК-репер («Праймтех», Беларусь). Для определения концентрации препаратов ДНК использовали Lambda DNA/HindIII Marker, 2 либо Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (*Thermo Fisher Scientific*, Литва).

Плазмидную ДНК из бактерий *E. coli* и *B. subtilis* выделяли методом щелочного лизиса [16], для получения препарата плазмид из клеток бактерий *B. subtilis* культуру плазмидсодержащих бактерий выращивали при 30 °С.

Тотальную ДНК исследуемых бактерий выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции.

Трансформацию клеток бактерий *E. coli* и *B. subtilis*, предварительно переведенных в состояние компетентности, проводили согласно рекомендациям, приведенным в руководстве [15] и работах [12; 21]. Трансформацию штаммов *B. subtilis*, обладающих повышенным уровнем синтеза триптофана, выполняли по модифицированной методике, для чего использовали 100–150 нг плазмидной ДНК.

При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реактивов производства «Праймтех» (Беларусь) либо набор реактивов *Thermo Fisher Scientific* (Литва) и амплификаторы производства *Thermo Hybaid* (США) и *Life Pro Thermal Cycler Bioer Serves Life* (Китай). Фрагмент бактериальной хромосомы *B. subtilis*, содержащий гены *tmrB* и *aroI*, амплифицировали с помощью двух пар альтернативных праймеров. Для пары ShikF-NotI и ShikR-BamHI применяли следующие режимы амплификации: 94 °C, выдержка – 5 мин (один цикл); 94 °C – 30 с, 52 °C – 30 с, 68 °C – 2 мин (10 циклов); 94 °C – 30 с, 54 °C – 30 с, 68 °C – 2 мин (20 циклов); 72 °C – 10 мин. Праймеры содержали на 5'-концах сайты для рестриктаз NotI и BamHI соответственно.

Для пары ShikF1-EcoRI и ShikR2-SacII использовали следующие режимы амплификации: 94 °C, выдержка – 5 мин (один цикл); 94 °C – 30 с, 55 °C – 10 с, 54 °C – 25 с, 68 °C – 2 мин (10 циклов); 94 °C – 30 с, 54 °C – 30 с, 68 °C – 1 мин 30 с (25 циклов); 72 °C – 5 мин. Праймеры содержали на 5'-концах сайты для рестриктаз EcoRI и SacII соответственно.

Таблица 1

Характеристика праймеров, используемых для амплификации фрагмента бактериальной хромосомы *B. subtilis*, содержащего гены *tmrB* и *aroI*

Table 1

Characterization of primers used to amplify a fragment of the *B. subtilis* bacterial chromosome containing the genes *tmrB* and *aroI*

Название праймера	Последовательность 5'–3'	Температура плавления (T_m), °C	Доля GC, %
ShikF-NotI	<u>GCGGCC</u> <u>GCC</u> ATT AGT GTA AAG TGG TGA AC	53/61/52 (64/73/64)	43 (55)
ShikR-BamHI	ccGGAT <u>CCG</u> CCC AGA GAT ACG ATT TTG	54/61/55 (63/71/63)	52 (56)
ShikF1-EcoRI	gGAATTC <u>CGG</u> TAT GTA TCT GTC AGA GAA G	53/60/52 (60/69/59)	45 (45)
ShikR2-SacII	cCCGCG <u>GGC</u> CAC TTT TGA ATT GTG CTT GT	53/61/55 (60/69/59)	43 (45)

Примечание. В последовательности праймеров использованы следующие обозначения: подчеркивание – сайт распознавания рестриктазы; полужирный шрифт с разбивкой на триплеты – комплементарные участки области первичной посадки праймера; строчные буквы – нуклеотиды, необходимые для успешной работы используемых ферментов рестрикции. Числовые значения температуры плавления рассчитаны простым методом (с корректировкой по концентрации солей) по алгоритму ближайших соседей. Значения температуры плавления и доли GC, указанные в скобках, приведены для области вторичной посадки праймера.

При разработке праймеров использовали программные возможности интернет-ресурсов: *Олигокалькулятор* (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>), *BLASTP2.2.1* и *Gene Bank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Химический синтез праймеров производился компанией «Праймтех» (Беларусь).

Результаты исследований и их обсуждение

Перспективность использования бактерий *B. subtilis* для получения шикимовой кислоты объясняется рядом свойств, уже позволивших им найти широкое применение в различных отраслях биотехнологического производства [17]. Бактерии *B. subtilis* традиционно используются в микробиологической и пищевой промышленности, они безопасны с точки зрения экологических требований и имеют статус GRAS (generally regarded as safe), хорошо изучены в генетическом отношении [18; 19].

Основные методы получения штаммов – продуцентов *B. subtilis* разделяются, во-первых, по способу получения рекомбинантных бактерий – векторные молекулы могут вводиться за счет трансформации (электропорации) или путем слияния протопластов; во-вторых, по способу поддержания и локализации генетического материала – за счет клонирования в составе плазмидного вектора или интеграции в хромосому. При этом конечный продукт может накапливаться внутриклеточно или секретироваться во внешнюю среду. Но независимо от способа получения штамма, локализации детерминант, определяющих его важнейшие коммерческие свойства, существуют универсальные правила, используемые при конструировании продуцентов. В рамках молекулярно-генетических технологий они

могут быть сведены к выполнению ряда принципов, заключающихся в повышении числа транскрипционных раундов кодирующего материала, которое может быть достигнуто увеличением количества копий транскрибируемого гена, снятием репрессии на определенном уровне, постановкой целевого гена под более сильный промотор и блокированием применения целевого продукта в дальнейших метаболических путях. Все эти приемы могут быть использованы и реализованы с применением векторных конструкций.

Существующие штаммы – продуценты шикимовой кислоты, созданные на основе бактерий *B. subtilis*, были получены путем увеличения числа копий генов, кодирующих шикиматдегидрогеназу, и ингибирования генов, отвечающих за синтез шикиматкиназы, которые обеспечивают выход шикимата в размере 14 г/л [20].

Подбор условий трансформации. В связи с тем что любая стратегия с применением молекулярно-генетических подходов предполагает введение и направленное изменение генетического материала в реципиентной клетке, на первом этапе нами изучалась способность к трансформации у анализируемых штаммов-кандидатов.

С использованием общепринятых условий [12; 21] перевести клетки анализируемых штаммов-кандидатов в компетентное состояние не удалось. Для клеток *B. subtilis* характерно формирование состояния физиологической компетентности на поздних этапах логарифмического роста. Однако необходимое для этого время определяется скоростью роста, которая варьирует в значительной степени в зависимости от используемого штамма и условий культивирования.

В целях определения параметров культивирования, оптимальных для развития компетентности, была изучена кинетика роста анализируемых штаммов в различных средах и осуществлен титр компетентности.

Анализ полученных данных позволил определить оптимальные условия для развития состояния компетентности для каждого штамма-кандидата. В связи с тем что точные временные рамки развития компетентности не установлены, для проведения трансформации использовали культуры, находящиеся на разных этапах экспоненциальной фазы роста. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таким образом, были подобраны условия для перевода клеток указанных штаммов *B. subtilis* в состояние физиологической компетентности и получены их трансформанты с использованием векторных конструкций pLAV1, pAL1 и pAL2. С использованием ауксонографического теста определен их фенотип: исследуемые трансформанты подрачивали типовой штамм *B. subtilis* 168 trpC2, т. е. они получили указанные конструкции и сохранили способность к синтезу триптофана. Дополнительно факт плазмидоносительства подтверждали с помощью молекулярно-генетических методов и последующего электрофоретического анализа. Из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК, с ее помощью трансформировали клетки *E. coli* DH5a либо *E. coli* XL-1 Blue, затем из них выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному и электрофоретическому анализу. Размер и структура выделяемых конструкций соответствовали исходным.

Таблица 2

Оптимальные условия культивирования для перевода клеток *B. subtilis* в состояние физиологической компетентности

Table 2

Optimum conditions of cultivation for transfer of *B. subtilis* cells into a state of physiological competence

Штамм <i>B. subtilis</i>	Ночная культура			Этап 1				Этап 2				Эффективность, КОЕ на 1 мкг ДНК
	V_k	ПС	ОП, о. е., 600 нм	$V_{н.к}$	ПС	ОП, о. е., 600 нм	T_1 , мин	V_k	ПС	T_2 , мин	T_3 , мин	
168 trpC2	1/10	LB	2,6	1/25	CP1	0,6	300	1/10	CP2	60	40	$6,2 \cdot 10^5$
	1/10	LB	2,6	1/20	MG1	0,6	270	1/10	MG2	60	40	$6,2 \cdot 10^5$
ВНИИ Генетика-15	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,15	330	1/10	MG2	60	60	$0,2 \cdot 10^2$
ВНИИ Генетика-15 C10	1/50	CP1	2,6	1/10	CP1	0,43	210	1/10	CP2	80	60	$0,7 \cdot 10^2$
	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,33	210	1/10	MG2	60	40	$0,9 \cdot 10^2$
ВНИИ Генетика-15 D3	1/50	CP1	1,8	1/10	CP1	0,17	270	–	–	–	–	Нет
	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,25	330	–	–	–	–	Нет

Окончание табл. 2
Ending table 2

Штамм <i>B. subtilis</i>	Ночная культура			Этап 1				Этап 2				Эффективность, КОЕ на 1 мкг ДНК
	V_k	ПС	ОП, о. е., 600 нм	$V_{н.к}$	ПС	ОП, о. е., 600 нм	T_1 , мин	V_k	ПС	T_2 , мин	T_3 , мин	
КМБУ 2003	1/50	LB CP1	2,2	1/10	CP1	0,36	390	1/25	CP2	135	40	$2,1 \cdot 10^2$
	1/50	LB MG1	1,8	1/10	MG1	0,4	420	1/25	MG2	135	40	$0,9 \cdot 10^2$
ВКПМ 5434	1/50	CP1	1,9	1/20	CP1	0,3	310	1/10	CP2	60	40	$0,1 \cdot 10^2$
	1/50	MG1	1,8	1/20	MG1	0,3	310	1/10	MG2	60	40	$0,1 \cdot 10^2$

Примечание. V_k – объемная доля культуры в среде культивирования; ПС – состав питательной среды; ОП – значение оптической плотности (о. е.), 600 нм; $V_{н.к}$ – объемная доля ночной культуры в среде культивирования; T_1 , мин, – время культивирования на этапе 1 (в «богатой среде»); T_2 , мин, – время культивирования на этапе 2 (в «бедной среде») до внесения ДНК; T_3 , мин, – время культивирования на этапе 2 (в «бедной среде») после внесения ДНК; прочерк означает, что условия не подобраны; «нет» – трансформанты не получены.

При выполнении этого этапа работы была продемонстрирована принципиальная возможность проведения трансформации клеток указанных штаммов-кандидатов.

Стратегия инактивации шикиматкиназы. Анализ нуклеотидных последовательностей и дизайн праймеров. Шикимовая кислота является ключевым интермедиатом шикиматного пути и синтезируется из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата в результате четырех ферментативных реакций. У *B. subtilis* эти реакции осуществляются ферментами, кодируемыми генами *aroA*, *aroB*, *aroC* и *aroD* соответственно. Превращение шикимовой кислоты в хоризмовую происходит в результате ферментативных реакций, осуществляемых ферментами, кодируемыми генами *aroI*, *aroE* и *aroF* (табл. 3). В общем пути биосинтеза ароматических соединений образующийся шикимат подвергается фосфорилированию под действием шикиматкиназы с образованием шикимат-3-фосфата. Для накопления шикимата необходимо исключить его дальнейшее превращение в шикимат-3-фосфат, а для этого следует инактивировать фермент, катализирующий данную реакцию. Шикиматкиназа кодируется геном *aroI*, который, как видно из табл. 3, расположен достаточно далеко от других генов шикиматного пути, в частности от генов *aroA*, *aroB*, *aroC* и *aroD*, и в отличие от них транскрибируется с плюс-цепи ДНК и не образует с ними единого оперона.

Таблица 3

Молекулярно-генетическая характеристика генетических детерминант
шикиматного пути у *Bacillus subtilis*

Table 3

Molecular genetic characteristic of genetic determinants of
shikimate pathway in *Bacillus subtilis*

Ген	Код доступа	Нить	Длина, п. о.	Координаты на бактериальной хромосоме	Фермент
<i>aroA</i>	16080027	–	359	3045445–3046521	3-Дезокси-D-арабино-гептулозонат-7-фосфатсинтаза (ДАГФ-синтаза)
<i>aroB</i>	16079327	–	363	2378012–2379100	3-Дегидрохинатсинтаза
<i>aroC</i>	16079365	–	256	2412706–2413473	3-Дегидрохинатдегидратаза
<i>aroD</i>	16079620	–	281	2644630–2645472	Шикимат-5-дегидрогеназа
<i>aroI</i>	16077384	+	187	340025–340585	Шикиматкиназа
<i>aroE</i>	16079317	–	429	2367954–2369240	5-Енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтаза (3-фосфошикимат-1-карбоксивинилтрансфераза)
<i>aroF</i>	16079328	–	369	2379100–2380272	Хоризматсинтаза

Анализ нуклеотидной последовательности генома *B. subtilis* позволил определить мишень для интеграции. В качестве области гомологии выбран фрагмент бактериальной хромосомы, ограниченный генами *tmrB* и *aroI*, содержащий межгенную область с регуляторными элементами указанных генов, кодирующие последовательности которых локализованы соответственно на минус-цепи ДНК и плюс-цепи ДНК.

В целях амплификации целевого фрагмента синтезированы праймеры ShikF-NotI (5'-GCGGCCGCC ATTAGTGTAAGTGGTGAAC-3', $T_m = 53/61/52$) и ShikR-BamHI (5'-CCGGATCCGCCAGAGATACG ATTTTG-3', $T_m = 54/61/55$). Согласно нуклеотидной последовательности генома *B. subtilis* полученные праймеры позволяют амплифицировать фрагмент ДНК размером около 900 п. н. Для последующего клонирования продукта амплификации в состав вектора pMUTIN4 [22] синтезированные праймеры содержат на своих 5'-концах навески с сайтами распознавания для рестриктаз BamHI и NotI.

Для возможности проверки специфичности интеграции нами были разработаны праймеры для ПЦР-анализа, позволяющего установить наличие интегративной конструкции (табл. 4) в составе бактериальной хромосомы: Shik-TFAG (5'-ACAGCACAAGAGCGGAAAGATG-3', $T_m = 54/61/56$) и Shik-TRAG (5'-TGCTTCCAGTTCTCCCATGAC-3', $T_m = 54/61/54$).

Таблица 4

Количество и размер ожидаемых продуктов амплификации, получаемых при осуществлении ПЦР-скрининга рекомбинантных штаммов *B. subtilis*

Table 4

The number and size of the expected amplification products obtained by PCR screening of recombinant *B. subtilis* strains

Продукты амплификации, выявляемые при успешной интеграции разрабатываемой конструкции в состав бактериальной хромосомы			
№ п/п	Размер ампликона, п. о.	Прямой праймер	Обратный праймер
1	1123	Shik-TFAG	Shik-TRAG
2	1033	Shik-TFAG	ShikR-BamHI
3	970	ShikF-NotI	Shik-TRAG
4	885	ShikF-NotI	ShikR-BamHI
Продукты амплификации, выявляемые при отсутствии точной интеграции разрабатываемой конструкции в состав бактериальной хромосомы			
1	970	ShikF-NotI	Shik-TRAG
2	885	ShikF-NotI	ShikR-BamHI

При проведении ПЦР-анализа с использованием данных праймеров, а также праймеров ShikF-NotI и ShikR-BamHI продукты амплификации будут различны в случае точной интеграции конструкции в геном целевого штамма и при отсутствии таковой (см. табл. 4 и рисунок). Этот прием позволяет провести быстрый и точный скрининг рекомбинантов среди полученных трансформантов *B. subtilis*.

Подбор и оптимизация условий ПЦР для получения целевого фрагмента. С использованием в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции препаратов тотальной ДНК, выделенной из штаммов, обладающих повышенной способностью к синтезу триптофана, и типового штамма *B. subtilis* 168 trpC2, и разработанных праймеров ShikF-NotI и ShikR-BamHI были подобраны условия для получения целевого продукта. При оптимизации условий установлено, что наибольший выход продукта амплификации наблюдается при снижении температуры отжига праймеров на 2 °С относительно теоретически рассчитанной, что может являться следствием полиморфизма областей посадки праймеров, возникшего при получении данных штаммов. Кроме того, модификация предусматривала понижение температуры стадии полимеризации с 72 °С (температура, оптимальная для эффективной работы Taq-полимеразы) до 68 °С (температура, рекомендуемая для работы с АТ-богатыми матрицами). Указанные изменения позволили выявить специфические продукты амплификации размером около 1 т. п. н. для всех проанализированных матриц. Для доказательства того, что полученные ампликоны имеют структуру, сходную с ожидаемой, они были подвергнуты рестрикции с использованием рестриктаз HindIII и PstI и последующему электрофоретическому разделению в агарозном геле.

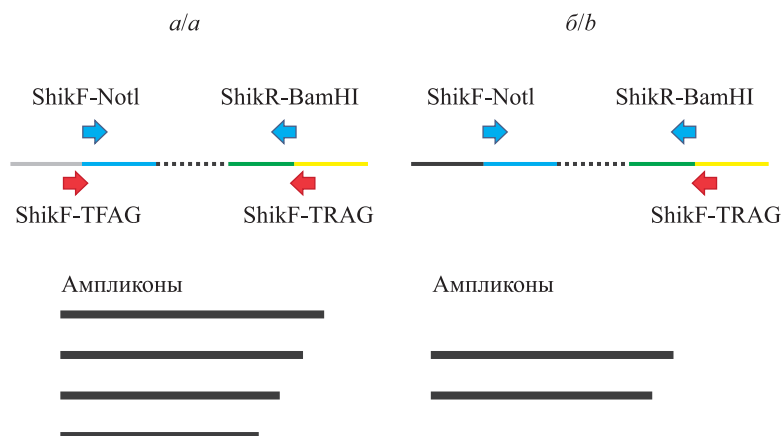


Иллюстрация принципа проведения ПЦР-скрининга рекомбинантных штаммов *B. subtilis*: организация участка генома (хромосомы): *a* – в случае точной интеграции разрабатываемой конструкции в бактериальную хромосому; *b* – при отсутствии интеграции. Фрагмент вектора pMUTIN4 представлен линией серого цвета, фрагмент гена *tmrB* – линией голубого цвета, ген *aroI* обозначен линиями зеленого и желтого цвета, межгенная область – пунктирной линией. Праймеры ShikF-NotI, ShikR-BamHI и ShikF-TFAG, ShikF-TRAG обозначены синими и красными стрелками соответственно

Illustration of the principle of PCR screening for recombinant *B. subtilis* strains: organization of the genome (chromosome): *a* – in the case of exact integration of the developed design into the bacterial chromosome; *b* – in the absence of integration. The fragment of the vector pMUTIN4 is represented by a gray line, the *tmrB* gene fragment is a blue line, the *aroI* gene is indicated by lines of green and yellow, the intergenic region by a dashed line. Primers ShikF-NotI, ShikR-BamHI and ShikF-TFAG, ShikF-TRAG, are indicated by blue and red arrows, respectively

Анализ электрофореграмм показал, что все полученные ампликоны имеют сходство в организации строения, но на основании электрофоретической подвижности выявляемых рестриктвов их можно разделить на две группы. К первой группе могут быть отнесены продукты, получаемые с препаратов тотальной ДНК следующих штаммов *B. subtilis*: ВКПМ 5434, ВНИИ Генетика-15 D4 и КМБУ 2003-2, ко второй – ВНИИ Генетика-15 D3, ВНИИ Генетика-15 C10, КМБУ 2003-1 и 168 trpC2. Данные различия могут являться следствием серии мутагенезов, при помощи которых были созданы используемые в работе штаммы.

Заключение

В результате выполнения настоящей работы были получены исходные ампликоны для создания генетических конструкций, предназначенных для интеграции в состав бактериальной хромосомы. Среди ампликонов выявлен генетический полиморфизм, который может являться следствием мутагенеза, используемого при получении штаммов – продуцентов триптофана. На основе метода ПЦР разработана система для быстрого скрининга трансформантов на наличие рекомбинационных перестроек генома и интегративной конструкции в составе бактериальной хромосомы трансформированного штамма. Показана возможность трансформации штаммов-кандидатов, перспективных для создания штаммов – продуцентов шикимовой кислоты. Полученные результаты являются важной основой для дальнейшего конструирования продуцентов.

Библиографические ссылки

1. Zhang Y., Liu A., Ye Z. G., et al. New Approach to the Total Synthesis of (–)-Zeylenone from Shikimic Acid // Chem. & Pharm. Bull. 2006. Vol. 54, № 10. P. 1459–1461.
2. Bradley D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? // Nature Rev.: Drug Discovery. 2005. Vol. 4, № 12. P. 945–946.
3. Mair H.-J. Process for the preparation of shikimic acid its derivatives / US006130354 (A). 2000-10-10.
4. Raghavendra T. R., Vaidyanathan P., Swathi H. K., et al. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tami-flu, a bird-flu drug // Current sci. 2009. Vol. 96, № 6. P. 771–772.
5. Brazdova B., Tan N. S., Samoshina N. M., et al. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexanedicarboxylic acids // Carbohydrate Research. 2008. Vol. 344, № 3. P. 311–321.
6. Lingens F. The Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and its Regulation // Angewandte Chem. Int. Ed. 2003. Vol. 7, № 5. P. 350–360.

7. Ruohong S. Separation of Shikimic Acid from Pine Needles // *Chem. Engineering & Technology*. 2008. Vol. 31, № 3. P. 469–473.
8. Shinada T., Yoshida Y., Ohfuné Y. Direct conversion of 1,2-diol into allyl sulfide. Regioselective transformation of (–)-quinic acid to (–)-shikimic acid // *Tetrahedron Letters*. 1998. Vol. 39, № 33. P. 6027–6028.
9. Adachi O., Ano Y., Toyama H., et al. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria // *Biosci., Biotech., a. Biochem.* 2006. Vol. 70, № 10. P. 2579–2582.
10. Taylor R. G., Walker D. C., McInnes R. R. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing // *Nucleic Acids Research*. 1993. Vol. 21, № 7. P. 1677–1678.
11. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // *BioTech*. 1987. Vol. 5, № 3. P. 376–379.
12. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // *J. of Bacteriology*. 1961. Vol. 81, № 5. P. 741–746.
13. Сенаторова В. Н. Исследование процесса и создание технологии биосинтеза L-триптофана штаммом-продуцентом *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15 : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23. М., 2000.
14. Lahodzhich A. V. Plasmids of pBS72 family as a basis for creation of vector systems // *Biotechnology of the Future: EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme* : proc. to the Int. symp. (Saint Petersburg, 5–8 June, 2006). Moscow, 2006. P. 47–48.
15. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Lab. : Cold Spring Harbor Publishing, 1989.
16. Birnboim H. L., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Research*. 1979. Vol. 7, № 6. P. 1513–1523.
17. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production // *Canad. J. Microbiol.* 2004. Vol. 50, № 1. P. 1–17.
18. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* // *Nature*. 1997. Vol. 390, № 6657. P. 249–256.
19. *Bacillus subtilis* 168 Genome Page [Electronic resource]. URL: <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntbs01> (date of access: 15.04.2011).
20. Iomantas Yurgis A. V., Abalkina E. G., Polanuer B. M., et al. Method for producing shikimic acid // US6436664.2002-08-20.
21. Bron S. Plasmids // *Molecular Biological Methods for Bacillus* / ed. by C. R. Harwood. Chichester : John Wiley a. Sons Ltd., 1990. P. 75–174.
22. Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S. D. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* // *J. Microbiol.* 1998. Vol. 144, № 11. P. 3097–3104.

References

1. Zhang Y., Liu A., Ye Z. G., et al. New Approach to the Total Synthesis of (–)-Zeylenone from Shikimic Acid. *Chem. & Pharm. Bull.* 2006. Vol. 54, No. 10. P. 1459–1461.
2. Bradley D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? *Nature Rev.: Drug Discovery*. 2005. Vol. 4, No. 12. P. 945–946.
3. Mair H.-J. Process for the preparation of shikimic acid its derivatives. *US006130354 (A)*. 2000-10-10.
4. Raghavendra T. R., Vaidyanathan P., Swathi H. K., et al. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tami-flu, a bird-flu drug. *Current sci.* 2009. Vol. 96, No. 6. P. 771–772.
5. Brazdova B., Tan N. S., Samoshina N. M., et al. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexanedicarboxylic acids. *Carbohydrate Research*. 2008. Vol. 344, No. 3. P. 311–321.
6. Lingens F. The Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and its Regulation. *Angewandte Chem. Int. Ed.* 2003. Vol. 7, No. 5. P. 350–360.
7. Ruohong S. Separation of Shikimic Acid from Pine Needles. *Chem. Engineering & Technology*. 2008. Vol. 31, No. 3. P. 469–473.
8. Shinada T., Yoshida Y., Ohfuné Y. Direct conversion of 1,2-diol into allyl sulfide. Regioselective transformation of (–)-quinic acid to (–)-shikimic acid. *Tetrahedron Letters*. 1998. Vol. 39, No. 33. P. 6027–6028.
9. Adachi O., Ano Y., Toyama H., et al. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria. *Biosci., Biotech., a. Biochem.* 2006. Vol. 70, No. 10. P. 2579–2582.
10. Taylor R. G., Walker D. C., McInnes R. R. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research*. 1993. Vol. 21, No. 7. P. 1677–1678.
11. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTech*. 1987. Vol. 5, No. 3. P. 376–379.
12. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. of Bacteriology*. 1961. Vol. 81, No. 5. P. 741–746.
13. Senatorova V. N. The study of the process and creation of technology of biosynthesis of L-tryptophan strain-producer *Bacillus subtilis* Of-15 : dissertatsiya... kandidata tech. nauk : 03.00.23. Moscow, 2000 (in Russ.).
14. Lahodzhich A.V. Plasmids of pBS72 family as a basis for creation of vector systems. *Biotechnology of the Future: EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme* : affiliated to the Int. symp. (Saint Petersburg, 5–8 June, 2006). Moscow, 2006. P. 47–48.
15. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Lab. : Cold Spring Harbor Publishing, 1989.

16. Birnboim H. L., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979. Vol. 7, No. 6. P. 1513–1523.
17. Schallmey M., Singh A., Ward O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canad. J. Microbiol.* 2004. Vol. 50, No. 1. P. 1–17.
18. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 1997. Vol. 390, No. 6657. P. 249–256.
19. *Bacillus subtilis* 168 Genome Page. URL: <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntbs01> (date of access: 15.04.2011).
20. Iomantas Yurgis A. V., Abalkina E. G., Polanuer B. M., et al. Method for producing shikimic acid. *US6436664.2002-08-20*.
21. Bron S. Plasmids. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester : John Wiley a. Sons Ltd., 1990. P. 75–174.
22. Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S. D. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* 1998. Vol. 144, No. 11. P. 3097–3104.

Статья поступила в редколлегию 15.09.2017.
Received by editorial board 15.09.2017.

Биотехнология и микробиология

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.841.11;579.64

ПРИНЦИПЫ ОТБОРА СТИМУЛЯТОРОВ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ СРЕДИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS* С АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ю. М. КУЛЕШОВА¹⁾, В. А. РЫБАКОВА¹⁾, И. Н. ФЕКЛИСТОВА¹⁾, И. А. ГРИНЕВА¹⁾,
В. А. ЛОМОНОСОВА¹⁾, Т. Л. СКАКУН¹⁾, Д. В. МАСЛАК¹⁾, Л. Е. САДОВСКАЯ¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

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

Образец цитирования:

Кулешова Ю. М., Рыбакова В. А., Феклистова И. Н., Гринева И. А., Ломоносова В. А., Скакун Т. Л., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Максимова Н. П. Принципы отбора стимуляторов корнеобразования растений среди бактерий *Pseudomonas* с антагонистической активностью // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 54–62.

For citation:

Kuleshova Y. M., Rybakova V. A., Feklistova I. N., Grineva I. A., Lomonosova V. A., Skakun T. L., Maslak D. V., Sadovskaya L. E., Maximova N. P. Selection principles of plant korne formation stimulators among bacteria *Pseudomonas* with antagonistic activity. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 54–62 (in Russ.).

Авторы:

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

Виктория Андреевна Рыбакова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Ю. М. Кулешова.

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

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

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

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

Диана Викторовна Маслак – заведующий сектором молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов кафедры генетики биологического факультета.

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

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

Authors:

Yuliya M. Kuleshova, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

Viktoriya A. Rybakova, student at the faculty of biology.
viktoriya-rubka@mail.ru

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

Irina A. Grineva, senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.
grineva_ia@mail.ru

Veronica A. Lomonosova, researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.
nikaglad@gmail.com

Tatyana L. Skakun, senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.
stanysik@yandex.ru

Diana V. Maslak, head of the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the department of genetics, faculty of biology.
diana-maslak@yandex.ru

Ludmila E. Sadovskaya, senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.
ludmilasadovskaya@rambler.ru

Natalia P. Maximova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.
nataliamaximova@yahoo.com

Среди PGPR-бактерий рода *Pseudomonas* флуоресцирующей группы с антагонистической активностью выявлены штаммы, способные улучшать минеральное питание растений. Оценены факторы фитопатогенности изучаемых бактерий и влияние их на ростовые процессы растений. При анализе ростостимулирующей активности препаратов на основе 14 различных бактериальных культур зафиксировано достоверное увеличение длины корней до 90 %, побегов – до 95 %, всхожести семян – до 30 % относительно контроля. Таким образом, непатогенные *Pseudomonas* флуоресцирующей группы могут одновременно являться антагонистами фитопатогенов, улучшать минерализацию почв и стимулировать корнеобразование растений, что приводит к увеличению продуктивности последних.

Ключевые слова: *Pseudomonas*; антагонизм; стимуляция корнеобразования; улучшение минерального питания растений; увеличение продуктивности растений.

SELECTION PRINCIPLES OF PLANT KORNE FORMATION STIMULATORS AMONG BACTERIA *PSEUDOMONAS* WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY

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

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

Corresponding author: Y. M. Kuleshova (yuliakuleshova@yahoo.co.uk)

Among the PGPR *Pseudomonas* with antagonistic activity from «fluorescent» group, strains capable of improving the mineral nutrition of plants have been identified. The influence on plant growth processes and the phytopathogenic factors of studied bacteria are estimated. When analyzing the growth-stimulating activity of preparations on the basis of 14 different bacterial cultures, a reliable increase in the root length was registered, up to 90 %, shoots – up to 95 %, seed germination – up to 30 % relative to control. Thus, non-pathogenic fluorescent *Pseudomonas* can be antagonists of phytopathogens, improve soil mineralization and stimulate root formation of plants simultaneously, which leads to an increase in the plant productivity.

Key words: *Pseudomonas*; antagonistic activity; stimulation of plant roots growth; improvement of plant mineral nutrition; increase in plant productivity.

Интерес к бактериям PGPR-группы вызван возможностью повышения с их помощью урожайности растений, что позволяет рассматривать данные микроорганизмы в качестве альтернативы химическим удобрениям, пестицидам и регуляторам роста [1]. Бактерии PGPR – представители флуоресцирующей группы почвенных *Pseudomonas* – способны к синтезу широкого спектра метаболитов с фитогормональной и сигнальной активностью, стимуляторов системной устойчивости растений, веществ, угнетающих развитие грибных и бактериальных фитопатогенов, а также увеличивающих биодоступность макроэлементов [1; 2]. Это позволяет использовать данные бактерии для разработки биопрепаратов сельскохозяйственного назначения. В связи с этим в настоящей работе рассматривается возможность совмещения в биопрепарате – стимуляторе корнеобразования растений – фитопротекторных и ростостимулирующих свойств.

Материалы и методы исследований

В работе использованы штаммы бактерий *Pseudomonas* флуоресцирующей группы, фитопатогенные бактерии и грибы из коллекции биологического факультета БГУ.

Бактерии культивировали при 28 °С в течение 48 ч с аэрацией в жидкой или на агаризованной среде на основе рыбного бульона либо солевого концентрата М9 с мелассой (концентрация составляла 0,4 %), или солевого концентрата Канада с сукцинатом Na (концентрация равнялась 0,4 %) [3; 4].

Антагонистическую активность исследовали методом отсроченного антагонизма [5].

Изучение фосфатмобилизующей активности проводили с использованием среды Муромцева, азотфиксирующей – среды Эшби [6]. Наличие факторов патогенности устанавливали согласно [7]. Влияние бактерий на ростовые процессы растений исследовали с использованием рапса озимого сорта Зорный, культивируемого согласно [8]. Продуктивность растений определяли в модельной системе с кресс-салатом сорта Звычайны.

Полученные результаты представляли в виде среднего арифметического с учетом стандартной ошибки средней величины. Достоверность различий определяли при помощи критерия Стьюдента при уровне значимости ошибки $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

В работе были использованы 94 штамма бактерий рода *Pseudomonas*, депонированные в коллекцию кафедры генетики биологического факультета БГУ. Известно, что представители *Pseudomonas* флуоресцирующей группы продуцируют пиовердины – наиболее активные из известных микробных сиде-рофоров, являющиеся одним из факторов антагонистической активности синтезирующих их бактерий и способные служить дополнительным источником ионов железа для растений [9]. В связи с этим по способности к флуоресценции на минеральной среде Канеда с сукцинатом Na (среда А) среди кол-лекционных штаммов были отобраны бактерии, продуцирующие пиовердины и, соответственно, от-носящиеся к флуоресцирующей группе псевдомонад. Из 37 штаммов флуоресцирующих *Pseudomonas* были исключены бактерии, синтезирующие пиоцианин, поскольку продукция данного сине-зеленого пигмента характерна в том числе для условных патогенов человека, в частности для *P. aeruginosa* (воз-будитель нозокомиальных инфекций человека [10]). О способности бактерий к синтезу пиоцианина судили по сине-зеленому окрашиванию полноценной среды на основе гидролизата кильки вокруг коло-ний микроорганизмов. Таким образом, среди исследуемых бактерий рода *Pseudomonas* были отобраны 23 штамма, не продуцирующих пиоцианины, но способных синтезировать пиовердины и потенциа-льно обладающих антагонистической и стимулирующей рост растений активностью.

Антагонистическую активность отобранных представителей рода *Pseudomonas* изучали при по-мощи метода отсроченного антагонизма. Бактерии выращивали на полноценной среде и минеральной среде А, так как спектр синтезируемых микроорганизмами метаболитов с антагонистической актив-ностью может различаться при разных условиях культивирования (табл. 1). В качестве фитопатогенной бактериальной тест-культуры был выбран штамм *Clavibacter* sp., выделенный из зараженных растений Минской овощной фабрики. Антифунгальную активность исследовали с использованием в качестве тест-культуры широко распространенного почвенного фитопатогена *Fusarium oxysporum*.

Таблица 1

Антагонистическая активность бактерий рода *Pseudomonas*

Table 1

Antagonistic activity of *Pseudomonas* bacteria

Штамм	Антибактериальная активность		Антифунгальная активность		
	Среда А	Полноценная среда	Радиус роста к антагонисту, мм	Радиус роста от антагониста, мм	Относительный рост фитопатогена, %
<i>P. vesicatoria</i> ВКМБ-546	+	+	33	36	91,7
<i>P. aureofaciens</i> В-161	+	+	33	36	91,7
<i>P. fluorescens</i> ВКМБ-561	+	–	34	36	94,4
<i>P. fluorescens</i> В-172	–	+	36	36	100,0
<i>P. fluorescens</i> ВКМБ-896	+	+	34	36	94,4
<i>P. aurantiaca</i> ВКМБ-876	–	+	23	34	67,64
<i>P. fluorescens</i> В-24	+	+	33	35	94,28
<i>P. aurantiaca</i> В-14	–	+	22	33	66,67
<i>P. putida</i> В-37	+	+	20	34	58,82
<i>P. putida</i> В-38	–	–	24	34	70,58
<i>P. putida</i> В-21	–	+	33	32	103,13
<i>P. putida</i> В-40	+	+	29	35	82,85
<i>P. chlororaphis</i> ВКМБ-897	+	+	32	36	88,89
<i>P. aurantiaca</i> ВКМБ-560	–	+	32	30	106,67
<i>P. fluorescens</i> В-28	–	+	37	35	105,71

Окончание табл. 1
Ending table 1

Штамм	Антибактериальная активность		Антифунгальная активность		
	Среда А	Полноценная среда	Радиус роста к антагонисту, мм	Радиус роста от антагониста, мм	Относительный рост фитопатогена, %
<i>P. fluorescens</i> 8305	+	+	29	36	80,56
<i>P. aurantiaca</i> ВКМВ-548	+	—	30	34	88,23
<i>P. aurantiaca</i> В-162	+	+	21	35	60,0
<i>P. putida</i> КМБУ 4308	+	—	30	36	83,33
<i>P. putida</i> F19	+	—	28	37	75,68
<i>P. putida</i> C11	+	—	27	37	72,98
<i>P. sp.</i> 139	+	+	22	36	61,11
<i>P. chlororaphis</i> 449	+	+	24	36	66,67

Примечания: 1. При исследовании антибактериальной активности в качестве тест-культуры использован штамм *Clavibacter* sp. 2. При исследовании антифунгальной активности в качестве тест-культуры использован *Fusarium oxysporum*. 3. Знак «плюс» означает, что наблюдается зона задержки роста фитопатогена. 4. Знаком «минус» отмечено отсутствие зоны задержки роста фитопатогена.

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о наличии антагонистической активности у всех изучаемых бактерий. При этом 16 из 23 исследованных штаммов выделяли вещества с антагонистической активностью на минимальной среде А, 18 из 23 штаммов подавляли развитие фитопатогенов как бактериальной, так и грибной природы. Наиболее широкий спектр антагонистической активности наблюдался у бактерий *P. vesicatoria* ВКМВ-546, *P. aureofaciens* В-161, *P. fluorescens* ВКМВ-896, *P. fluorescens* В-24, *P. putida* В-37, *P. putida* В-40, *P. chlororaphis* ВКМВ-897, *P. fluorescens* 8305, *P. aurantiaca* В-162, *P. sp.* 139, *P. chlororaphis* 449, что делает их наиболее перспективными для дальнейших исследований в целях создания полифункциональных биопрепаратов для повышения продуктивности растений.

Следует подчеркнуть, что фитопатогенные представители *Pseudomonas* также могут обладать антагонистической активностью. Для исключения фитопатогенов из потенциально перспективных для использования в сельском хозяйстве штаммов был проведен скрининг факторов их патогенности (табл. 2).

Таблица 2

Идентификация факторов фитопатогенности

Table 2

Identification of phytopathogenicity factors

Штамм	Фактор патогенности				
	Мацерация		Целлюлолитическая активность	Некроз	Пектацеллюлитическая активность
	Картофель	Морковь			
<i>P. vesicatoria</i> ВКМВ-546	—	—	+/-	—	—
<i>P. aureofaciens</i> В-161	—	—	—	—	—
<i>P. fluorescens</i> ВКМВ-561	+	—	—	—	—
<i>P. fluorescens</i> В-172	—	—	—	—	—
<i>P. fluorescens</i> ВКМВ-896	+	—	—	—	—
<i>P. aurantiaca</i> ВКМВ-876	—	—	—	—	—
<i>P. fluorescens</i> В-24	—	—	—	—	—
<i>P. aurantiaca</i> В-14	—	—	—	—	—
<i>P. putida</i> В-37	—	—	—	+	—
<i>P. putida</i> В-38	—	—	—	+	—

Окончание табл. 2
Ending table 2

Штамм	Фактор патогенности				
	Мацерация		Целлюлолитическая активность	Некроз	Пектатлитическая активность
	Картофель	Морковь			
<i>P. putida</i> B-21	+	–	–	–	–
<i>P. putida</i> B-40	+	–	–	–	–
<i>P. aurantiaca</i> ВКМВ-560	–	–	–	–	–
<i>P. aurantiaca</i> ВКМВ-548	+	+	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> 8305	–	–	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> B-28	–	–	–	–	–
<i>P. chlororaphis</i> ВКМВ-897	+	–	–	+/-	–
<i>P. aurantiaca</i> B-162	–	–	–	+/-	–
<i>P. putida</i> F19	+	–	–	+/-	–
<i>P. putida</i> C11	–	–	–	+/-	–
<i>P. sp.</i> 139	+	–	–	–	–
<i>P. chlororaphis</i> 449	–	–	–	–	–
<i>P. putida</i> КМВУ 4308	–	–	–	+/-	–

Примечания: 1. Знак «плюс» означает, что активность зафиксирована. 2. Знаком «минус» отмечено отсутствие активности. 3. Знак «плюс/минус» определяет, что зона просветления фиксируется непосредственно в месте укола.

В результате исследования способности мацерировать растительную ткань было обнаружено, что представители 8 штаммов разрушают ткани клубней картофеля, но не могут мацерировать корнеплоды моркови. В то же время показано, что штамм *P. aurantiaca* ВКМВ-548 мацерировал и картофель, и морковь. Обнаружены также 2 штамма, вызывающих некроз живых тканей листьев табака, – *P. putida* B-37 и *P. putida* B-38. В ходе проведения теста на целлюлолитическую активность был выявлен один штамм, продуцирующий целлюлолитические ферменты, – *P. vesicatoria* ВКМВ-546. Способности к деградации пектиновых веществ не проявил ни один из тестируемых бактериальных штаммов. Как показывают результаты проведенного скрининга, представленные в табл. 2, ни один из бактериальных штаммов не обладал комплексом свойств, необходимых для проявления фитопатогенности. Тем не менее штаммы *P. putida* B-37, *P. putida* B-38 и *P. aurantiaca* ВКМВ-548 были исключены из дальнейших экспериментов по активации корнеобразования растений.

Таким образом, в качестве потенциальных стимуляторов корнеобразования среди бактерий рода *Pseudomonas*, способных синтезировать пиовердины, были отобраны 16 нефитопатогенных штаммов, угнетающих развитие возбудителей бактериальных и грибных заболеваний овощных культур.

Исследование фосфатмобилизующей (с использованием среды Муромцева) и азотфиксирующей (на среде Эшби) активностей отобранных бактерий позволило заключить, что большинство из них обладают обеими исследуемыми активностями и, соответственно, способны улучшать минеральное питание растений (табл. 3). Вместе с тем бактерии *P. aureofaciens* B-161, *P. aurantiaca* B-162, *P. sp.* 139, *P. chlororaphis* 449 не могли растворять фосфаты, однако были способны расти на среде без азотистых соединений. Бактерии *P. putida* B-40, напротив, оказались не способными к фиксации азота, но эффективно мобилизовали фосфаты.

Для изучения влияния метаболитов бактерий на рост корней растений в качестве тест-культуры использовали озимый рапс. Поскольку спектр бактериальных метаболитов может отличаться на разных питательных средах, для культивирования бактерий использовали среду М9 с мелассой, так как она часто применяется при производстве биопрепаратов, и среду А, потому что янтарная кислота является предшественником пиовердинов – сидерофоров с антагонистической активностью. Для оптимизации концентрации метаболитов бактериальную культуру разводили в 100 и 1000 раз перед использованием стерильной водопроводной водой и обрабатывали поверхностно стерилизованные семена в течение 4 ч, после чего выкладывали на стерильные, смоченные водой фильтры в стерильные чашки Петри и культивировали согласно [8].

Таблица 3

Способность бактерий улучшать минерализацию почвы

Table 3

The ability of bacteria to improve soil mineralization

Штамм	Способность к мобилизации фосфора, диаметр просветления, мм			Способность расти на среде без азота
	24 ч	48 ч	7 сут	
<i>P. vesicatoria</i> ВКМБ-546	–	9	+	+
<i>P. aureofaciens</i> В-161	–	–	–	+
<i>P. fluorescens</i> ВКМБ-561	10	18	+	+
<i>P. fluorescens</i> ВКМБ-896	9	18	+	+
<i>P. aurantiaca</i> ВКМБ-876	–	–	–	+
<i>P. fluorescens</i> В-24	11	15	+	+
<i>P. aurantiaca</i> В-14	–	10	+	+
<i>P. putida</i> В-40	14	21	+	–
<i>P. fluorescens</i> 8305	–	11	+	+
<i>P. chlororaphis</i> ВКМБ-897	11	20	+	+
<i>P. aurantiaca</i> В-162	–	–	–	+
<i>P. putida</i> КМБУ 4308	10	14	+	+
<i>P. putida</i> F19	–	9	+	+
<i>P. putida</i> C11	11	13	+	+
<i>P. sp.</i> 139	–	–	–	+
<i>P. chlororaphis</i> 449	–	–	–	+

Примечания: 1. Знак «плюс» означает наличие активности. 2. Знаком «минус» отмечено отсутствие активности.

О влиянии обработки семян на ростовые процессы растений судили по изменениям параметров роста 10-дневных проростков. Для исключения влияния среды культивирования на рост рапса при обработке бактериальной культурой данные, полученные в опытах с бактериями, делили на показатели соответствующих контрольных выборок, обработанных средой культивирования без бактерий. Совокупность данных, нормализованных по отношению к соответствующему контролю, представлена на рис. 1.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что обработка семян рапса бактериальными суспензиями способна стимулировать рост корней на 12,0–91,5 %. Наиболее выраженный стимулирующий эффект наблюдался при обработке бактериями *P. putida* В-40, *P. vesicatoria* ВКМБ-546 и *P. fluorescens* 8305, выращенными в среде М9 с мелассой и разведенными в 100 раз перед использованием, при этом увеличение длины корня достигало 90,0; 91,5 и 66,0 % соответственно. Следует отметить, что все три указанных штамма являлись активными фосфатмобилизаторами, а отсутствие азотфиксирующей активности у *P. putida* В-40 не снижало эффективности активации корнеобразования.

Представленные на рис. 1 результаты свидетельствуют о том, что 11 препаратов на основе 9 бактериальных культур способны стимулировать рост надземной части проростков. При этом наиболее выраженная прибавка длины побега (около 95 % по сравнению с соответствующей контрольной выборкой) зафиксирована после обработки семян рапса бактериями *P. vesicatoria* ВКМБ-546, выращенными в среде М9 (разведение в 100 раз перед использованием). Было также отмечено, что колебания показателя энергии прорастания семян после обработки бактериальными суспензиями находились в пределах ошибки измерения. Анализ изменения всхожести семян позволил заключить, что обработка бактериями *P. putida* F19, выращенными в среде М9 (разведение в 100 раз перед использованием), *P. vesicatoria* ВКМБ-546 – в среде М9 (разведение в 100 раз), *P. fluorescens* ВКМБ-561 – в среде А (разведение в 1000 раз), *P. fluorescens* В-24 – в среде М9 (разведение в 1000 раз), достоверно повышает всхожесть семян рапса на 25–30 %, а обработка *P. vesicatoria* ВКМБ-546, выращенными в среде А (разведение в 100 раз), снижает всхожесть примерно на 24 %. Изменения всхожести, вызванные остальными вариантами обработки, были статистически недостоверны.

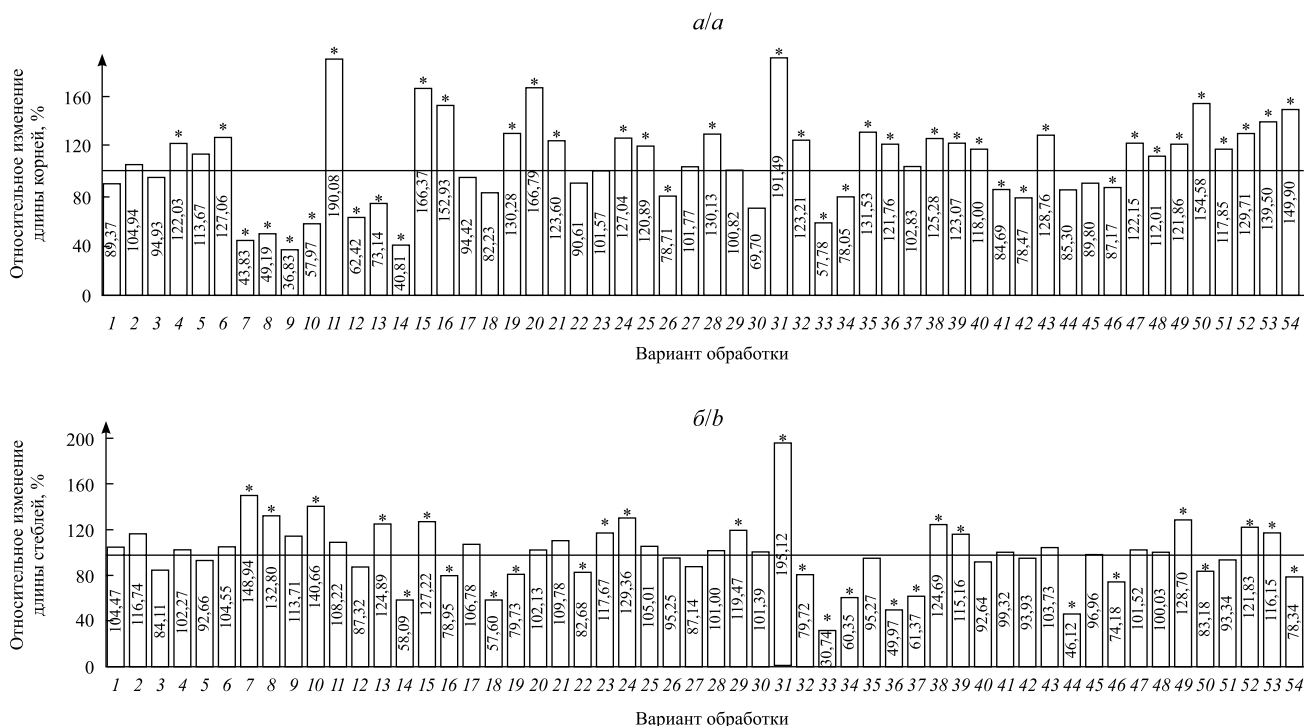


Рис. 1. Изменение длины корней (а) и стеблей (б) проростков рапса после обработки семян бактериальными культурами, выращенными на разных средах (А и М9), при разведении в 100 (×100) и 1000 (×1000) раз:

1 – *P. sp.* 139 в А (×100); 2 – *P. sp.* 139 в А (×1000); 3 – *P. putida* C11 в А (×100); 4 – *P. putida* C11 в А (×1000); 5 – *P. putida* C11 в М9 (×100); 6 – *P. putida* C11 в М9 (×1000); 7 – *P. chlororaphis* 449 в М9 (×100); 8 – *P. chlororaphis* 449 в М9 (×1000); 9 – *P. chlororaphis* 449 в А (×100); 10 – *P. chlororaphis* 449 в А (×1000); 11 – *P. putida* B-40 в М9 (×100); 12 – *P. putida* B-40 в М9 (×1000); 13 – *P. putida* B-40 в А (×100); 14 – *P. putida* B-40 в А (×1000); 15 – *P. fluorescens* 8305 в М9 (×100); 16 – *P. fluorescens* 8305 в М9 (×1000); 17 – *P. fluorescens* 8305 в А (×100); 18 – *P. fluorescens* 8305 в А (×1000); 19 – *P. aurantiaca* B-162 в А (×100); 20 – *P. aurantiaca* B-162 в А (×1000); 21 – *P. aurantiaca* B-162 в М9 (×100); 22 – *P. aurantiaca* B-162 в М9 (×1000); 23 – *P. putida* KMBY 4308 в А (×100); 24 – *P. putida* KMBY 4308 в А (×1000); 25 – *P. putida* KMBY 4308 в М9 (×100); 26 – *P. putida* KMBY 4308 в М9 (×1000); 27 – *P. putida* F19 в А (×100); 28 – *P. putida* F19 в А (×1000); 29 – *P. putida* F19 в М9 (×100); 30 – *P. putida* F19 в М9 (×1000); 31 – *P. vesicatoria* BKMB-546 в М9 (×100); 32 – *P. vesicatoria* BKMB-546 в М9 (×1000); 33 – *P. vesicatoria* BKMB-546 в А (×100); 34 – *P. vesicatoria* BKMB-546 в А (×1000); 35 – *P. fluorescens* BKMB-561 в М9 (×100); 36 – *P. fluorescens* BKMB-561 в М9 (×1000); 37 – *P. fluorescens* BKMB-561 в А (×100); 38 – *P. fluorescens* BKMB-561 в А (×1000); 39 – *P. fluorescens* B-24 в М9 (×100); 40 – *P. fluorescens* B-24 в М9 (×1000); 41 – *P. fluorescens* B-24 в А (×100); 42 – *P. fluorescens* B-24 в А (×1000); 43 – *P. fluorescens* 896 в М9 (×100); 44 – *P. fluorescens* 896 в М9 (×1000); 45 – *P. fluorescens* 896 в А (×100); 46 – *P. fluorescens* 896 в А (×1000); 47 – *P. aureofaciens* B-161 в М9 (×100); 48 – *P. aureofaciens* B-161 в М9 (×1000); 49 – *P. aureofaciens* B-161 в А (×100); 50 – *P. aureofaciens* B-161 в А (×1000); 51 – *P. aurantiaca* B-14 в М9 (×100); 52 – *P. aurantiaca* B-14 в М9 (×1000); 53 – *P. aurantiaca* B-14 в А (×100); 54 – *P. aurantiaca* B-14 в А (×1000); *разница опыта с контролем статистически достоверна при $p \leq 0,05$

Fig. 1. Change in root length (a) and stems length (b) of rape seedlings after seed inoculation with bacterial cultures grown in different medium (A and M9) diluted 100 (×100) and 1000 (×1000) times:

1 – inoculation with *P. sp.* 139, grown in medium A (×100); 2 – *P. sp.* 139 in A (×1000); 3 – *P. putida* C11 in A (×100); 4 – *P. putida* C11 in A (×1000); 5 – *P. putida* C11 in М9 (×100); 6 – *P. putida* C11 in М9 (×1000); 7 – *P. chlororaphis* 449 in М9 (×100); 8 – *P. chlororaphis* 449 in М9 (×1000); 9 – *P. chlororaphis* 449 in А (×100); 10 – *P. chlororaphis* 449 in А (×1000); 11 – *P. putida* B-40 in М9 (×100); 12 – *P. putida* B-40 in М9 (×1000); 13 – *P. putida* B-40 in А (×100); 14 – *P. putida* B-40 in А (×1000); 15 – *P. fluorescens* 8305 in М9 (×100); 16 – *P. fluorescens* 8305 in М9 (×1000); 17 – *P. fluorescens* 8305 in А (×100); 18 – *P. fluorescens* 8305 in А (×1000); 19 – *P. aurantiaca* B-162 in А (×100); 20 – *P. aurantiaca* B-162 in А (×1000); 21 – *P. aurantiaca* B-162 in М9 (×100); 22 – *P. aurantiaca* B-162 in М9 (×1000); 23 – *P. putida* KMBY 4308 in А (×100); 24 – *P. putida* KMBY 4308 in А (×1000); 25 – *P. putida* KMBY 4308 in М9 (×100); 26 – *P. putida* KMBY 4308 in М9 (×1000); 27 – *P. putida* F19 in А (×100); 28 – *P. putida* F19 in А (×1000); 29 – *P. putida* F19 in М9 (×100); 30 – *P. putida* F19 in М9 (×1000); 31 – *P. vesicatoria* BKMB-546 in М9 (×100); 32 – *P. vesicatoria* BKMB-546 in М9 (×1000); 33 – *P. vesicatoria* BKMB-546 in А (×100); 34 – *P. vesicatoria* BKMB-546 in А (×1000); 35 – *P. fluorescens* BKMB-561 in М9 (×100); 36 – *P. fluorescens* BKMB-561 in М9 (×1000); 37 – *P. fluorescens* BKMB-561 in А (×100); 38 – *P. fluorescens* BKMB-561 in А (×1000); 39 – *P. fluorescens* B-24 in М9 (×100); 40 – *P. fluorescens* B-24 in М9 (×1000); 41 – *P. fluorescens* B-24 in А (×100); 42 – *P. fluorescens* B-24 in А (×1000); 43 – *P. fluorescens* 896 in М9 (×100); 44 – *P. fluorescens* 896 in М9 (×1000); 45 – *P. fluorescens* 896 in А (×100); 46 – *P. fluorescens* 896 in А (×1000); 47 – *P. aureofaciens* B-161 in М9 (×100); 48 – *P. aureofaciens* B-161 in М9 (×1000); 49 – *P. aureofaciens* B-161 in А (×100); 50 – *P. aureofaciens* B-161 in А (×1000); 51 – *P. aurantiaca* B-14 in М9 (×100); 52 – *P. aurantiaca* B-14 in М9 (×1000); 53 – *P. aurantiaca* B-14 in А (×100); 54 – *P. aurantiaca* B-14 in А (×1000); *the difference in the experience with the control is statistically significant when $p \leq 0.05$

Логично предположить, что интенсивное развитие корневой системы должно приводить к увеличению урожайности растений. Влияние обработки семян бактериальными суспензиями трех наиболее перспективных штаммов – *P. putida* В-40, *P. vesicatoria* ВКМВ-546 и *P. fluorescens* 8305 – на продуктивность растений изучали с использованием кресс-салата сорта Звучайны, при этом семена высевали в стерильный почвогрунт, а затем проводили обработку разведенными водой бактериальными культурами. За продуктивность принимали вес сырой и сухой массы побегов 10-дневных проростков в пересчете на одно растение (рис. 2). Как видно из представленных данных, обработка бактериями *P. putida* В-40, *P. vesicatoria* ВКМВ-546 и *P. fluorescens* 8305 в среде М9 (разведение в 100 раз) приводит к прибавке сырой (до 22 % при обработке *P. fluorescens* 8305) и сухой (до 10 % при обработке *P. putida* В-40) массы растений.

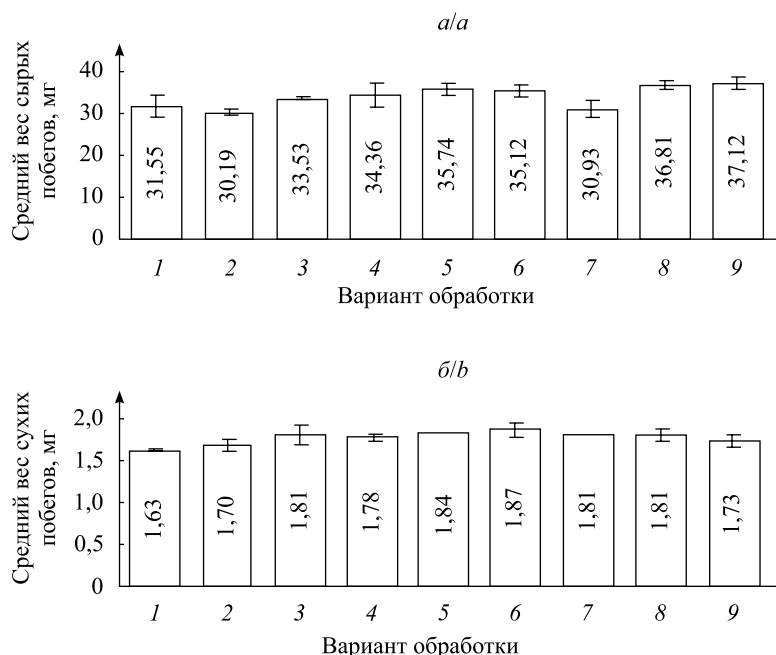


Рис. 2. Изменение массы сырых (а) и сухих (б) 10-дневных побегов кресс-салата после обработки семян бактериальными культурами при разведении в 100 (×100) и 1000 (×1000) раз:

- 1 – обработка водой; 2 – средой М9 (×100); 3 – средой М9 (×1000);
4 – бактериями *P. vesicatoria* ВКМВ-546, выращенными в среде М9 (разведение в 100 раз перед использованием);
5 – *P. vesicatoria* ВКМВ-546 в М9 (×1000); 6 – *P. putida* В-40 в М9 (×100); 7 – *P. putida* В-40 в М9 (×1000);
8 – *P. fluorescens* 8305 в М9 (×100); 9 – *P. fluorescens* 8305 в М9 (×1000)

Fig. 2. Change in the weight of raw (a) and dry (b) 10-day shoots of watercress

after seed inoculation with bacterial cultures diluted 100 (×100) and 1000 (×1000) times:

- 1 – inoculation with water; 2 – inoculation with M9 medium (diluted 100 times); 3 – M9 (diluted 1000 times);
4 – inoculation with *P. vesicatoria* ВКМВ-546 bacteria, grown in M9 and diluted 100 times before use;
5 – *P. vesicatoria* ВКМВ-546 in М9 (×1000); 6 – *P. putida* В-40 in М9 (×100); 7 – *P. putida* В-40 in М9 (×1000);
8 – *P. fluorescens* 8305 in М9 (×100); 9 – *P. fluorescens* 8305 in М9 (×1000)

Таким образом, продемонстрировано, что непатогенные бактерии *Pseudomonas* – антагонисты возбудителей болезней растений – способны улучшать биодоступность фосфатов и азота, а также стимулировать корнеобразование растений. При использовании различных препаратов 14 бактериальных культур зафиксирована достоверная прибавка длины корней до 90 %, что приводит к увеличению продуктивности растений.

Библиографические ссылки

1. Максимов И. В., Абизильдина Р. Р., Пусенкова Л. И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 4. С. 373–385.
2. Максимова Н. П., Храмова Е. А., Феклистова И. Н. и др. Генетические подходы к созданию штаммов – продуцентов биологически активных соединений у бактерий *Pseudomonas* // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2009. Т. 4 : в 2 ч. Ч. 2. С. 15–55.
3. Kaneda T., Roxburg J. A methanol utilizing bacterium // Canad. J. Microbiol. 1959. Vol. 5, № 2. P. 187–198.
4. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Publications, 1989.

5. Fredericq P. Colicins // *Annu. Rev. Microbiol.* 1957. Vol. 2, № 1. P. 7–22.
6. Сэги Ы. Методы почвенной микробиологии. Минск : Колас, 1983.
7. Желдакова Р. А., Мямин В. Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск : БГУ, 2006.
8. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести : ГОСТ 12098–84. Введ. 01.07.86. М. : Министерство сельского хозяйства СССР, 1984.
9. Vansuyt G., Robin A., Briat J. F., et al. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2007. Vol. 20, № 4. P. 441–447.
10. Mesquita C. S., Soares-Castro P., Santos P. M. *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance // *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* / ed. by A. Méndez-Vilas. 2013. Vol. 1. P. 650–665.

References

1. Maksimov I. V., Abizgil'dina R. R., Pusenkova L. I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011. Vol. 47, No. 4. P. 373–385 (in Russ.).
2. Maximova N. P., Khramtsova E. A., Feklistova I. N., et al. Genetic approaches for creation of strains-producers of biologically active compounds. *Proc. of the Belarus. State Univ. Ser.: Physiol., biochem. and mol. biol. sci.* 2009. Vol. 4 : in 2 parts. Part 2. P. 15–55 (in Russ.).
3. Kaneda T., Roxburg J. A methanol utilizing bacterium. *Canad. J. Microbiol.* 1959. Vol. 5, No. 2. P. 187–198.
4. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Publications, 1989.
5. Fredericq P. Colicins. *Annu. Rev. Microbiol.* 1957. Vol. 2, No. 1. P. 7–22.
6. Segi Y. *Soil microbiology methods*. Minsk : Kolas, 1983 (in Russ.).
7. Zheldakova R. A., Myamin V. Y. *The phytopathogenic microorganisms*. Minsk : Belarusian State University, 2006 (in Russ.).
8. Seeds of agricultural crops. Methods for determination of germination : GOST 12098–84. Put into use 01.07.86. Moscow : Ministry of Agriculture of the USSR, 1984 (in Russ.).
9. Vansuyt G., Robin A., Briat J. F., et al. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2007. Vol. 20, No. 4. P. 441–447.
10. Mesquita C. S., Soares-Castro P., Santos P. M. *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. 2013. Vol. 1. P. 650–665.

Статья поступила в редколлегию 13.09.2017.

Received by editorial board 13.09.2017.

УДК 631.52;630.165.3;577.21

СОХРАНЕНИЕ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ У ЭЛИСИТОРНОГО БИОПРЕПАРАТА СПОСОБНОСТИ ИНДУЦИРОВАТЬ СИСТЕМНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ

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

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

Установлено, что хранение при комнатной температуре в течение 6 месяцев элиситорного препарата на основе бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *Bacillus subtilis* 494 не снижает его способности индуцировать системную устойчивость растений. Это проявляется в достоверном увеличении морфологических параметров обработанных препаратом проростков рапса в экспериментальных условиях действия засоления.

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

Образец цитирования:

Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Скакун Т. Л., Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Сохранение в процессе хранения у элиситорного биопрепарата способности индуцировать системную устойчивость // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 63–67.

For citation:

Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., Maslak D. V., Sadovskaya L. E., Skakun T. L., Feklistova I. N., Maximova N. P. The elicitor preparation retains the ability to induce systemic resistance during storage. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 63–67 (in Russ.).

Авторы:

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

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

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

Диана Викторовна Маслак – заведующий сектором молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов кафедры генетики биологического факультета.

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

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

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

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

Authors:

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

grineva_ia@mail.ru

Yuliya M. Kuleshova, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

yuliakuleshova@yahoo.co.uk

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

nikaglad@gmail.com

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

diana-maslak@yandex.ru

Ludmila E. Sadovskaya, senior researcher at the research laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.

ludmilasadovskaya@rambler.ru

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

stanyisik@yandex.ru

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

feklistova_iren@rambler.ru

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

nataliamaximova@yahoo.com

THE ELICITOR PREPARATION RETAINS THE ABILITY TO INDUCE SYSTEMIC RESISTANCE DURING STORAGE

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

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

Corresponding author: I. A. Grineva (grineva_ia@mail.ru)

It was established that the elicitor preparation based on bacteria *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 and *Bacillus subtilis* 494 retains the ability to induce systemic resistance for six months at room temperature, and increases reliably the morphological parameters of preparation-processed rapeseed plants under the salinity conditions.

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

В научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ в рамках государственной программы «Научные технологии и техника» на 2016–2020 гг. разрабатывается биопрепарат, принадлежащий к новой группе средств защиты растений на основе элиситоров, которые являются более совершенными по сравнению с традиционными химическими средствами. В результате действия такого препарата у растений повышается способность противостоять неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам окружающей среды с помощью собственных метаболитов [1]. Разрабатываемый элиситорный препарат создан на основе культуральных жидкостей PGPR-бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *Bacillus subtilis* 494, может быть использован в низких концентрациях, которые достаточны для индукции иммунного отклика растений, что приводит к более полной реализации защитного генетического потенциала растений [2; 3]. Токсико-гигиеническая безопасность элиситорного препарата подтверждена заключением РУП «Научно-практический центр гигиены».

Выдвинуто предположение, что элиситорный препарат на основе инактивированных бактерий будет сохранять свои фитопротекторные свойства длительное время при хранении в условиях комнатной температуры.

Материалы и методы исследований

В работе использован штамм бактерий *Pseudomonas* флуоресцирующей группы из коллекции биологического факультета БГУ – *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* 162, а также штамм *B. subtilis* 494.

Посевной материал бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 получали при индивидуальном культивировании. Дальнейшее совместное культивирование бактерий указанных штаммов осуществляли в колбах Эрленмейера с 50 мл среды на основе солевого концентрата М9 с мелассой (0,2 %); общее количество посевного материала составляло 5 %, соотношение штаммов в посевном материале равнялось 1 : 1; культивирование проводили при 28 °С в течение 4 ч, затем – при 35 °С до 48 ч; титр каждого штамма бактерий в образцах был не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ.

Для получения элиситорного препарата культивированную вышеописанным методом бактериальную суспензию термически обрабатывали при 100 °С в течение 15 мин, хранили при комнатной температуре в герметично и стерильно закупоренных стеклянных сосудах.

Для изучения сохранения способности индуцировать устойчивость к засолению образцами элиситорных препаратов семена рапса сорта Зорный проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри с 5 мл раствора NaCl (концентрация составляла 150 ммоль/л) и элиситорным препаратом, разведенным в 1000 раз. Результаты экспериментов оценивали по изменениям параметров роста семидневных проростков.

Результаты исследований и их обсуждение

Полученный элиситорный препарат сразу после приготовления был протестирован на способность индуцировать системную устойчивость у растений. Установлено, что применение элиситорного препарата повышало устойчивость растений рапса в условиях засоления (раствор NaCl в концентрации 150 ммоль/л), что проявилось в достоверном увеличении длины стебля на 41,54 % и длины корня – на 77,98 % по сравнению с контролем (рис. 1 и 2, а).

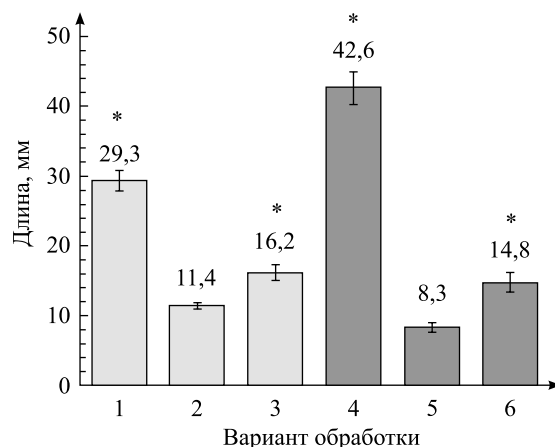


Рис. 1. Длина побегов (□) и корней (■) растений рапса в случае засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л при использовании свежеприготовленного образца элиситорного препарата:
1 и 4 – обработка водой (контроль);
2 и 5 – обработка водой, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л (контроль);
3 и 6 – обработка элиситорным препаратом, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л;
*выборки статистически значимо различаются при $p < 0,05$

Fig. 1. Length of shoots (□) and roots (■) of rape plants treated with a freshly prepared elicitor preparation under salinity conditions (150 mmol/l NaCl):
1 and 4 – water treatment (control);
2 and 5 – water treatment, salinity 150 mmol/l NaCl (control);
3 and 6 – treatment with elicitor preparation, salinity 150 mmol/l NaCl;
*samples are statistically significantly different at $p < 0.05$

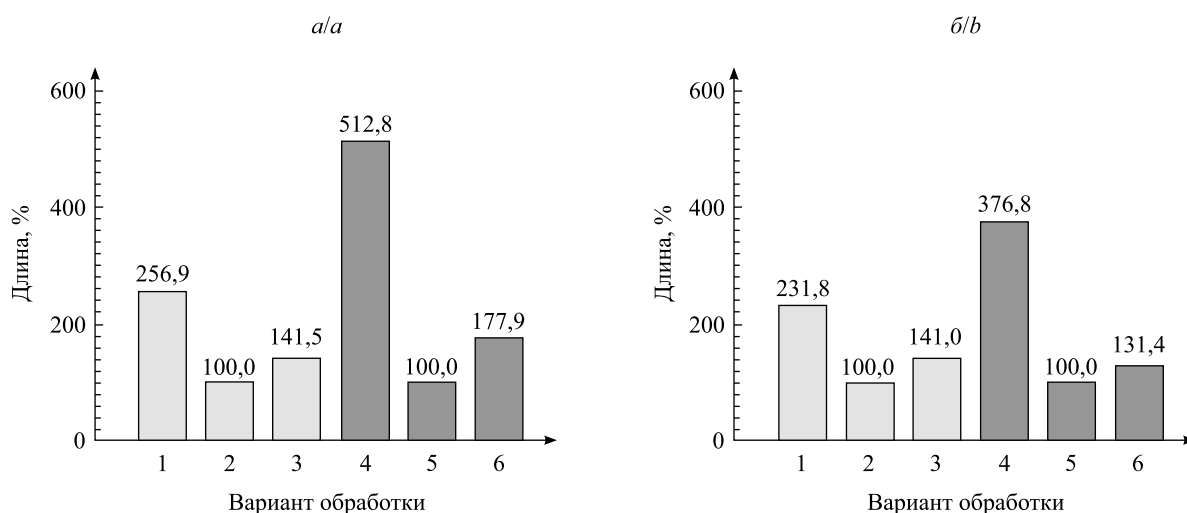


Рис. 2. Длина побегов (□) и корней (■) растений рапса в случае засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л при использовании образцов элиситорного препарата, %:
а – обработка свежеприготовленным элиситорным препаратом;
б – обработка элиситорным препаратом, хранившимся 6 месяцев;
1 и 4 – обработка водой (контроль);
2 и 5 – обработка водой, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л (контроль);
3 и 6 – обработка элиситорным препаратом, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л

Fig. 2. Length of shoots (□) and roots (■) of rape plants (in %) treated with samples of the elicitor preparation under salinity conditions (150 mmol/l NaCl):
а – treatment with freshly prepared elicitor preparation;
б – treatment with elicitor preparation, stored for 6 months;
1 and 4 – water treatment (control);
2 and 5 – water treatment, salinity 150 mmol/l NaCl (control);
3 and 6 – treatment with elicitor preparation, salinity 150 mmol/l NaCl

После тестирования элиситорный препарат стерильно укупорили в стеклянную тару и хранили при комнатной температуре 6 месяцев. Затем был проведен повторный эксперимент по обработке элиситорным препаратом растений рапса того же сорта в условиях засоления.

Установлено, что применение элиситорного препарата, хранившегося в течение 6 месяцев, также положительно повлияло на устойчивость растений рапса в условиях засоления (раствор NaCl в концентрации 150 ммоль/л), что проявилось в достоверном увеличении длины стебля на 41,03 % и длины корня – на 31,36 % (рис. 2, б, и 3).

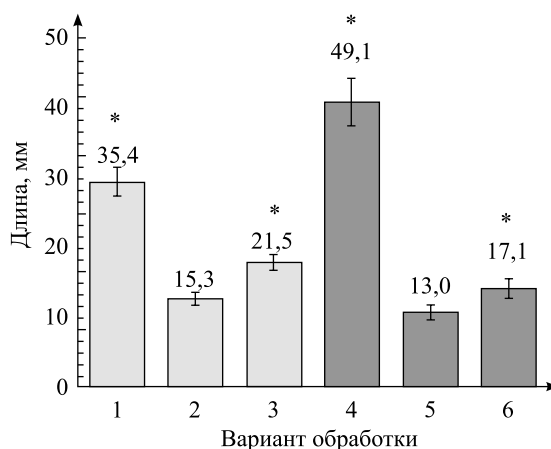


Рис. 3. Длина побегов (□) и корней (■) растений рапса в случае засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л при использовании образца элиситорного препарата после 6-месячного хранения при комнатной температуре:

- 1 и 4 – обработка водой (контроль);
2 и 5 – обработка водой, засоление раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л (контроль);
3 и 6 – обработка элиситорным препаратом, засоление NaCl в концентрации 150 ммоль/л;
*выборки статистически значимо различаются при $p < 0,05$

Fig. 3. Length of shoots (□) and roots (■) of rape plants treated with elicitor preparation after six months of storage at room temperature under salinity conditions (150 mmol/l NaCl):

- 1 and 4 – water treatment (control);
2 and 5 – water treatment, salinity 150 mmol/l NaCl (control);
3 and 6 – treatment with elicitor preparation, salinity 150 mmol/l NaCl;
*samples are statistically significantly different at $p < 0.05$

Следует отметить, что длина корня рапса при использовании свежеприготовленного биопрепарата увеличилась на 77 % по сравнению с контролем, а при применении хранившегося препарата – на 33 %. Это явление может быть связано с сезоном проведения экспериментов (в первом случае – весна, во втором – осень), что подтверждается изменением длины корня контрольных растений, выращиваемых без засоления.

Таким образом, в результате проведенных лабораторных исследований на растениях рапса в условиях засоления (раствор NaCl в концентрации 150 ммоль/л) установлено, что биопрепарат на основе бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* 162 и *B. subtilis* 494 сохраняет свои элиситорные свойства не менее 6 месяцев при хранении в условиях комнатной температуры и способен достоверно увеличивать морфологические параметры обработанных им растений рапса в условиях действия засоления раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л.

Существенным недостатком биопрепаратов в процессе реализации является необходимость их хранения при 4 °C для проявления ими заявленных свойств. Разрабатываемый нами элиситорный препарат лишен этого ограничения. Исследования по проверке сохранения элиситорных свойств препарата, разрабатываемого в БГУ, продолжаются. Можно предположить, что срок хранения элиситорного препарата будет не менее, чем у существующих зарубежных аналогов – Агата-K25 (1,5 года) [4] и Глауксина (3 года) [5].

Данные об индукции устойчивости у растений длительное время хранившимся термически обработанным биопрепаратом согласуются с информацией о том, что элиситорные свойства биологических препаратов связаны с наличием в них фрагментов клеток и метаболитов бактерий [6]. В случае хранения в стерильных условиях при комнатной температуре элиситорные молекулы разрабатываемого биопрепарата в течение 6 месяцев не потеряли способности индуцировать у растений устойчивость к засолению.

Библиографические ссылки

1. Соколов Ю. А. Элиситоры и их применение в растениеводстве. Минск : Беларуская навука, 2016.
2. Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А. и др. Индукция устойчивости у растений рапса к засолению элиситорами – производными бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 38–43.
3. Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А. и др. Индукция устойчивости у растений рапса к засолению элиситорным препаратом на основе бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : тез. докл. X Междунар. науч. конф. (Минск, 5–9 июня 2017 г.). Минск, 2017. С. 130–132.
4. «Агат-25К» – биологический препарат с фунгицидной и ростостимулирующей активностью [Электронный ресурс]. URL: <http://www.agat-25k.ru/agat-25k/> (дата обращения: 20.08.2017).
5. Глауксин (весна) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gardenbio.ru/products/1/> (date of access: 20.08.2017).
6. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore : Springer Science : Business Media, 2016.

References

1. Sokolov Y. A. Elicitors and their application in plant growing. Minsk : Belaruskaja navuka, 2016 (in Russ.).
2. Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., et al. Induction of resistance to salinization in rape plants under the influence of elicitors derived from *Pseudomonas* and *Bacillus* bacteria. *J. Belarus. State Univ.* 2017. No. 1. P. 38–43 (in Russ.).
3. Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., et al. Induction of resistance in plants of rape to salinity with an elicitor preparation based on the bacteria *Pseudomonas* and *Bacillus*. *Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects* : abstr. of the X Int. sci. conf. (Minsk, 5–9 June, 2017). Minsk, 2017. P. 130–132 (in Russ.).
4. «Agat-25K» biological preparation with fungicidal and growth-stimulating activity. URL: <http://www.agat-25k.ru/agat-25k/> (date of access: 20.08.2017) (in Russ.).
5. Glaucin (spring). URL: <http://www.gardenbio.ru/products/1/> (date of access: 20.08.2017) (in Russ.).
6. Choudhary D., Varma A. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. Singapore : Springer Science : Business Media, 2016.

Статья поступила в редколлегию 13.09.2017.

Received by editorial board 13.09.2017.

УДК 592:502.4(476)

ФАУНА ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ВОДОТОКОВ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА «БЕЛОВЕЖСКАЯ ПУЩА»

М. Д. МОРОЗ¹⁾, В. М. БАЙЧОРОВ¹⁾, Ю. Г. ГИГИНЯК¹⁾

¹⁾Государственное научно-производственное объединение «Научно-практический центр
НАН Беларуси по биоресурсам», ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Рассмотрены результаты исследований водных беспозвоночных девяти речных экосистем Национального парка «Беловежская пушта». Обнаружены 106 видов, относящихся к 3 типам беспозвоночных животных: Mollusca – 27, Annelida – 7 и Arthropoda – 72. Наиболее богатая фауна водных беспозвоночных была представлена в реках Немержанке и Наревке. Большая численность группировки видов, имеющих реофильные свойства, является важной экологической особенностью изученных экосистем и, очевидно, указывает в целом на достаточно высокое качество вод в изученных водотоках. Доминирующий вид – *Nemoura cinerea* (Retzius, 1783). Исследования позволили выявить 22 вида беспозвоночных, которые ранее не регистрировались на территории Национального парка «Беловежская пушта».

Ключевые слова: водотоки; таксономическая структура; редкие виды; охраняемые и инвазивные виды; Беларусь.

Образец цитирования:

Мороз М. Д., Байчоров В. М., Гигиняк Ю. Г. Фауна водных беспозвоночных водотоков Национального парка «Беловежская пушта» // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 68–75.

For citation:

Moroz M. D., Baitchorov V. M., Giginia Ju. G. Fauna of aquatic invertebrate water currents of National Park «Belovezhskaja Pusthia». *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 68–75 (in Russ.).

Авторы:

Михаил Дмитриевич Мороз – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории гидробиологии.

Владимир Мухтарович Байчоров – доктор биологических наук; заведующий сектором кадастра и учета животных.

Юрий Григорьевич Гигиняк – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник сектора кадастра и учета животных.

Authors:

Michail D. Moroz, PhD (biology), docent; chief researcher at the laboratory of hydrobiology.

mdmoroz@bk.ru

Vladimir M. Baitchorov, doctor of science (biology); head of the sector of the inventory and accounting of animals.

vbaitch@gmail.com

Juriyi G. Giginiaak, PhD (biology), docent; chief researcher at the sector of the inventory and accounting of animals.

antarctida_2010@mail.ru

FAUNA OF AQUATIC INVERTEBRATE WATER CURRENTS OF NATIONAL PARK «BELOVIEZSKAJA PUSTCHIA»

M. D. MOROZ^a, V. M. BAITCHOROV^a, Ju. G. GIGINIAK^a

^aState scientific and production amalgamation «The Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources», 27 Akadjemichnaya Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: M. D. Moroz (mdmoroz@bk.ru)

The aquatic invertebrate ten river ecosystems of National Park «Beloviezskaja Pustchia» were studied. 106 species of aquatic invertebrate belonging to 3 types: Mollusca – 27, Annelida – 7 and Arthropoda – 72 species were registered. The richest fauna of aquatic invertebrates has been presented in the rivers Nemerzhanka and Narevka. The big number of group of the types having reofilic properties is important ecological feature of the studied ecosystems and, obviously, specifies in general rather high quality of waters in the studied rivers. *Nemoura cinerea* (Retzius, 1783) was dominating species. Researches have allowed to reveal 22 species which weren't registered that territories of National Park «Beloviezskaja Pustchia».

Key words: waterways; taxonomical structure; rare species; the protected and invasive species; Belarus.

Введение

Водные беспозвоночные животные играют важную роль в трансформации вещества и энергии в стоячих и текущих континентальных водоемах. Они составляют определенную часть рациона некоторых видов рыб, земноводных и птиц. Отдельные представители бентосных организмов сами, в свою очередь, могут являться регуляторами численности представителей других таксономических групп водных беспозвоночных. Тем не менее необходимо признать, что в настоящее время базовых данных о видовом составе и численности этих животных, обитающих в водоемах Национального парка «Беловежская пушча», недостаточно или они фрагментарны [1–8], что и определило цель наших исследований.

Национальный парк «Беловежская пушча» занимает площадь 153 тыс. га, расположен на границе с Республикой Польша. Беловежская пушча является одной из старейших природных охраняемых территорий Европы. Первые сведения об охране этой территории относятся к XV в. Современный природный охранный статус – Национальный парк «Беловежская пушча» – установлен в 1991 г. [9].

Беловежская пушча занимает восточный выступ бассейна р. Вислы, который образован притоками рек Буг, Нарев (северная и центральная части массива) и р. Правой Лесной (южная часть). С севера и северо-востока к ним примыкают бассейны р. Неман и р. Припяти, причем водораздел Балтийского и Черного морей проходит в непосредственной близости от границ лесного массива Беловежской пушчи. Река Нарев берет начало за пределами Беловежской пушчи, пересекает болото Дикое, затем северную часть Беловежской пушчи с востока на запад и имеет заболоченную узкую пойму. Река Правая Лесная берет начало на территории Польши, течет в юго-восточном направлении и пересекает южную границу национального парка. Там она сливается с р.левой Лесной, образуя р. Лесную, впадающую в р. Буг севернее Бреста. Реки Нарев, Наревка и Правая Лесная принимают ряд небольших речек и ручьев: Гвозну, Соломенку, Переровницу, Переволоку и др., истоки которых находятся в пределах Беловежской пушчи.

Проведены исследования водных беспозвоночных из девяти следующих рек [10]:

- Колонка: длина – 34 км (в том числе в границах Польши – 5 км), средний наклон водной поверхности – 1,0 ‰, канализовано около 17 км русла;
- Нарев (правый приток р. Вислы): длина – 484 км, из них 448 км – на территории Польши, бассейн занимает 75 175 км²;
- Гвозна: длина – 19 км, из них в Беларуси – 8 км, русло канализовано;
- Наревка: общая длина – 61 км, на территории Беларуси – 21,3 км, русло канализовано, площадь водосбора – 303 км², средний наклон водной поверхности – 1,4 ‰;
- Правая Лесная: длина – 63 км, бассейн занимает 996 км²;
- Белая: длина – 10,1 км, полностью канализована;
- Короватка: длина – 6 км, скорость течения – 2,2 м/с, площадь водосбора – 0,25 км²;
- Немержанка: длина – 8 км, от вытока 3 км канализованы;
- Рудавка: длина – 23 км, площадь водосбора – 138 км², 7 км канализованы.

Материалы и методы исследований

Сборы беспозвоночных животных проводились в апреле 2016 г. Взятие проб осуществлялось при помощи стандартного гидробиологического сачка (25 × 25 см, 500 мкм) методом траления в прибрежной части водоемов рек на глубине от 0,5 м. Методика отбора проб в створах проведена согласно европейскому протоколу AQEM и стандарту ISO 7828. Кроме того, в местах развития макрофитов производилась выемка торфа и коряг с их последующим осмотром и отбором животных. Образцы макрозообентосных объектов фиксировали 96 % спиртом.

За время исследований собраны и проанализированы 10 проб в водотоках на территории Национального парка «Беловежская пуща». Изучены 3078 экз. водных беспозвоночных, находящихся на личиночной и имагинальной стадиях развития.

Исследования были проведены на 10 станциях (створах) изученных рек со следующими координатами:

Колонка: 52° 56,883' с. ш., 24° 00,365' в. д.;

Нарев: 52° 52,388' с. ш., 23° 59,357' в. д.;

Гвозна: 52° 44,543' с. ш., 24° 00,104' в. д.;

Наревка: 52° 40,523' с. ш., 23° 56,307' в. д.;

Правая Лесная: 52° 34,007' с. ш., 23° 46,642' в. д.;

Белая: 52° 34,699' с. ш., 23° 44,169' в. д.;

Короватка: 52° 33,860' с. ш., 23° 37,006' в. д.;

Немержанка: 52° 49,842' с. ш., 24° 01,831' в. д.;

Рудавка: 52° 50,492' с. ш., 24° 04,909' в. д.;

Нарев: 52° 50,470' с. ш., 24° 02,227' в. д.

Результаты исследований и их обсуждение

Всего было выявлено 106 видов водных беспозвоночных животных (представителей макрозообентосного и плейстонного комплексов), относящихся к 3 типам беспозвоночных животных: Mollusca – 27, Annelida – 7 и Arthropoda – 72 (таблица).

Анализ видового обилия показал, что наиболее богатая фауна водных беспозвоночных была представлена в реках Немержанке и Наревке. В первой были зарегистрированы 38 видов (36,5 % всех выявленных водных беспозвоночных), во второй – 34 вида (32,7 % соответственно).

Важной особенностью выявленного комплекса водных беспозвоночных изученных рек в Национальном парке «Беловежская пуща» является то, что среди них около трети (26,9 %) составляют виды, в основном проявляющие реофильные и оксифильные свойства (отряды Plecoptera, Ephemeroptera и Trichoptera). Представители этих отрядов также преобладали и количественно (64,9 % относительной численности всех собранных водных беспозвоночных).

Можно предположить, что достаточно большая численность группировки видов, имеющих реофильные свойства, является важной экологической характеристикой изученных текучих экосистем и, очевидно, указывает в целом на высокое качество вод в изученных водотоках.

Доминирующим видом оказалась веснянка *Nemoura cinerea* (Retzius, 1783) при численности 696 экз. (22,6 % общей численности всех собранных водных беспозвоночных). Причем необходимо отметить, что этот вид был зарегистрирован во всех изученных реках, имеет транспалеарктический ареал. Личинки встречаются от малых ручьев до крупных рек, озер, прудов и родников. Вид считается пресноводным убикистом среди веснянок [10]. В Беларуси *Nemoura cinerea* является одним из самых обычных видов веснянок, в Полесском регионе обитание личинок отмечено даже во временных весенних ручьях [5]. Жизненный цикл вида, как правило, составляет один год, при неблагоприятных условиях – два. Лёт имаго наблюдается в мае – сентябре.

Проведенные исследования позволили также выявить 22 вида гидробионтов, которые ранее не были отмечены в водоемах на территории Национального парка «Беловежская пуща» [1–8]. К этим водным беспозвоночным относятся следующие виды: моллюски (Mollusca) – *Radix ampla* (Hartmann, 1821), *Radix balthica* (Linnaeus, 1758), *Anisus vortex* (Linnaeus, 1758), *Gyraulus crista* (Linnaeus, 1758); пиявки (Hirudinea) – *Glossiphonia concolor* (Apáthy, 1888), *Theromyzon tessulatum* (O. F. Müller, 1774), *Erpobdella lineata* (O. F. Müller, 1774), *Erpobdella nigricollis* (Brandes, 1900); паукообразные (Aranei) – *Tetragnatha extensa* (Linnaeus, 1758); ногохвостки (Collembola) – *Podura aquatica* (Linnaeus, 1758), *Isotoma viridis* Bourlet 1839, *Isotomurus palustris* (O. F. Müller, 1776); веснянка (Plecoptera) – *Nemoura cinerea* (Retzius, 1783); поденки (Ephemeroptera) – *Baetis vernus* Curtis, 1834 и *Caenis robusta* Eaton, 1884; ручейники (Trichoptera) – *Chaetopteryx villosa* (Fabricius 1798) и *Limnephilus politus* McLachlan, 1865; стрекозы (Odonata) – *Coenagrion puella* Linnaeus, 1758 и *Coenagrion pulchellum* (Vander Linden, 1825); полужесткокрылые (Heteroptera) – *Sigara falleni* (Fieber, 1848) и *Sigara striata* (Linnaeus, 1758); чешуекрылые (Lepidoptera) – *Parapoynx stratiotata* (Linnaeus, 1758).

Видовой состав и распределение водных беспозвоночных, коллектированных
в водотоках Национального парка «Беловежская пуща»

Specific structure and distribution aquatic the invertebrate,
collected in waterways of National Park «Belowiezskaia Pusthia»

№ п/п	Таксон	Створы*, экз.										Σ, экз.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Тип Mollusca	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Класс Gastropoda	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Отряд Architaenioglossa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Семейство Viviparidae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	<i>Viviparus contectus</i> (Millet, 1813)	—	—	1	—	2	—	—	—	—	1	4
2	<i>Viviparus viviparus</i> (Linnaeus, 1758)	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
	Отряд Neotaenioglossa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	<i>Bithynia leachi</i> (Sheppard, 1823)	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
4	<i>Bithynia tentaculata</i> (Linnaeus, 1758)	2	—	11	12	3	—	6	19	1	2	56
	Отряд Ectobranchia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	<i>Valvata cristata</i> (O. F. Müller, 1774)	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
	Отряд Pulmonata	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	<i>Acroloxus lacustris</i> (Linnaeus, 1758)	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
7	<i>Galba truncatula</i> (O. F. Müller, 1774)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3
8	<i>Galba</i> sp.	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
9	<i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	—	—	—	2	2	—	16	1	1	—	22
10	<i>Radix ampla</i> (Hartmann, 1821)	1	—	—	—	3	—	—	—	—	—	4
11	<i>Radix balthica</i> (Linnaeus, 1758)	—	—	—	1	—	—	9	2	—	—	12
12	<i>Radix</i> sp.	—	1	—	1	—	—	—	—	—	1	3
13	<i>Aplexa hypnorum</i> (Linnaeus, 1758)	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
14	<i>Physa fontinalis</i> (Linnaeus, 1758)	2	—	9	1	1	—	—	11	—	—	24
15	<i>Anisus vortex</i> (Linnaeus, 1758)	—	—	—	1	2	—	1	—	—	—	4
16	<i>Bathyomphalus contortus</i> (Linnaeus, 1758)	1	—	3	—	1	—	1	2	1	—	9
17	<i>Gyraulus albus</i> (O. F. Müller, 1774)	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
18	<i>Gyraulus crista</i> (Linnaeus, 1758)	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
19	<i>Planorbis corneus</i> (O. F. Müller, 1774)	—	—	13	—	—	—	6	6	—	—	25
20	<i>Planorbis planorbis</i> (Linnaeus, 1758)	—	—	—	2	4	—	—	—	—	—	6
21	<i>Segmentina nitida</i> (O. F. Müller, 1774)	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	4
	Класс Bivalvia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Отряд Unionoida	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	<i>Anodonta cygnea</i> Linnaei, 1758	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
	Отряд Veneroidea	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	<i>Pisidium amnicum</i> (O. F. Müller, 1774)	—	—	—	—	2	2	1	—	—	—	5
24	<i>Pisidium casertanum</i> (Poli, 1791)	—	—	—	5	—	—	—	2	—	—	7
25	<i>Pisidium subtruncatum</i> Malm, 1855	—	—	—	24	—	11	1	2	1	—	39
26	<i>Sphaerium corneum</i> (Linnaeus, 1758)	3	—	—	4	—	—	—	2	—	—	9
27	<i>Pisidium</i> sp.	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1

Продолжение таблицы
Continuation table

№ п/п	Таксон	Створы*, экз.										Σ, экз.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Тип Annelida	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Класс Oligochaeta	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1	<i>Oligochaeta gen. spp.</i>	–	2	3	3	4	4	1	2	1	2	22
	Класс Hirudinea	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	<i>Glossiphonia concolor</i> (Apáthy, 1888)	–	–	–	2	–	1	1	–	–	–	4
3	<i>Theromyzon tessulatum</i> (O. F. Müller, 1774)	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	1
4	<i>Haemopsis sanguisuga</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–	2
5	<i>Erpobdella octoculata</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	3	1	–	2	3	2	–	–	11
6	<i>Erpobdella lineata</i> (O. F. Müller, 1774)	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	1
7	<i>Erpobdella nigricollis</i> (Brandes, 1900)	–	–	1	–	–	–	–	1	–	–	2
	<i>Erpobdella sp. (?)</i>	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1
	Тип Arthropoda	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Класс Arachnida	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Отряд Prostigmata	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1	<i>Hydrachnidae gen. spp.</i>	3	–	–	4	–	–	–	–	–	–	7
	Отряд Araneae	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	<i>Pirata sp.</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1
3	<i>Tetragnatha extensa</i> (Linnaeus, 1758)	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3
	Класс Crustacea	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Отряд Isopoda	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	<i>Asellus aquaticus</i> (Linnaeus, 1758)	7	1	26	31	7	19	3	16	3	7	120
	Отряд Amphipoda	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	<i>Gammarus lacustris</i> Sars, 1863	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	1
6	<i>Gammarus varsoviensis</i> Jazdzewski, 1975	–	–	–	–	16	15	31	–	–	–	62
	Класс Insecta	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Отряд Collembola	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	<i>Podura aquatica</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	23	–	1	–	–	–	1	–	25
8	<i>Isotoma viridis</i> (Bourlet, 1839)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	2
9	<i>Isotomurus palustris</i> (O. F. Müller, 1776)	–	4	–	–	–	–	–	–	1	–	5
	Отряд Plecoptera	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	<i>Nemoura cinerea</i> (Retzius, 1783)	1	82	31	67	16	58	8	78	273	82	696
11	<i>Nemoura sp.</i>	–	–	–	24	–	4	–	13	6	9	56
	Отряд Ephemeroptera	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	<i>Baetis vernus</i> Curtis, 1834	12	–	–	–	5	14	–	–	–	–	31
13	<i>Centroptilum luteolum</i> (O. F. Müller, 1776)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	12	12
14	<i>Cloeon simile</i> Eaton, 1870	–	6	2	7	–	–	4	4	1	2	26
15	<i>Ephemera vulgata</i> Linnaeus, 1758	–	–	–	–	6	–	–	–	–	–	6
16	<i>Leptophlebia marginata</i> (Linnaeus, 1767)	–	8	–	–	5	–	–	–	5	4	22
17	<i>Heptagenia fuscogrisea</i> (Retzius, 1783)	–	11	–	–	–	–	–	–	1	12	24

Продолжение таблицы
Continuation table

№ п/п	Таксон	Створы*, экз.										Σ, экз.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
18	<i>Caenis horaria</i> Linnaeus, 1758	–	–	–	–	–	–	–	–	–	8	8
19	<i>Caenis robusta</i> Eaton, 1884	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–	2
Отряд Trichoptera		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	<i>Neureclipsis bimaculata</i> (Linnaeus, 1761)	13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	13
21	<i>Hydropsyche angustipennis</i> (Curtis, 1834)	9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	9
22	<i>Hydropsyche</i> sp.	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4
23	<i>Athripsodes aterrimus</i> (Stephens, 1836)	–	–	–	–	–	–	2	–	–	–	2
24	<i>Mystacides azurea</i> (Linnaeus, 1761)	–	–	–	–	–	1	–	–	–	3	4
25	<i>Triaenodes bicolor</i> (Curtis, 1834)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1
26	<i>Oxyethira</i> sp.	–	–	–	–	7	1	–	–	–	9	17
27	<i>Anabolia</i> sp.	257	89	39	6	–	127	8	3	1	91	621
28	<i>Chaetopteryx villosa</i> (Fabricius, 1798)	6	9	–	3	21	–	–	–	–	–	39
29	<i>Glyptotaelius pellucidus</i> (Retzius, 1783)	–	–	–	1	1	–	–	4	2	–	8
30	<i>Grammotaulius nigropunctatus</i> (Retzius, 1783)	–	5	7	8	–	–	2	–	1	3	26
31	<i>Limnephilus extricatus</i> McLachlan, 1865	–	–	–	–	–	1	5	–	2	–	8
32	<i>Limnephilus flavicornis</i> (Fabricius, 1787)	–	9	3	62	2	17	–	18	2	6	119
33	<i>Limnephilus fuscinervis</i> (Zetterstedt, 1840)	–	2	–	–	–	–	–	–	1	–	3
34	<i>Limnephilus politus</i> McLachlan, 1865	–	6	–	7	–	–	–	1	1	–	15
35	<i>Limnephilus rhombicus</i> (Linnaeus, 1758)	1	21	–	18	14	3	–	121	34	2	214
36	<i>Limnephilus stigma</i> Curtis, 1834	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
	<i>Limnephilus</i> sp. (?)	–	–	–	–	–	4	–	–	5	–	9
Отряд Megaloptera		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
37	<i>Sialis</i> sp.	–	–	–	1	1	1	–	–	–	–	3
Отряд Odonata		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
38	<i>Calopteryx virgo</i> (Linnaeus, 1758)	3	1	–	–	6	2	–	–	–	4	16
39	<i>Calopteryx splendens</i> (Harris, 1782)	–	–	–	–	1	–	–	–	–	2	3
	<i>Calopteryx</i> sp. (?)	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1
40	<i>Coenagrion puella</i> Linnaeus, 1758	–	–	–	–	4	–	–	18	–	–	22
41	<i>Coenagrion pulchellum</i> (Vander Linden, 1825)	–	4	–	–	–	–	–	3	–	8	15
	<i>Coenagrion</i> sp. (?)	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	1
42	<i>Platycnemis pennipes</i> (Pallas, 1771)	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	1
43	<i>Cordulia aenea</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	1
44	<i>Somatochlora flavomaculata</i> (Vander Linden, 1825)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Отряд Heteroptera		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
45	<i>Ilyocoris cimicoides</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	3
46	<i>Notonecta glauca</i> (Linnaeus, 1758)	1	–	1	–	–	–	–	–	–	–	2
47	<i>Sigara falleni</i> (Fieber, 1848)	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	1

Окончание таблицы
Ending table

№ п/п	Таксон	Створы*, экз.										Σ, экз.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
48	<i>Sigara striata</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	1
49	<i>Gerris lacustris</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1
Отряд Coleoptera		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
50	<i>Peltodytes caesus</i> (Duftschmid, 1805)	–	–	2	2	–	1	–	–	–	–	5
51	<i>Hydroporus incognitus</i> Sharp, 1869	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1
52	<i>Porhydrus lineatus</i> (Fabricius, 1775)	–	–	–	1	–	–	–	1	–	–	2
53	<i>Dytiscus dimidiatus</i> Bergsträsser, 1778	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1
54	<i>Dytiscidae</i> gen. spp.	–	–	–	–	–	–	–	2	–	–	2
55	<i>Gyrinus</i> sp.	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	3
56	<i>Anacaena limbata</i> (Fabricius, 1792)	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1
57	<i>Anacaena lutescens</i> (Stephens, 1829)	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1
58	<i>Enochrus affinis</i> (Thunberg, 1794)	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1
59	<i>Laccobius</i> sp.	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	1
	<i>Hydrophilidae</i> gen. spp. (?)	–	–	–	–	–	–	–	2	–	–	2
60	<i>Hydraena</i> sp.	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1
61	<i>Limnebius atomus</i> (Duftschmid, 1805)	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1
62	<i>Limnebius truncatellus</i> (Thunberg, 1794)	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
63	<i>Scirtidae</i> gen. spp.	–	–	14	–	1	–	–	–	–	–	15
Отряд Diptera		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
64	<i>Centropogonidae</i> gen. spp.	1	–	–	–	1	1	–	–	–	–	3
65	<i>Chironomidae</i> gen. spp.	83	42	28	7	36	9	4	7	12	94	322
66	<i>Limoniidae</i> gen. spp.	1	–	–	–	2	1	–	–	–	–	4
67	<i>Psychodidae</i> gen. spp.	1	–	–	–	–	1	–	–	–	–	2
68	<i>Simuliidae</i> gen. spp.	37	11	–	–	1	1	1	–	11	46	108
69	<i>Stratiomyidae</i> gen. spp.	–	1	5	–	–	–	–	2	–	–	8
70	<i>Tabanidae</i> gen. spp.	–	–	–	1	–	3	–	–	–	–	4
Отряд Lepidoptera		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
71	<i>Cataclysta lemnata</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	4	–	–	–	–	–	–	1	5
72	<i>Parapoynx stratiotata</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1
Число экземпляров		456	319	238	315	179	307	118	358	369	419	3078
Число видов		27	24	28	34	32	27	25	38	25	29	106

*Створы: 1 – р. Колонка; 2 – р. Нарев; 3 – р. Гвозна; 4 – р. Наревка; 5 – р. Правая Лесная; 6 – р. Белая; 7 – р. Короватка; 8 – р. Немержанка; 9 – р. Рудавка; 10 – р. Нарев.

Заключение

На основании результатов исследований можно сделать вывод о том, что в речных экосистемах Национального парка «Беловежская пуща» обитает богатая фауна водных беспозвоночных. Здесь обнаружены 106 видов представителей макрозообентосного и плейстонного комплексов, относящихся к 3 типам беспозвоночных животных: Mollusca – 27, Annelida – 7 и Arthropoda – 72.

Наиболее богатая фауна водных беспозвоночных представлена в реках Немержанке и Наревке.

Большая численность группировки видов, имеющих реофильные свойства, является важной экологической особенностью изученных экосистем и, очевидно, указывает в целом на достаточно высокое качество вод в изученных трансграничных водотоках.

Доминирующим видом являлась веснянка *Nemoura cinerea* (Retzius, 1783) при численности 696 экз. (22,6 % общей численности собранных водных беспозвоночных). Этот вид был зарегистрирован во всех изученных реках. Вид считается пресноводным убиквистом среди веснянок. В Полесском регионе обитание личинок отмечено даже во временных весенних ручьях.

Проведенные исследования позволили выявить 22 вида водных беспозвоночных, которые ранее не регистрировались на территории Национального парка «Беловежская пуща».

Библиографические ссылки

1. Гигиняк Ю. Г., Байчоров В. М., Вежновец В. В. и др. Современное состояние флоры и фауны водных объектов Национального парка «Беловежская пуща» // Беловежская пуща : сб. науч. ст. 2009. Вып. 13. С. 161–229.
2. Гигиняк И. Ю. Личинки ручейников (Trichoptera) Национального парка «Беловежская пуща» // Беловежская пуща : сб. науч. ст. 2009. Вып. 13. С. 230–242.
3. Лукашук А. О., Мороз М. Д. Водные полужесткокрылые Беларуси // Фауна, вопросы экологии, морфологии и эволюции амфибиотических и водных насекомых России : докл. III Всерос. симп. по амфибиотическим и водным насекомым и клещам (Воронеж, 12–15 сент. 2006 г.). Воронеж, 2007. С. 171–177.
4. Максименков М. В., Мороз М. Д., Гурин В. М. Редкие и охраняемые виды насекомых заказника «Дикое» // Разнообразие животного мира Беларуси: итоги изучения и перспективы сохранения : тез. междунар. конф. (Минск, 28–30 нояб. 2001 г.). Минск, 2001. С. 103–105.
5. Мороз М. Д., Липинская Т. П. Каталог поденок (Ephemeroptera), веснянок (Plecoptera) и ручейников (Trichoptera) Беларуси. Минск : Беларуская навука, 2014.
6. Мороз М. Д., Нестерович А. И. Беспозвоночные родниковых водоемов в Национальном парке «Беловежская пуща» // Фауна и флора Прибужья и сопредельных территорий на рубеже XXI столетия : материалы Междунар. науч.-практ. конф. (Брест, 20–21 дек. 2000 г.). Брест, 2000. С. 131–133.
7. Чакхоровски С., Мороз М. Д. Ручейники (Insecta: Trichoptera) особо охраняемых природных территорий Беларуси // Энтомол. обозрение. 2007. Т. 86, № 3. С. 546–556.
8. Gutowski J. M., Jaroszewicz B. Catalogue of the fauna of Białowieża Primeval Forest. Warsaw : Forest Research Institute, 2001.
9. Особо охраняемые природные территории Беларуси : справочник / под ред. Н. А. Юргенсон [и др.]. Минск : ГНПО «НПЦ “НАН Беларуси по биоресурсам”», 2012.
10. Жильцова Л. А. Веснянки (Plecoptera) Европейской части СССР (без Кавказа) // Энтомол. обозрение. 1966. Т. 45, № 3. С. 525–549.

References

1. Giginia Ju. G., Baichorov V. M., Vezhnovets V. V., et al. Current state of flora and fauna of water objects of National Park «Belovezhskaja Pustchia». *Belovezhskaja Pustchia* : collect. of sci. articles. 2009. Issue 13. P. 161–229 (in Russ.).
2. Giginia I. Yu. Larvae of caddis flies (*Trichoptera*) of National Park «Belovezhskaja Pustchia». *Belovezhskaja Pustchia* : collect. of sci. articles. 2009. Issue 13. P. 230–242 (in Russ.).
3. Lukashuk A. O., Moroz M. D. Aquatic bugs of Belarus. *Fauna, environmental issues, morphology and evolution amfibiotics and water insects of Russia* : rep. of the III All-Russian symp. on amfibiotics and water insects and mites (Voronezh, 12–15 Sept., 2006). Voronezh, 2007. P. 171–177 (in Russ.).
4. Maksimenkov M. V., Moroz M. D., Gurin V. M. Rare and protected species of insects of the wildlife area «Wild». *Variety of fauna of Belarus: results of studying and prospect of preservation* : theses Int. conf. (Minsk, 28–30 Novemb., 2001). Minsk, 2001. P. 103–105 (in Russ.).
5. Moroz M. D., Lipinskaya T. P. Catalog of mayflies (Ephemeroptera), stoneflies (Plecoptera) and caddisflies (Trichoptera) of Belarus. Minsk : Belaruskaja navuka, 2014 (in Russ.).
6. Moroz M. D., Nesterovich A. I. Invertebrates of spring reservoirs in National Park «Belovezhskaja Pustchia». *Fauna and flora of Pribuzhya and adjacent territories at a turn of the XXI century* : materials of Int. sci. and pract. conf. (Brest, 20–21 Dec., 2000). Brest, 2000. P. 131–133 (in Russ.).
7. Chakhovskii S., Moroz M. D. Caddis flies (Insecta: Trichoptera) especially protected natural territories of Belarus. *The Entomol. rev.* 2007. Vol. 86, No. 3. P. 546–556 (in Russ.).
8. Gutowski J. M., Jaroszewicz B. Catalogue of the fauna of Białowieża Primeval Forest. Warsaw : Forest Research Institute, 2001.
9. Yurgenson N. A. (ed.). Especially protected natural territories of Belarus : ref. book. Minsk : GNPO «NPTs “NAN of Belarus on Bioresources”», 2012 (in Russ.).
10. Zhiltsova L. A. Plecoptera of the European part of the USSR (without the Caucasus). *Entomol. rev.* 1966. Vol. 45, No. 3. P. 525–549 (in Russ.).

Статья поступила в редакцию 30.03.2017.
Received by editorial board 30.03.2017.

УДК 517.9, 519.6

МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ СТРУКТУРИРОВАННЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ОСЕТРОВЫХ РЫБ КАСПИЯ С УЧЕТОМ ОТКЛОНЕНИЙ В ТЕМПАХ РАЗВИТИЯ МОЛОДИ

В. А. ДУБРОВСКАЯ¹⁾, А. Ю. ПЕРЕВАРЮХА²⁾, И. В. ТРОФИМОВА³⁾

¹⁾Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения,
ул. Большая Морская, 67, 190000, г. Санкт-Петербург, Россия

²⁾Санкт-Петербургский институт информатики и автоматизации РАН,
14-я линия Васильевского острова, 39, 199178, г. Санкт-Петербург, Россия

³⁾Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетский пр., 35, 198504, г. Петергоф, Россия

Моделируется динамика биоресурсов для ситуации с разделяющейся на частично репродуктивно обособленные группировки исходной популяцией, которая при определении стратегии эксплуатации представляется единым промысловым запасом. В случае когда промысловая статистика не способна разграничивать данные по локальным группам, имеющим экологические отличия размножения, может возрастать роль второстепенных факторов при оценке эффективности пополнения запаса, что актуально для осетровых рыб Каспийского моря. Субпопуляционные группы неравномерно сохраняют ожидаемые показатели в прогнозах успешности воспроизводства при одинаковом изменении гидрологической обстановки. Предложено в качестве дополнительного показателя в модели формирования пополнения использовать темпы развития молоди, которые могут характеризоваться значимыми колебаниями из-за межгрупповой конкуренции. Представлена система дифференциальных уравнений, где на выживаемость поколения на трех эколого-физиологических этапах развития молоди существенно влияет отклонение в размерном развитии, которое рассчитывается на основе базовой феноменологической модели скорости роста, заданной известным уравнением роста Берталанфи. Развитие непрерывно-дискретной итерационной динамической системы, полученной из решения системы уравнений, характеризуется возможностью притяжения к двум альтернативным циклическим аттракторам, что соответствует переходящим флуктуациям с высокой или низкой численностью для сложноструктурированной популяции анадромных видов рыб.

Ключевые слова: модели биологических процессов; репродуктивная изоляция; темпы роста осетровых.

Благодарность. Работа выполнена в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-37-00028 для молодых ученых «Разработка непрерывно-событийной вычислительной модели эффективности воспроизводства каспийской севрюги в условиях неопределенности репродуктивной изоляции субпопуляционных группировок».

Образец цитирования:

Дубровская В. А., Переварюха А. Ю., Трофимова И. В. Модель динамики структурированных субпопуляций осетровых рыб Каспия с учетом отклонений в темпах развития молоди // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 76–86.

For citation:

Dubrovskaya V. A., Perevaryukha A. Yu., Trofimova I. V. Model of dynamics of structured subpopulations of sturgeon fish in the Caspian Sea takes into account deviations in the rate of development of immature fish. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 76–86 (in Russ.).

Авторы:

Виктория Андреевна Дубровская – ассистент кафедры информационных технологий в бизнесе Института технологий предпринимательства.

Андрей Юрьевич Переварюха – кандидат технических наук; старший научный сотрудник лаборатории прикладной информатики.

Инна Владимировна Трофимова – кандидат физико-математических наук; доцент кафедры моделирования экономических систем факультета прикладной математики и процессов управления.

Authors:

Victoria A. Dubrovskaya, assistant at the department of information technology in bussiness, Institute of entrepreneurship technologies.

torry_2902@mail.ru

Andrey Yu. Perevaryukha, PhD (technical sciences); senior researcher at the applied informatics laboratory.

madelf@pisem.net

Inna V. Trofimova, PhD (physics and mathematics); associate professor at the department of modeling of economic systems, faculty of applied mathematics and management processes.

isolovyeva@mail.ru

MODEL OF DYNAMICS OF STRUCTURED SUBPOPULATIONS OF STURGEON FISH IN THE CASPIAN SEA TAKES INTO ACCOUNT DEVIATIONS IN THE RATE OF DEVELOPMENT OF IMMATURE FISH

V. A. DUBROVSKAYA^a, A. Yu. PEREVARYUKHA^b, I. V. TROFIKOVA^c

^a*Saint Petersburg State University of Aerospace Instrumentation,
67 Bolshaya Morskaya Street, Saint Petersburg 190000, Russia*

^b*Saint Petersburg Institute of Informatics and Automation of RAS,
39 Line 14 Vasil'evskii ostrov, Saint Petersburg 199178, Russia*

^c*Saint Petersburg State University, 35 University Avenue, Peterhof 198504, Russia*

Corresponding author: A. Yu. Perevaryukha (madelf@pisem.net)

The article discusses modeling the dynamics of bioresources for the situation with a population that is divided into partially reproductively isolated groups of the initial population, which, when determining the exploitation strategy, is represented as a single commercial stock. In the case when fishing statistics are not able to delineate data on local groups that have ecological differences in reproduction, the role of secondary factors in assessing the efficiency of replenishment may increase, which is important for Caspian Sea sturgeons. Subpopulation groups unevenly retain the indicators expected from them by experts, according to forecasts of the success of reproduction with the same change in the hydrological situation. We propose to use as a supplementary indicator in the model of calculating the value of replenishment the development rate of juvenile, which may experience significant fluctuations due to intergroup competition. The system of differential equations is presented for analysis, where the developmental survival in the three ecology-physiological stages of juvenile development is significantly affected by the deviation in dimensional development, which is calculated from the basic phenomenological growth rate model given by the well-known von Bertalanffy equation. The dynamics for the trajectory obtained from the solution of the system of equations of a continuous-discrete iterative dynamic system is characterized by the possibility of attraction to two alternative cyclic attractors, which corresponds to fluctuating fluctuations with a high or low number for a complex-structured fish population.

Key words: dynamic models of biological processes; reproductive isolation; rates of sturgeon growth.

Acknowledgements. The work was carried out within the project of the Russian Foundation for Basic Research No. 16-37-00028 for young scientists «Development of a continuous-event computational model of the efficiency of reproduction of the Caspian Sea stellate sturgeon in the conditions of uncertainty in reproductive isolation of subpopulative groups».

Существует много моделей математической биологии, но уравнения абстрактной популяции не могут учитывать важные специфические аспекты конкретной ситуации. В случае осетровых рыб при эксплуатации общего запаса биоресурсов имеет место достаточно сложная внутривидовая структура. Применяемые методы обработки промысловой статистики по объективным причинам не обеспечивали (и не имели экономической мотивации) проведения диверсифицированного анализа популяционной динамики. Осетровые рыбы формируют в нерестовых реках репродуктивные расы (яровые и озимые), отличающиеся по оптимальным условиям нереста. Вклад групп в общий репродуктивный потенциал различен, и успешность размножения рас изменялась из-за антропогенного вмешательства в гидрологический режим рек. Более того, промысловая статистика не различала даже обособленные по современной классификации два вида: русского и персидского осетров. Управляемая система характеризовалась нарастающей внутренней гетерогенностью и частичной обособленностью своих составляющих, развитой в ходе длительной эволюционной адаптации видов.

Мониторинг воспроизводства двух видов осетровых рыб на Нижней Волге [1] позволил, в частности, выявить, что действующие зависимости в формировании поколений для двух близких видов осетровых рыб могут оказаться вдруг достоверно различными. Между представителями групп одного вида установлены достоверные иммунохимические отличия, но эти методы сложны для использования в промысловом учете [2], потому для построения моделей эффективности воспроизводства нужно использовать косвенные показатели влияния структурированности запаса при нересте. В настоящей работе нами последовательно совершенствуется метод моделирования с акцентом на неравномерности онтогенеза. Подход предназначен для критических режимов в динамике интересующих нас популяций.

Структура гибридной системы для экологических задач

В работе [3] нами развита базовая модель формирования пополнения в виде системы уравнений взаимосвязанной убыли численности. Основная идея формализации процесса формирования пополнения заключается в описании убыли начальной численности поколения $N(0)$ от момента выхода из икри-

нок дифференциальным уравнением с переопределяемой структурой на кадрированном промежутке времени $[0, T]$. Разные факторы смертности и ее изменение по мере развития особей можно учитывать в явном виде при помощи следующей системы:

$$\frac{dN}{dt} = \begin{cases} -(\alpha w(t)N(t) + U\beta)N(t), & t < \tau, \\ -\left(\frac{\alpha_1 N(\tau)}{w(\tau)} + \beta\right)N(t), & t > \tau, w(t) < w_{D2}, \\ -\alpha_2 w(t)N^2(t), & w(t) < w_{D3}, \end{cases} \quad (1)$$

где α – коэффициент, зависящий от плотности компенсационной смертности; β – коэффициент нейтральной убыли. От абстрактного «репродуктивного потенциала» разумно перейти к естественному показателю средней плодовитости λ , оцениваемой по данным мониторинга. Начальные условия для уравнений $N(0) = \lambda S$ следующие: τ – длительность первой стадии с эндогенным питанием – для осетровых в среднем составляет 8–10 сут; w_D – условный уровень развития, при достижении которого меняется действие факторов смертности, что интерпретируется экологией обитания молоди при самостоятельной миграции рыб. Для случая бассейнового выращивания вместо величины $w(\tau)$ в знаменателе второй формулы системы (1) мы предполагаем существенную роль запаздывания на третьей стадии развития $N(t - \zeta)$.

Модель рассчитана на применение инструментальной среды моделирования, обладающей библиотекой численных методов с изменяющимся шагом интегрирования для систем дифференциальных уравнений первого порядка. Событийность в изначально непрерывных вычислительных моделях может использоваться для дальнейшего совершенствования модели.

Метод ограниченного функционального дополнения

В модели (1) $U[x]$ – триггерный функционал с ограниченной областью значений. Смысл предложенного нами метода функционалов заключается в том, чтобы выразить влияние экстремальных условий на успех размножения. Для ситуации вспышки численности такой подход оказался даже более актуален, чем в сценарии деградации сложноструктурированной популяции севрюги. Триггерный функционал совсем не обязательно может включаться в уравнение первой стадии развития, где он учитывает количество неоплодотворенной икры и ухудшение условий из-за размножения вредных микроорганизмов после гибели нерестовых кладок. Исходная форма однопараметрического функционала $U[S] = (1 - \exp(-cS))^{-1}$ не единственно возможная. В некоторых случаях можно предположить немонотонную зависимость. Точнее, действующая зависимость может изменяться с течением времени, если она описывает действие экологического эффекта Олли на группу особей. Механизмы эволюционной адаптации, выраженные в репродуктивной изоляции отдельных групп, позволят преодолевать негативное действие эффекта на уровне локальной субпопуляции и далее восстановить исходный ареал вида.

В перспективе дальнейшей модификации авторы изначально предполагали более сложную изменчивость динамики используемого показателя размерного развития $w(\tau)$. Данный показатель исходно рассматривался нами как вспомогательный и предназначенный для формирования предикатов при вычислении моментов смены режима поведения в гибридной системе. Все «настоящие» модели роста организмов исходят из формализации баланса анаболизма и катаболизма, но для математического рассмотрения распада и накопления биомассы предполагается наличие полностью сформированных жизненно важных систем организма. В момент истинности предиката происходит переопределение начальных условий для расчета убыли поколения на следующем кадре непрерывного модельного времени. Найден путь более обоснованного использования в первом уравнении $\alpha \Xi N^2(t)$ с показателем отклонения в развитии ($\Xi > 0$) от некоторого оптимального $\bar{w}$, которое и должно оказывать влияние:

$$\Xi = \sqrt{(w(t) - \bar{w})^2}.$$

В результате мы получаем структуру, где дискретная составляющая траектории гибридной непрерывно-дискретной модели исследуется в вычислительной среде как итерация отображения с несколькими экстремумами.

Вариативность динамики популяционных моделей

В изолированном случае без внешнего управления динамическая система изменения состояния популяции представляется тройкой $\langle M, T, \psi \rangle$, состоящей из фазового пространства M , переменной, выполняющей роль времени T , оператора эволюции ψ . Для $\forall x \in M$ и $\forall t, s \in T$, выполняется условие:

$\psi(\psi(x, t), s) = \psi(x, s + t)$. Множество $\{\psi^{(i)}(x)\}_{i \in T}$ – фазовая траектория точки x . Значения переменных в последующий момент рассчитываются из текущих значений по закону, называемому оператором эволюции. В нашем случае оператором будет обсуждаемая зависимость исходного запаса и полученного от него нового поколения, и нас интересуют разновидности асимптотики фазовой траектории. Биологическая часть теории и применения метода изложена в [4] и анализировалась нами в [3].

Эволюция диссипативной динамической системы во времени представляется движением точек в фазовом пространстве к аттрактору, подмножеству фазового пространства $A \subseteq M$, инвариантному относительно эволюции: $\psi^{(t)}(A) = A$ для всех $t \in T$ и такое, что существует окрестность U множества A , в которой для всех $y \in U$ выполняется $\lim_{t \rightarrow \infty} \psi^{(t)}(y) = A$. Для дискретных динамических систем классифицируют три топологические разновидности аттракторов [5]. Регулярным аттрактором для отображения интервала $\psi: I \rightarrow I$ считаются состояние равновесия с неподвижной точкой x^* : $\lim_{t \rightarrow \infty} \psi^{(t)}(y) = x^*$ и устойчивый цикл, соответствующий режиму периодических автоколебаний.

Для предложенной в [4] популяционной модели итераций $x_{n+1} = ax_n e^{-bx_n}$ помимо хорошо известного каскада удвоений [6] наблюдаем серию касательных бифуркаций с появлением устойчивых циклов периодов $p \neq 2^i$ при последовательном увеличении, начиная с $a^1 = e^2$. Как известно, если одномерное отображение $R_{j+1} = \psi \leq (R_j)$ при значении параметра $a = \hat{a}$ имеет цикл периода $p = 3$, то оно при $\hat{a}$ имеет и бесконечное множество циклов всех других периодов. В [7] доказано, что если одномерное отображение $\psi: I \rightarrow I$ имеет цикл $p = n$, то оно также имеет циклы со всевозможными периодами $\tilde{n}_i$, предшествующими числу n , среди целых чисел, выписанных в специальном порядке, который завершает число три [7], однако в теореме Шарковского ничего не говорится об устойчивости данных циклов.

Явление перемежаемости предшествует появлению окон. Перемежаемостью считается режим чередования во времени почти регулярных колебаний (ламинарная фаза) с интервалами хаотического поведения (турбулентная фаза). Перед появлением циклических точек график третьей итерации функции $f^3(S) \equiv f(f(f(S)))$ образует каналы, по которым в строгой последовательности траектория движется довольно долго. Выход точки траектории из канала определяет короткую турбулентную фазу. Выявление такого поведения при настройке параметров может служить индикатором близости бифуркационных значений.

Появление хаоса интерпретировалось в биологическом контексте как последствие повышения репродуктивного потенциала популяции. В $x_{n+1} = ax_n e^{-bx_n}$ этому термину соответствует параметр a , но для динамики подобных унимодальных отображений при $[a_1, \hat{a}]$ мы увидим набор резких изменений поведения, для которых нам трудно найти рациональное толкование. При использовании более сложных нелинейных дискретных моделей с внешним воздействием практические выводы будут определяться свойствами критерия устойчивости аттрактора уже как функции нескольких переменных. Рассматривая различные воздействия на популяцию, подчиняющуюся $x_{n+1} = ax_n e^{-bx_n} \pm kx_n$, мы получим, например, что искусственное воспроизводство хаотизирует динамику, а промысловое изъятие, наоборот, уменьшает амплитуду колебаний. Однако выводы будут тождественны для целого семейства итераций функций, удовлетворяющих критериям теоремы Сингера, называемым SU-отображениями. Используемый нами ранее в [3] эффект граничного кризиса аттрактора выходит за эти рамки.

Аспекты проявления скрытых механизмов регуляции

Анализ свойств $\{\psi^{(i)}(x)\}_{i \in T}$ обоснован для анадромных видов, заходящих для нереста на речном грунте. Популяция осетра испытала не просто промысловое истощение на рубеже 1980-х гг., что случилось со многими видами, но стремительное сокращение по сценарию, определенному нами как «немонотонный коллапс» из псевдостабильного состояния (рис. 1).

При таком сценарии специалисты не могут предвидеть кризис. Непосредственно перед фазой коллапса предполагалось увеличение уловов из-за благоприятности гидрологического тренда. Можно констатировать безвозвратную деградацию волжского осетра и особенно более уязвимой севрюги, так как остановить нелегальную добычу не удастся, несмотря на включение всех каспийских видов осетровых рыб в Красную книгу в 2010 г. [8]. Нелегальная добыча снижается, но, как показывают наши модели, критическим может стать и самое незначительное превышение допустимой доли изъятия. Искусственное воспроизводство оказалось не столь эффективно, как планировалось в оптимистичных прогнозах рыбхозов с заявленным коэффициентом промыслового возврата в размере 3 %.

Изучение ретроспективных данных о популяциях анадромных рыб Каспия позволило выявить нелинейные особенности в формировании пополнения, которые оказались различными у двух видов. Ранее основным фактором считались параметры гидрологического режима. Количество пропущенных

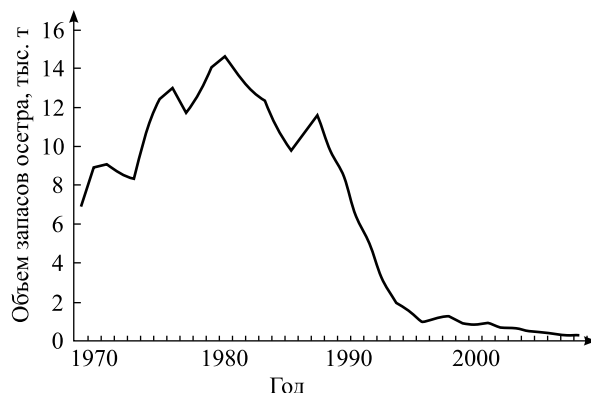


Рис. 1. Стремительное сокращение запасов осетра после серии пиков вылова, тыс. т

Fig. 1. Rapid reduction in sturgeon stocks after a series of catch peaks, thousand tonnes

на нерест в Волгу производителей за период наблюдений изменялись существенно: от 2500 тыс. экз. в 1979–1981 гг. до 25 тыс. экз. в 2000-х гг. [9]. В настоящее время мы не имеем достоверной информации о состоянии нерестовой части популяций, отдельные поимки рыб носят случайный характер. Имеются сведения с 1968 г. об общей численности осетровых Каспийского моря по данным тралового учета [10]. Некоторые специалисты сомневаются в правомерности применяемых методик подсчета, где данные по поимке рыб в небольших участках моря экстраполируются на всю акваторию. Другая проблема состоит в недостаточной сегментации данных учета, не опубликованы сведения о дифференцированном вылове озимых и яровых репродуктивных рас осетровых рыб. Данные о русском и персидском осетрах не разделялись, притом что у видов различен температурный оптимум нереста [11].

Главное, что позволило понять сравнение различных сведений, – это то, что наблюдается статистически достоверный пороговый эффект скачкообразного перехода эффективности воспроизводства на некий отличный от нуля минимальный показатель, он не отмечен специалистами при составлении промысловых прогнозов. Для волжской севрюги, размножающейся в тех же условиях, только в более поздние сроки, отмечен и максимум, и локальный минимум в эффективности воспроизводства, что зависит от условий среды.

Существуют примеры неожиданного для ихтиологов восстановления запасов даже долго созревающих рыб. В 1990-х гг. восстановила промысловое значение истощенная в 1960-х гг. популяция сига в оз. Онтарио (рис. 2).

Задолго до деградации ежегодные уловы сига *Coregonus clupeaformis* прошли очевидный пик перепада и выглядели стабильно. После падения вылова в Канаде ожидали скорого его восстановления

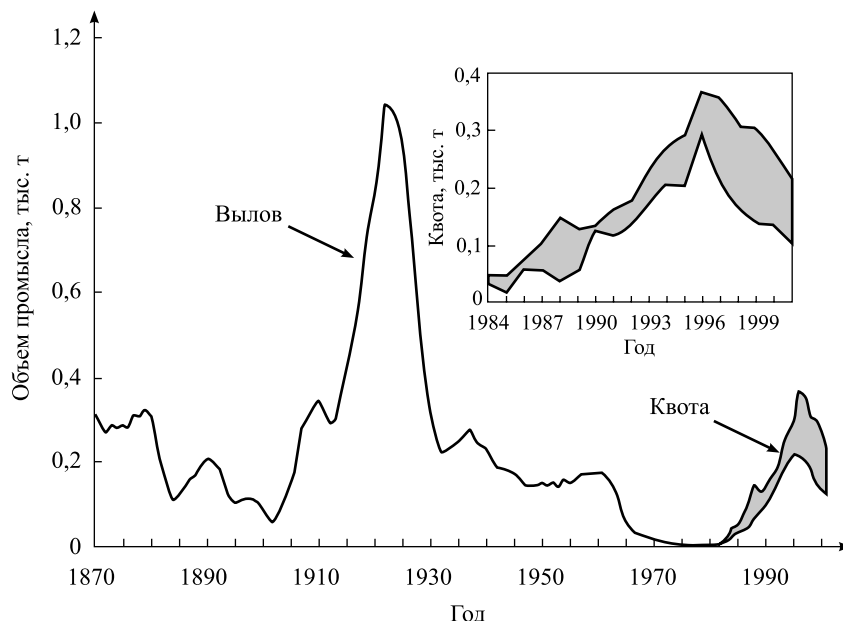


Рис. 2. Крах и восстановление промысла сига в оз. Онтарио, тыс. т [12]

Fig. 2. The collapse and restoration of the fishery in the lake Ontario, thousand tonnes [12]

за счет резерва не вступивших в промысел поколений, но период депрессии затянулся на четверть века. Запасы сига в оз. Онтарио восстановились после, казалось, полной потери промыслового значения, так как сохранились локальные группы, для которых эффективность воспроизводства сохраняется даже при небольшой численности. В Ладожском озере сиг *Coregonus lavaretus* аналогично присутствует в ряде известных рыбакам локальных форм. Способствующий выживаемости механизм адаптации малочисленного вида как стратегию локального убежища «рефугиум» модельно описать можно только обсуждаемым методом в виде специальной усложненной предикативной структуры.

Базовая модель выживаемости с динамикой развития

Вернемся к базовой модели репродуктивного потенциала с сохранением непрерывного характера функциональной зависимости, которую можно модифицировать методом гибридных динамических систем. Учтем снижение эффективности нереста из-за уменьшения количества икры, реально вступившей в репродуктивный процесс, при $S \ll R^*$. Прямой учет такой зависимости становится необходимым при моделировании динамики популяций, подвергающихся интенсивному промыслу. В настоящее время нет оснований полагать, что севрюга смогла преодолеть такое снижение, как это произошло с сегом в оз. Онтарио.

Примем, что скорость роста находится в обратной зависимости от численности поколения, но не в обратно пропорциональной, а дробно-степенной и действует до перехода на активное питание из-за увеличения пищевых потребностей малоподвижной молодежи. Убыль численности поколения $N(t)$ на интервале модельного времени $[0, T]$ опишут объединенные в систему два дифференциальных уравнения (α, β, c – константы):

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = -(\alpha w(t)N(t) + \Theta(S)\beta)N(t), \\ \frac{dw}{dt} = \frac{g}{\sqrt{N^k(t)} + \zeta}, \end{cases} \quad (2)$$

где S – величина нерестового запаса; $w(t)$ – уровень размерного развития поколения, влияющий на увеличение пищевых потребностей; g – параметр, учитывающий ограниченность количества доступных для молодежи кормовых объектов; ζ – параметр, ограничивающий темп развития вне зависимости от $N(t)$; λ – средняя плодовитость особей, определяющая начальные условия для вычисления задачи Коши $w(0) = w_0$, $N(0) = \lambda S$; α – коэффициент квадратично зависимой (компенсационной) смертности; β – коэффициент декомпенсационной смертности; $k \in [1, 2]$; интервал уязвимости $t \in [0, T]$ специфичен для видов рыб, в некоторых экстремальных случаях зависит от уровня половодья. При незначительном количестве повторно нерестующих рыб численно из (2) вычисляем $S = N(T)$. Учет повторного нереста приведет к формированию вектор-столбца $\bar{S}$ нерестующих поколений и расчету начальных условий: $N(0) = \lambda_1 S_1 + \dots + \lambda_i S_i$.

Выберем другой триггерный функционал: $\Theta(S) = 1 + \exp(-cS^2)$, причем $\lim_{S \rightarrow \infty} \Theta(S) \rightarrow 1$ – быстро убывающая функция, отражающая действие известного эффекта агрегированной группы [13]. Не вступившие в репродуктивный процесс кладки икры после гибели ухудшают токсикологическую обстановку на нерестилище; c – степень действия эффекта, который триггерно выключается, если численность нерестующих особей осетровых исторически оптимальна.

Когда численность нерестового стада низкая, то большая протяженность русловых нерестилищ и растянутость сроков миграции становятся уже негативными факторами.

Графиком исследованной с применением численного решения в инструментальной среде последовательности задач Коши (2) для вычисления численности выживших особей поколения к моменту времени T новой модели является унимодальная кривая с уменьшающимся наклоном ниспадающей правой ветви. Кривая (рис. 3, кривая относительно биссектрисы координатного угла) имеет ненулевую горизонтальную асимптоту, две нетривиальные точки пересечения с биссектрисой координатного угла $R = S$ и двумя точками перегиба.

От дифференциальных уравнений на интервале $t \in [0, T]$ вернемся к дискретной задаче. Будем исследовать дискретно-непрерывную гибридную систему, где нас интересует дискретная составляющая траектории, дающая положение нового нерестующего поколения. Качественная динамика модели зависит от математических свойств выбранной функции эффективности воспроизводства, особенно вне диапазона оптимальной численности нерестового стада. Важны как относительные положения минимума и максимума зависимости и даже количество точек перегиба. Фазовое пространство динамической

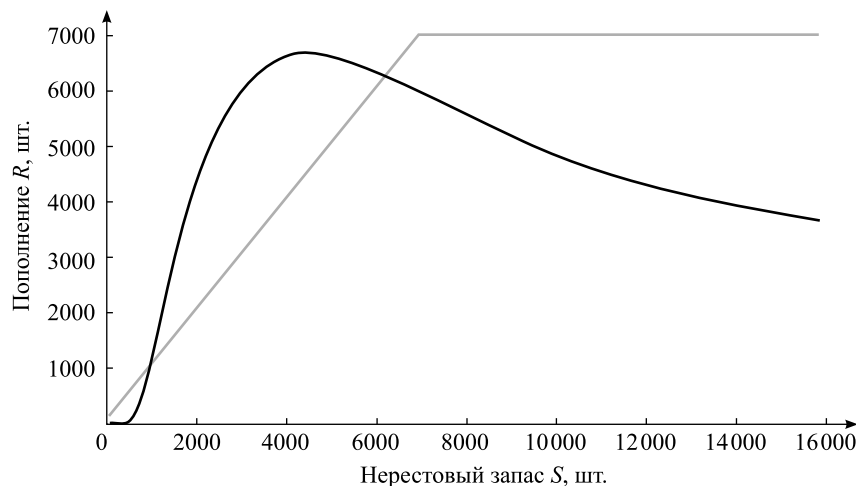


Рис. 3. Модельная зависимость $R = f(S) = N(T)$

Fig. 3. Model dependence $R = f(S) = N(T)$

системы $\psi^n(R_0)$ с оператором эволюции в виде системы (2) разделено на две области притяжения: Ω_1 и Ω_2 . Границей между областями является неустойчивая стационарная точка R_1^* первого пересечения кривой с биссектрисой $R = S$. Анализ устойчивости неподвижных точек дискретно-непрерывной системы в инструментальной среде можно проводить с использованием свойства второй итерации $\psi(\psi(x))$. Необходимым и достаточным условием устойчивости неподвижной точки одномерного отображения x^* является неравенство: $\psi^2(x) > x$ при $x < x^*$, $\psi^2(x) < x$ при $x > x^*$.

Второе равновесие R_2^* устойчиво (обходится без бифуркаций удвоения периода).

Структура изменений скорости роста в онтогенезе

Многokратное увеличение кормовой базы не приводит к пропорциональному скачку скорости роста рыб, так как они потребляют не более необходимого суточного рациона. В связи с этим очевидный на первый взгляд вариант совершенствования модели с отдельным описанием динамики кормовых организмов $g(t)$, например известным уравнением Ферхюльста

$$\frac{dg}{dt} = rg \left(1 - \frac{g}{K} \right) - \gamma N w,$$

где γ отражает эффект хищничества, не принесет желаемого результата. Помимо того, что имеется предел насыщения, рыба способна искать корм на ограниченной площади, потому оказываются безрезультатными попытки разрежения взрослого стада для увеличения рыбопродуктивности водоема.

Развитие методов моделирования процессов, связанных с особенностями раннего онтогенеза, сталкивается с проблемой происходящих изменений в динамике развития, которые не ограничиваются только увеличением массы и линейных размеров. Большинство организмов до вступления в репродуктивный процесс проходят ряд последовательных этапов, различных по физиологическому строению и пищевому поведению. Появляющиеся на свет уже полностью сформированными млекопитающие являются продуктом совсем недавнего эволюционного развития. У вылупляющихся из икринок личинок рыб происходит ряд метаморфозов с появлением органов дыхания, пищеварения и передвижения. Переходов между стадиями у молоди осетровых рыб, происходящими быстро, физиологи выделяют гораздо больше [14], но для задач разработки вычислительных моделей нужно выделить не более трех эколого-физиологических этапов развития.

Современные средства компьютерного моделирования позволяют исследовать событийно-управляемые динамические системы, где течение заданного системой уравнений неизменного процесса прерывается в моменты событий и происходят определенные перестроения в уравнениях. Промежутки относительной стабильности в развитии рыб между двумя скачкообразными изменениями можно обособлять отрезками непрерывного времени. На концах отрезков в специально отделенных выделенных временных лакунах допустимо проводить предикативное переопределение вычислительной структуры. Возникает необходимость введения в модель условий реализации событий и иерархии модельного гибридного времени, заключенного в пронумерованную последовательность кадров для переопределения начальных условий и вычисления задачи Коши на следующем непрерывном кадре.

Помимо дифференцированного описания смертности изменяющимися уравнениями в (1) биологически обоснованной представляется другая, нетривиальная реализация идеи этапности. В базовую модель включен фактор скорости роста, которая при рассмотрении этапов развития не может быть неизменной. Если смертность полагаем зависимой от прироста, следовательно, будет логичным формализовать влияние резких перемен в темпах приращения биомассы, происходящих при успешном достижении организмом следующего этапа.

Известно несколько различных моделей роста организмов, они дают представление о регуляции предельных размеров особи вида и подходят к накоплению биомассы как непрерывному явлению, не учитывая переходные процессы при формировании систем жизнедеятельности на ранних этапах развития. У осетровых и лососевых рыб относительно продолжительное время по сравнению с другими видами занимает смешанное питание. На самой первой стадии икринки питание происходит эндогенно за счет запаса питательных веществ [15] и скорость роста не может считаться положительной, но этот небольшой промежуток времени следует включить в этап, завершающийся резорбцией желточного мешка и переходом на активное питание. Скорость роста – линейная, с незначительным коэффициентом наклона к оси абсцисс, сохраняется до тех пор, пока личинкам не станут доступны подвижные кормовые объекты. Условием для перехода пусть служит накопление достаточного показателя $\bar{w}$.

На втором этапе скорость роста уже зависит от плотности конкурирующих за пищевые ресурсы и еще недостаточно подвижных личинок. Характер зависимости прироста от плотности – малоисследованный вопрос, имеющиеся результаты экспериментов в искусственных условиях несколько противоречивы из-за разных условий содержания и кормления молоди. Сюда входит вопрос не только питания, но и достаточного обеспечения всех биохимических процессов кислородом [16]. Наиболее правдоподобно, что зависимость обратная, дробно-степенная, пропорциональна N^{-z} , и показатель $z < 1$ – дробь от $\frac{1}{3}$ до $\frac{2}{3}$. После начала миграции в потоке воды к эстуарию Каспийского моря зависимость от плотности должна снижаться, а в прудовых условиях даже фиксировалось повышение упитанности при более плотном зарыблении уже подросшей молодью. Второе уравнение в системе (2) переопределим в виде структуры с дважды изменяющейся правой частью. Каждому виду правой части сопоставлено условие завершения активности для данной фазы скорости весового прироста:

$$\frac{dw(t)}{dt} = \begin{cases} \rho, & t < \tau, \\ \zeta \frac{w(t)}{\sqrt{N}}, & t > \tau, w(t) < w_1, \\ \eta \sqrt{w(t)^2} - \vartheta w(t), & w(t) > w_1, t < T, \end{cases} \quad (3)$$

где τ – длительность периода развития до полного израсходования питательных запасов желточного мешка, определяемая биологическими особенностями вида с линейным коэффициентом прироста $\rho < 1$, который в среднем для поколения должен быть положительным; w_1 – уровень развития, при достижении которого изменяется характер метаболизма из-за смены характера питания. На втором этапе может наблюдаться депрессия роста при повышенной плотности. При переходе модели к описанию третьего этапа предполагается, что скорость роста свободно мигрирующей молоди не определяется более численностью поколения. Третий вид правой части представляет собой балансовое уравнение разности между синтезируемой биомассой с параметром анаболизма η и убылью вещества при метаболическом распаде, которое было предложено в [17]. Успешный рост в дальнейшем делает недоступным молодь для большего числа мелких окуневых хищников. Половозрелые осетровые не имеют естественных врагов, что позволяет убрать из уравнений убыли численности взрослых зависимый от плотности фактор смертности.

Интересные свойства новой модели

Модель (3) показала наибольшую параметрическую вариабельность динамических режимов поведения по сравнению с итерациями SU-отображения $x_{n+1} = ax_n e^{-bx_n}$ и даже нашей модели кризиса аттрактора в [3]. Вычислительное исследование дискретной составляющей новой, непрерывно-событийной, динамической системы показало разнообразие качественной динамики, управляемое более чем одним бифуркационным параметром с появлением всех типов бифуркаций, возможных для функциональных итераций. С применением переопределяемого уравнения темпа развития, калибруя соотношения модельных параметров, можно получить сложные формы зависимости, имеющие более одного экстремума: на рис. 4 представлен вариант, соответствующий зависимости в эффективности воспроизводства

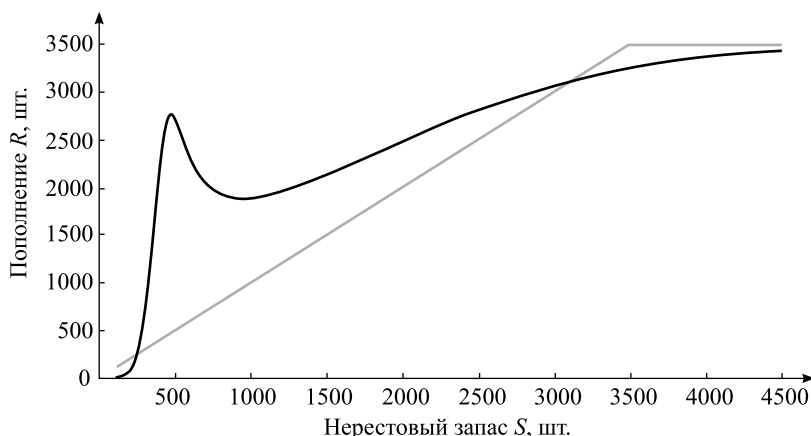


Рис. 4. Вариант новой модельной зависимости для севрюги

Fig. 4. The variant of the new model dependence for stellate sturgeon

для волжской севрюги. Положение экстремумов относительно стационарных точек – важная характеристика для динамики, так как влияет на характер границ областей притяжения аттракторов. Для найденных сценариев перехода к аperiodической динамике и обратно к регулярной еще не разработано обобщенного строго математического описания, подобного теории ренормализации в объяснении свойств универсальности перехода к хаосу через каскад Фейгенбаума, отдельные частные результаты получены экспериментальными компьютерными методами.

В динамической системе, как оказалось, при плавном изменении одного параметра бифуркации меняются с прямых на обратные. Сначала при увеличении параметра происходит каскад удвоений периода $p = 2^{i+1}$, $i \rightarrow \infty$, сменяющийся обратным процессом – последовательного, кратного двум уменьшения периода цикла $p = 2^{i-1}$, т. е. прямая и обратная бифуркации бывают при увеличении одного и того же бифуркационного параметра. Подобные «парные каскады» обнаруживались ранее в двумерных отображениях типа аттрактора Эно, и пока не ясно, может ли получить данный сценарий поведения биологическое объяснение.

В числе других нелинейных эффектов можно наблюдать появление в диапазоне значений параметра одновременно существующих в Ω_2 двух устойчивых циклов периода $p = 2$.

Представленные на рис. 5 четыре новые стационарные точки (показаны на рис. 5 стрелками), появившиеся у второй итерации модельной зависимости $\psi(\psi(S))$, образуют два цикла периода $p = 2$ у итераций $x_{n+1} = \psi(x_n)$, что невозможно для функций, удовлетворяющих критериям теоремы Сингера.

Появление альтернативных циклов может иметь популяционную интерпретацию для структурированной популяции, когда одна из составляющих – частично изолированная группа – начинает изменять свою численность по циклу с меньшей амплитудой.

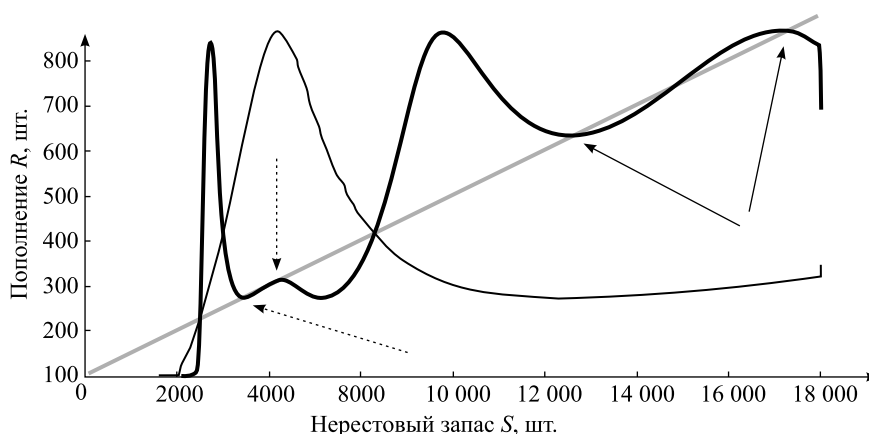


Рис. 5. Появление двух циклов периода $p = 2$ для $\psi(\psi(S))$

Fig. 5. The appearance of two cycles of the period $p = 2$ for $\psi(\psi(S))$

Заключение

В предложенной методике трактовка эффективности воспроизводства осетровых рыб в модели не задается параметром репродуктивного потенциала, но определяется через убыль численности поколения на ранних этапах развития. Скорость убыли изменяется по мере успешности развития поколения. Базовая модель отражает наличие критической, минимально допустимой численности для благополучного существования вида. Присутствует репеллер – неустойчивая особая точка первого пересечения кривой с биссектрисой координатного угла. Траектории с начальными условиями, разделенными репеллером, покидают его окрестность и приближаются к разным аттракторам. Один из аттракторов – точка $(0, 0)$ на плоскости $R \times S$. Если численность популяции будет соответствовать области притяжения этого аттрактора, произойдет вымирание. Эффективность воспроизводства популяции, находящейся в надкритическом диапазоне состояния нерестового запаса, весьма велика, что часто служит поводом для ошибочных оптимистичных промысловых прогнозов. Это выражается в форме небольших пиков на графиках вылова сига и осетра. Популяция долго может поддерживать высокий процент изъятия, но потом произойдет резкое снижение уловов. Коллапс происходит так, будто это короткоцикловый вид, а не популяция, состоящая минимум из семи возрастных групп. Коллапс сложно предвидеть экспертам, ориентирующимся на влияние гидрологических факторов. На Нижней Волге в 1980-х гг. они были благоприятны.

В ходе совершенствования метода предложена модель с учетом скачкообразно меняющейся скорости роста в виде гибридной системы на основе предикативного изменения правой части дифференциального уравнения. Обнаружена возможность притяжения соседствующих в некоторой области $\delta \in \Omega_2$ начальных точек к двум альтернативным циклическим траекториям. Эффект сосуществования циклов не наблюдается на бифуркационных диаграммах. Интервал значений параметра, в котором существует один из циклов, весьма узок, потому для популяции вероятность динамики с переходом на другой устойчивый цикл кажется незначительной. Обоснование такого поведения можно представить для случая нарастающей в процессе адаптации популяционной дивергенции – начальной стадии симпатрического видообразования. Две группы размножаются в сходных условиях, но при этом факторы репродуктивной изоляции уже становятся действующим механизмом. Вместе с растущей дифференциацией для каждой группы обособляется собственная зависимость эффективности воспроизводства, а обобщенная видовая зависимость становится более размытой с обособлением подвидов. Тогда выбор альтернативного цикла актуально трактовать в контексте разнообразия эволюционной стратегии размножения. Гипотеза может служить объяснением возникновения значимых отличий для зависимости запаса и пополнения всех каспийских осетровых. В локальной обособившейся группе перестает действовать отрицательный эффект Олли, который здесь описан функционалом со свойством $\lim_{S \rightarrow \infty} \Theta(S) \rightarrow 1$. Для некоторых видов рыб всегда было свойственно обособление локальных «туводных» сообществ, но мигрирующие формы обеспечивали связность – генетическую панмиксию. В современных условиях длительные миграции на порядок увеличивают риск промысловой гибели рыб, соответственно, возрастает отбор аллельных вариантов генов, способствующих оседлой жизни.

Неустойчивое равновесие представляется точкой-репеллером, но в реальности эта размытая область, где положение функции над биссектрисой или под ней имеет вероятностный характер. Вероятность превышения плавно убывает, но оставляет шансы на восстановление запасов при отсутствии промысла за счет сохранности локальных форм, менее подверженных промысловой смертности на миграционных путях. Осетровым рыбам свойственна значительная внутривидовая дифференциация, например в форме образования сезонных репродуктивных рас [2], что способно привести к будущему восстановлению популяций по экологической стратегии «рефугиум» – расселению малой выжившей группы из локального ареала, но это сугубо вероятностный сценарий.

Библиографические ссылки

1. Veshchev P. V., Guteneva G. I. Efficiency of natural reproduction of sturgeons in the Lower Volga under current conditions // Russ. J. Ecol. 2012. Vol. 43, № 2. P. 142–147.
2. Perevaryukha Y. N., Geraskin P. P., Perevaryukha T. Y. Comparative immunochemical analysis of intraspecies distinctions of serum proteins of starred sturgeon *Acipenser stellatus* (Acipenseriformes, Acipenseridae) from the Caspian basin // J. Ichthyol. 2011. Vol. 51, № 5. P. 392–397.
3. Переварюха А. Ю. Исследование модели эксплуатируемой популяции со сложными видами аperiодической переходной динамики // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2015. № 3. С. 96–103.
4. Ricker W. Stock and recruitment // J. Fisheries research board of Canada. 1954. № 11. С. 559–623.
5. Guckenheimer J. Sensitive dependence on initial conditions for unimodal maps // Comm. Mathem. Phys. 1979. Vol. 70. P. 133–160.

6. Feigenbaum M. Universal behavior in nonlinear systems // *Phys. D*. 1983. Vol. 7. P. 16–39.
7. Sharkovskii A. N. Coexistence cycles of continuous map of the line into itself // *Int. J. Bifurcat. & Chaos*. 1995. Vol. 5. P. 1263–1273.
8. Khodorevskaya R. P., Kalmykov V. A. Formation of populations of Acipenseridae sturgeons in the Volga-Caspian basin // *J. Ichthyol.* 2014. Vol. 54, issue 8. P. 576–583.
9. Панин Г. Н., Мамедов Р. М., Митрофанов И. В. Современное состояние Каспийского моря. М. : Наука, 2005.
10. Лезега М. И., Маилин Р. А. К методике исследования численности осетровых в Каспийском море // Тезисы отчетной сессии ЦНИОРХ. Астрахань, 1974. С. 82–83.
11. Perevaryukha Y. N. Present status of Caspian sturgeons, biodiversity and some problems of their specific identification by molecular genetic, including caviar // The 4th International Symposium on Sturgeon (Oshkosh, 8–13 July, 2001). Oshkosh, 2001.
12. Hoyle J. Status of Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in Lake Ontario and the Response to the Disappearance of *Diporeia* spp. // Proceedings of a workshop on the dynamics of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in the Great Lakes. 2005. P. 47–61.
13. Courchamp F., Ludek B., Gascoigne J. Allee Effects in Ecology and Conservation. New York : Oxford University Press, 2008.
14. Artyukhin E. N. On biogeography and relationships within the Acipenser // *The Sturgeon quarterly*. 1995. Vol. 3, № 2. P. 6–8.
15. Анисимова И. М., Лавровский В. В. Ихтиология. М. : Высшая школа, 1983.
16. Ryabova G. D. Variation in morphometric and genetic characteristics of stellate sturgeon juveniles raised at different densities // *Russ. J. Genet.* 2006. Vol. 42, № 2. C. 182–191.
17. Von Bertalanffy L. Quantitative laws in metabolism and growth // *Quart. Rev. Biol.* 1957. Vol. 32. P. 217–231.

References

1. Veshchev P. V., Guteneva G. I. Efficiency of natural reproduction of sturgeons in the Lower Volga under current conditions. *Russ. J. Ecol.* 2012. Vol. 43, No. 2. P. 142–147.
2. Perevaryukha Y. N., Geraskin P. P., Perevaryukha T. Y. Comparative immunochemical analysis of intraspecies distinctions of serum proteins of starred sturgeon *Acipenser stellatus* (Acipenseriformes, Acipenseridae) from the Caspian basin. *J. Ichthyol.* 2011. Vol. 51, No. 5. P. 392–397.
3. Perevaryukha A. Y. Investigation of the model of the exploited population with complex types of aperiodic transient dynamics. *Vestnik BSU. Ser. 1, Phys. Math. Inform.* 2015. No. 3. P. 96–103 (in Russ.).
4. Ricker W. Stock and recruitment. *J. Fisheries research board of Canada*. 1954. No. 11. C. 559–623.
5. Guckenheimer J. Sensitive dependence on initial conditions for unimodal maps. *Comm. Math. Phys.* 1979. Vol. 70. P. 133–160.
6. Feigenbaum M. Universal behavior in nonlinear systems. *Phys. D*. 1983. Vol. 7. P. 16–39.
7. Sharkovskii A. N. Coexistence cycles of continuous map of the line into itself. *Int. J. Bifurcat. & Chaos*. 1995. Vol. 5. P. 1263–1273.
8. Khodorevskaya R. P., Kalmykov V. A. Formation of populations of Acipenseridae sturgeons in the Volga-Caspian basin. *J. Ichthyol.* 2014. Vol. 54, issue 8. P. 576–583.
9. Panin G. N., Mamedov R. M., Mitrofanov I. V. The current state of the Caspian Sea. Moscow : Nauka, 2005 (in Russ.).
10. Legeza M. I., Mailian R. A. Towards a methodology for studying the number of sturgeon in the Caspian Sea. *Abstracts of the Reporting Session of the Central Scientific Research Institute. Astrakhan'*, 1974. P. 82–83 (in Russ.).
11. Perevaryukha Y. N. Present status of Caspian sturgeons, biodiversity and some problems of their specific identification by molecular genetic, including caviar. *The 4th International Symposium on Sturgeon* (Oshkosh, 8–13 July, 2001). Oshkosh, 2001.
12. Hoyle J. Status of Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in Lake Ontario and the Response to the Disappearance of *Diporeia* spp. *Proceedings of a workshop on the dynamics of lake whitefish (Coregonus clupeaformis) in the Great Lakes*. 2005. P. 47–61.
13. Courchamp F., Ludek B., Gascoigne J. Allee Effects in Ecology and Conservation. New York : Oxford University Press, 2008.
14. Artyukhin E. N. On biogeography and relationships within the Acipenser. *The Sturgeon quarterly*. 1995. Vol. 3, No. 2. P. 6–8.
15. Anisimova I. M., Lavrovsky V. V. Ichthyology. Moscow : Higher School, 1983 (in Russ.).
16. Ryabova G. D. Variation in morphometric and genetic characteristics of stellate sturgeon juveniles raised at different densities. *Russ. J. Genet.* 2006. Vol. 42, No. 2. C. 182–191.
17. Von Bertalanffy L. Quantitative laws in metabolism and growth. *Quart. Rev. Biol.* 1957. Vol. 32. P. 217–231.

Статья поступила в редколлегию 20.05.2017.
Received by editorial board 20.05.2017.

УДК 595.772:576.895.132:636.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИДОВОГО СОСТАВА, ЛАНДШАФТНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ДИНАМИКИ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ТЕЛЯЗИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ИРАКЕ И ДАГЕСТАНЕ

Е. И. АНИСИМОВА¹⁾

¹⁾Государственное научно-производственное объединение «Научно-практический центр
НАН Беларуси по биоресурсам», ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Приведены сведения о видовом составе, ландшафтном распределении и динамике встречаемости нематод рода *Thelazia* Bosc, 1819 на территориях Ирака и Дагестана. Сравнительный анализ данных показал, что коровы инвазированы телязиозом на 10,25 % в Ираке и 14,9 % в Дагестане. На территориях двух стран зарегистрированы три вида телязий: *Thelazia gulosa* (Railliet et Henry, 1910), *Thelazia skrjabini* (Erschow, 1928) и *Thelazia rhodesi* (Desmarest, 1827) – при доминировании *T. gulosa*. Во всех зонах Дагестана и провинциях Ирака выявлен длительный процесс инвазирования скота телязиями. Исследования пастбищных мух, трофически связанных с крупным рогатым скотом, позволили определить их видовой состав и формы, способные участвовать в циркуляции телязиоза домашних животных. Установлена средняя учетная плотность имаго этих двукрылых. Выявлено, что экстенсивность инвазии статистически достоверно зависит от плотности двукрылых насекомых, но со сдвигом во времени.

Ключевые слова: Кавказ; Междуречье; нематоды; гельминтозы; домашний скот; основные и промежуточные хозяева; пастбищные мухи.

COMPARATIVE ANALYSIS OF SPECIES COMPOSITION, LANDSCAPE DISTRIBUTION AND DYNAMICS OF OCCURRENCE OF VEALS IN CATTLE IN IRAQ AND DAGESTAN

Е. И. ANISIMOVA^a

^aScientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Biological Resources,
27 Akadjemichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Data about species composition, landscape distribution and dynamics of occurrence of nematodes genus *Thelazia* Bosc, 1819 on the territories of Iraq and Dagestan are discussed. Comparative analysis of data has shown that extensiveness of cattle invasion was 10.25 % in Iraq and 14.9 % in Dagestan. Three species of veals were registered on the territories of two countries: *Thelazia gulosa* (Railliet et Henry, 1910), *Thelazia skrjabini* (Erschow, 1928) and *Thelazia rhodesi* (Desmarest, 1827). *T. gulosa* was dominant species. A long process of cattle invasion under the conditions of the all zones

Образец цитирования:

Анисимова Е. И. Сравнительный анализ видового состава, ландшафтного распределения и динамики встречаемости телязий крупного рогатого скота в Ираке и Дагестане // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 87–93.

For citation:

Anisimova E. I. Comparative analysis of species composition, landscape distribution and dynamics of occurrence of veals in cattle in Iraq and Dagestan. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 87–93 (in Russ.).

Автор:

Елена Ивановна Анисимова – доктор биологических наук, доцент; заместитель генерального директора по научной работе.

Author:

Elena I. Anisimova, doctor of science (biology), docent; deputy general director for science.
anis-zoo@yandex.ru

of Dagestan and all provinces of Iraq was revealed. Research on trophically connected with cattle pasture flies allowed to estimate their species composition and forms taking part in thelaziosis distribution. An average density of pasture flies was estimated. It was revealed, that extensiveness of invasion depends statistically reliably from density of Diptera with the time shift.

Key words: Caucasus; Mesopotamia; veals; helminthosis; cattle; definitive and intermediate hosts; pasture flies.

Введение

Важным вопросом для разработки биологических основ профилактических мероприятий при телязиозе является установление видового состава возбудителей, поскольку локализация телязий у крупного рогатого скота (КРС) различна. Нематоды *T. rhodesi* локализуются свободно в конъюнктивальном мешке, тогда как другие – в протоках слезной и гардеровой желез. Исследования данных гельминтозов выполнялись в Дагестане и Ираке. Цель настоящей работы – проведение сравнительного анализа видового состава, ландшафтного распределения и динамики встречаемости телязий крупного рогатого скота в условиях этих стран, а также выявление видового состава их промежуточных хозяев, которыми являются пастбищные мухи.

Характеристика мест исследований

Дагестан расположен на северо-востоке Большого Кавказа в границах Южного федерального округа Российской Федерации. В зависимости от природных особенностей и характера хозяйственной деятельности страна делится на три крупные сельскохозяйственные зоны: равнинную, предгорную и горную. Равнинная зона расположена вдоль побережья Каспийского моря на высотах от 28 до 200 м ниже уровня моря, благоприятна для животноводства, в ней размещается около 35 % поголовья КРС. Предгорная зона занимает полосу шириной 20–50 км на высотах от 200 до 1000 м над уровнем моря, здесь содержится до 15 % животных. Горная зона начинается с 1000 м над уровнем моря, в ней сосредоточено более 50 % поголовья КРС. Дагестан расположен в умеренном климатическом поясе, удален от влияния океана, поэтому климат здесь континентальный. В равнинной зоне около трех месяцев в году средняя температура составляет 25 °С и не менее шести месяцев – выше 10 °С. Отсутствие устойчивого снежного покрова благоприятно для выпаса животных, однако недостаток осадков отрицательно сказывается на возобновлении пастбищ. В предгорной зоне климатические условия для животноводства более благоприятные: достаточно тепла, длительный (200 дней в году) безморозный период, зима мягкая, осадки выпадают равномерно в количестве 400–500 мм в год. В горной зоне три месяца держатся морозы (–5 °С), средняя температура самого теплого месяца составляет 16 °С, годовое количество осадков равняется 500–600 мм в год.

Среди административных единиц Республики Ирак, территория которых была охвачена исследованиями, провинция Бабил расположена к югу от Багдада и относится к так называемому Багдадскому поясу, разграничивающему Верхнее и Нижнее Междуречье. Провинция Дивания лежит на северо-западе Нижнего Междуречья. Большая часть территории провинции Наджаф относится к окраинной зоне Аравийского плоскогорья. Климат данного региона Азии – субтропический средиземноморский с жарким сухим летом и относительно теплой зимой (декабрь – март). Для летнего периода характерны северо-западные ветры, зимнего – северо-восточные, которые сопровождаются песчаной поземкой либо песчаными бурями. Средние температуры июля составляют +32...+35 °С (+25...+28 °С – минимальные, +40...+43 °С – максимальные), января – от +10 до +13 °С (+4...+7 °С – минимальные, +16...+18 °С – максимальные). Осадки выпадают преимущественно в апреле и ноябре – декабре в небольшом количестве (в среднем 100–180 мм в год). Выраженная аридность регионального климата, характер почв и их возрастающая засоленность ограничивают возможности сельскохозяйственного производства, особенно растениеводства, определяя основополагающее значение животноводства [1].

Материалы и методика исследований

В Дагестане были обследованы глаза от 1803 голов КРС (в равнинной зоне – 964, предгорной – 356, в горной – 483). В Ираке исследовались глаза 1463 коров (в провинции Наджаф – 575, в провинции Бабил – 326, в провинции Дивания – 562). Сезонная динамика заражения животных изучалась по результатам ежемесячного обследования. Для выделения телязий у забитых животных вырезалось глазное

яблоко вместе с окружающей его тканью и веками. Осматривали конъюнктивальные полости, а затем вскрывали протоки слезных желез верхнего и третьего века. Для обнаружения молодых форм брались соскобы со слизистых оболочек протоков слезных желез, век и конъюнктивы. Соскобы помещались в физиологический раствор с последующим изучением под микроскопом.

Отловы пастбищных мух проводились на животных в июне – декабре. Сборы зоофильных двукрылых выполняли вручную с использованием энтомологического сачка, которым обмахивали голову животного. Мух собирали с животных на пастбищах рано утром до повышения температуры. Сбор образцов мух и исследования проводили подекадно. Для количественной оценки нападений мух на скот их отлавливали энтомологическим сачком, делая 30–40 взмахов в течение 15 мин. Всего было выполнено 119 учетов и коллектировано 2346 экз. короткоусых двукрылых в Ираке и 5356 экз. в Дагестане. Идентификацию таксономической принадлежности двукрылых вели с использованием определенных таблиц и описаний [2; 3]. Остальные отловленные насекомые были анестезированы ацетоном, определены и обследованы на зараженность личинками телязий с помощью компрессория. Для идентификации видовой принадлежности гельминтов изготавливали временные препараты в смеси глицерина и молочной кислоты. Определение таксономической принадлежности выявленных паразитов выполняли по [4; 5].

Результаты исследований и их обсуждение

Сравнение результатов проведенных исследований выявило, что инвазированы телязиозом коровы в Ираке на 10,25 % и в Дагестане – на 14,9 %. Гельминтологические вскрытия глаз позволили выявить паразитирование у КРС в условиях двух стран трех видов телязий: *Thelazia gulosa* (Railliet et Henry, 1910), *Thelazia skrjabini* (Erschow, 1928) и *Thelazia rhodesi* (Desmarest, 1827) – при доминировании *T. gulosa* (в Ираке на этот вид приходилось 74,0 % числа зараженных животных, в Дагестане – 48,3 %). Другие виды регистрировались реже: в Ираке *T. skrjabini* – у 16,0 % зараженных животных, *T. rhodesi* – у 3,33 %, из общего количества зараженных животных у 6,67 % отмечена смешанная инвазия (*T. gulosa* и *T. skrjabini* или *T. skrjabini* и *T. rhodesi*). В Дагестане *T. skrjabini* регистрировали у 34,6 % зараженных животных, *T. rhodesi* – у 6,7 %, смешанная инвазия (*T. gulosa* и *T. skrjabini* или *T. skrjabini* и *T. rhodesi*) отмечена у 10,4 % животных.

Зараженность крупного рогатого скота телязиями была различна по зонам Дагестана: в равнинной зоне телязии констатированы у 11,7 % животных, в предгорной – у 20,7 %, в горной – у 16,9 %. Во всех трех зонах шире распространена *T. gulosa*. На втором месте находилась *T. skrjabini*, *T. rhodesi* встречалась довольно редко (табл. 1).

Таблица 1

Инвазированность телязиями коров по зонам Дагестана

Table 1

Distribution of veals species in cattle in zones of Dagestan

Зона	Количество обследованных животных, экз.	Относительное количество зараженных животных, %	Доля инвазированных разными видами телязий животных, экз.			
			<i>Thelazia gulosa</i>	<i>Thelazia skrjabini</i>	<i>Thelazia rhodesi</i>	Двумя видами <i>Thelazia</i> одновременно
Равнинная	964	11,7 ± 1,03	49,4	35,9	4,1	10,6
Предгорная	356	20,7 ± 2,1	56,2	37,5	6,2	–
Горная	483	16,9 ± 1,7	39,6	30,4	10,3	19,7
Всего	1803	14,9 ± 0,8	48,3	34,6	6,7	10,4

В провинциях Ирака зараженность крупного рогатого скота телязиями также оказалась различной [6; 7]: в Дивании телязии выявлены у 6,93 % обследованных животных, в Наджафе – у 12,86 %, в провинции Бабил – у 11,76 %. Уровень заражения данными нематодами был наименьшим в провинции Дивания (в 1,7–1,9 раза; $t \geq 53$; $p = 0,001$). Анализ данных по заражению животных отдельными видами телязий показывает, что в условиях всех провинций широко распространена *T. gulosa* и везде примерно на одном уровне: в Дивании – у 71,79 %, в Наджафе – у 75,67 %, в провинции Бабил – у 72,97 % ин-

вазировавшихся животных ($G \leq 0,10$; $p \geq 0,65$). На втором месте на примерно одинаковом уровне встречаемости констатируется *T. skrjabini* ($G \leq 0,90$; $p \geq 0,35$). *T. rhodesi* везде регистрировалась довольно редко. Изредка у животных были констатированы инвазии двумя видами телазий в разных сочетаниях (табл. 2).

Установлена динамика инвазирования коров телазиями в условиях обеих стран, которая различна в провинциях Ирака (рисунок). В провинции Дивания до сентября установлен рост встречаемости заболевания, который удерживается в пределах достигнутого уровня (8,13 %) до декабря. В провинции Бабил инвазированность животных повышается к августу, увеличивается в сентябре и удерживается на сходном уровне до декабря. В Наджафе наблюдалось резкое увеличение зараженности телазиями с июня по июль и количество зараженных животных возрастало в 9,6 раза ($G = 11,25$; $p \leq 0,001$) и держалось в пределах 11,76–20,2 % до декабря. Рост инвазирования здесь начинается на два месяца раньше, достигая пика в ноябре. Данные различия определяются ландшафтно-климатическими условиями провинций.

Таблица 2

Распространение видов телазий у коров по провинциям Ирака

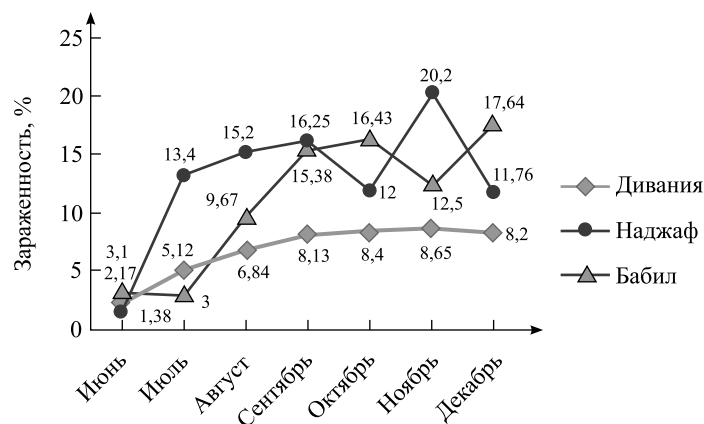
Table 2

Distribution of veals species in cattle in Iraq provinces

Провинция	Количество обследованных животных, экз.	Относительное количество зараженных животных, %	Доля инвазированных разными видами телазий животных, экз.			
			<i>Thelazia gulosa</i>	<i>Thelazia skrjabini</i>	<i>Thelazia rhodesi</i>	Двумя видами <i>Thelazia</i> одновременно
Дивания	562	6,93 ± 1,1	28	7	1	3
Наджаф	575	12,86 ± 2,1	56	10	4	4
Бабил	326	11,76 ± 1,7	27	7	—	3
Всего	1463	10,25 ± 0,8	74,0	16,0	3,33	6,66

Изучение динамики экстенсивности инвазии телазиями КРС в Дагестане дало результаты, приведенные в табл. 3. В горной зоне в июне и июле экстенсивность и интенсивность телазийозной инвазии у скота были невысоки (9,0 и 5,8 экз. соответственно). Подъем зараженности в этой зоне отмечали в августе. В сентябре наблюдался некоторый спад инвазии, в октябре она стала расти, достигнув пика в ноябре. В предгорной зоне более высокие уровни заражения телазиями были констатированы в июне, августе, сентябре и ноябре. Низкие значения зараженности скота наблюдались в июле и октябре.

В равнинной зоне наиболее высокий уровень заражения скота телазиями отмечали, как и в условиях предгорной зоны, в сентябре. Низкий уровень заражения животных регистрировался летом (июнь,



Динамика зараженности коров телазиями в провинциях Ирака
Extensiveness of invasion of cattle by veals in Iraq provinces

июль), затем наблюдали подъем инвазии, а после сентябрьского подъема, в октябре, было отмечено снижение доли зараженных телязиями животных, которое сменилось в ноябре новым незначительным подъемом. Начиная с июня по сентябрь у животных преобладала инвазия *T. gulosa*, в осенние месяцы этот вид замещался двумя другими видами телязий – *T. skrjabini* и *T. rhodesi*. Последний вид начинал выявляться у небольшого числа (3,1 %) животных с сентября, а в ноябре количество коров, зараженных этим видом телязий, сравнялось с числом особей, паразитированных *T. gulosa*. В условиях этой зоны коровы чаще были инвазированы двумя видами паразитов одновременно – из 113 зараженных животных у 13 особей (10,9 %) отмечена инвазия двумя видами телязий: у 10,1 % констатировано паразитирование *T. gulosa* и *T. skrjabini* одновременно и только у одного животного (0,8 %) – *T. skrjabini* и *T. rhodesi*.

Сочетанная инвазия двумя видами телязий отмечалась чаще в июне и октябре (16,7 и 25,0 % соответственно). На основе учета полученных данных о степени половой зрелости паразитов представлялось возможным заключить, что заражение животных телязиями в условиях горной и предгорной зон начинается с июня и этот процесс продолжается до октября, тогда как в условиях равнинной зоны инвазирование крупного рогатого скота происходит в более ранние сроки.

Таблица 3

Сезонная динамика зараженности коров
телязиями по зонам Дагестана, %

Table 3

Extensiveness of invasion of cattle by veals in Dagestan zones, %

Месяц	Зона		
	Равнинная	Предгорная	Горная
Июнь	5,9 ± 1,3	26,6 ± 8,06	12,5 ± 8,2
Июль	5,8 ± 1,5	12,2 ± 4,3	7,9 ± 3,4
Август	20,1 ± 3,7	30,0 ± 10,2	20,0 ± 3,5
Сентябрь	27,8 ± 4,1	30,0 ± 14,5	12,4 ± 2,7
Октябрь	11,7 ± 2,4	12,7 ± 4,5	22,6 ± 3,8
Ноябрь	17,1 ± 5,8	30,0 ± 4,8	33,3 ± 12,1
В среднем	11,8 ± 1,04	22,1 ± 2,5	16,9 ± 1,7

В Ираке на основе степени зрелости самок нематод *T. gulosa* констатировано, что заражение животных телязиями в провинциях Дивания и Наджаф начинается с июня – июля и этот процесс длится до октября, тогда как в провинции Бабил инвазирование КРС происходит в более поздние сроки.

Таким образом, результаты выполненных нами исследований свидетельствуют о длительном процессе инвазирования скота телязиями во всех зонах Дагестана и провинциях Ирака, что совпадает с данными, полученными рядом авторов для Азербайджана [8] и Украины [9].

Кроме того, в ходе проведенных нами исследований в условиях регионов северо-востока Большого Кавказа и Среднего Междуречья изучался видовой состав пастбищных мух, связанных с крупным рогатым скотом. Среди зоофильных двукрылых насекомых выявлены формы, способные участвовать в циркуляции телязиоза домашних животных в условиях Ирака. Установлена средняя учетная плотность имаго двукрылых, которая варьировала от 5,6 до 57,5 экз. за один учет. Преобладали самки *Musca larvipara* Ports. (известные как промежуточный хозяин для всех трех видов телязий) и *Musca mesopotamiensis* Patton [10]. Установлена сезонная динамика относительной численности и плотности мух в Ираке, которая оставалась постоянной с июня по август и увеличивалась, достигая наибольших значений в сентябре и октябре. При этом среднее число учитываемых экземпляров имаго двукрылых для провинции Наджаф в два раза больше, чем для Дивании. Кроме того, к декабрю намечается второй пик численности нападающих мух. В провинции Бабил средняя учетная плотность имаго двукрылых растет с июня по сентябрь, достигая наибольших значений на месяц позже, и удерживается с октября по декабрь в пределах 30,6–38,3 экз. за один учет.

В Дагестане в условиях горной зоны выявлено 17 видов пастбищных мух, докучающих крупному рогатому скоту. К доминантам относятся *Haematobia* (синоним – *Lyperosia*) *irritans* (L.) (индекс доминирования (ИД) равен 37,25 %) и представители рода *Hydrotaea* Robineau-Desvoidy (ИД – 32,4 %). В горной зоне фауна мух была более оригинальна (индекс сходства с предгорной зоной составляет 30,0 %, с равнинной – 28,5 %). В предгорной зоне выявлено 13 видов пастбищных мух, причем на три из них – *Musca autumnalis* Deg., *M. larvipara* и *H. irritans* – приходилось 60,9 % числа учтенных экземпляров этих двукрылых. В условиях равнинной зоны на коровах зарегистрировано 11 видов докучавших коровам пастбищных мух, среди которых доминировали *M. autumnalis* и *H. irritans*, в сумме их количество составляло 55,4 % числа учтенных имаго двукрылых. Пастбищные мухи в данных двух зонах представлены однотипными комплексами гематофагов с индексом сходства 47,8 %. В результате изучения сезонной динамики нападения мух на КРС выявлено, что она имеет высокую интенсивность в течение сезона, причем наблюдается смена массовых видов. Выявлены четыре вида двукрылых – переносчиков личинок телязий: *Hydrotaea* sp., *M. autumnalis*, *Musca osiris* Wiedemann и *Musca vitripennis* Mg.

Расчет значения рангового коэффициента корреляции по Спирмену (r_s) показал, что экстенсивность инвазии статистически достоверно ($r_s = 0,94$; $p = 0,005$) зависит от плотности двукрылых насекомых со сдвигом во времени в один месяц. Это говорит о том, что увеличение количества мух в июне приводит к росту инвазированности гельминтами в июле, что хорошо согласуется с особенностями биологических циклов данных нематод. Динамика интенсивности телязиоза крупного рогатого скота также положительно коррелирует с плотностью двукрылых насекомых ($r_s = 0,74$; $p = 0,057$).

Заключение

По результатам выполненных исследований в Дагестане (Российская Федерация) и Среднем Междуречье (Ирак) зарегистрированы три вида телязий (*Thelazia* Bosc, 1819) – возбудителей телязиоза крупного рогатого скота: *Thelazia gulosa* (Railliet et Henry, 1910), *Thelazia skrjabini* (Erschow, 1928) и *Thelazia rhodesi* (Desmarest, 1827). Среди них доминирует *T. gulosa*. Во всех зонах Дагестана и провинциях Ирака выявлен длительный процесс инвазирования скота телязиями. Исследование пастбищных мух, трофически связанных с крупным рогатым скотом, позволило выявить их видовой состав и формы, способные участвовать в циркуляции телязиоза домашних животных. Определена средняя учетная плотность имаго этих двукрылых. Установлено, что экстенсивность инвазии статистически достоверно зависит от плотности двукрылых насекомых, но со сдвигом во времени на месяц.

Библиографические ссылки

1. Bakheet A. Geographical data for low Najaf // J. geogr. 2007. Vol. 1, № 2. P. 234–262.
2. Штакельберг А. А. Синантропные двукрылые фауны СССР. М. ; Л. : Издательство АН СССР, 1956.
3. Skidmore P. The Biology of the Muscidae of the World. Dordrecht : Dr. W. Junk Publishers, 1985.
4. Soulsby E. J. L. Helminths, Arthropods, and Protozoa of Domesticated Animals. 5th ed. London : Baillière Tindall, 1978.
5. Ивашкин В. М., Мухаммадиев С. А. Определитель гельминтов крупного рогатого скота. М. : Наука, 1981.
6. Anisimova E. I., Al-Fatlawi M. A. A. The eyeworm, *Thelazia gulosa* (Railliet and Henry, 1910), in cattle in IRAQ // Sci. J. Vet. Med. Sci. Al-Qadisiyah. 2012. Vol. 11, № 3. P. 67–75.
7. Al-Fatlawi M. A. A., Анисимова Е. И. Телязиоз крупного рогатого скота в Среднем Междуречье (Ирак) // Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков : материалы VI Междунар. науч.-практ. конф. (Новосибирск, 20 июня 2014 г.). Новосибирск, 2014. С. 161–166.
8. Кейсеровская М. А. Распространение и видовой состав возбудителей телязиоза крупного рогатого скота в различных экологических зонах Азербайджана // Материалы науч. конф. БОГ (Москва, 11–13 дек. 1969 г.) : в 2 ч. Москва, 1969. Ч. 1. С. 113–117.
9. Клесов М. Д. Телязиоз крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Киев, 1950.
10. Al-Fatlawi M. A. A., Волосач М. В., Буга С. В. и др. Двукрылые насекомые (Insecta: Diptera) – переносчики возбудителей телязиоза крупного рогатого скота в Среднем Междуречье (Ирак) // Тр. БГУ. 2013. Т. 8 : в 2 ч. Ч. 1. С. 79–86.

References

1. Bakheet A. Geographical data for low Najaf. J. geogr. 2007. Vol. 1, No. 2. P. 234–262.
2. Shtackelberg A. A. Sinantropic dipteral in USSR fauna. Moscow ; Leningrad : Academy of sciences of the USSR, 1956 (in Russ.).
3. Skidmore P. The Biology of the Muscidae of the World. Dordrecht : Dr. W. Junk Publishers, 1985.
4. Soulsby E. J. L. Helminths, Arthropods, and Protozoa of Domesticated Animals. 5th ed. London : Baillière Tindall, 1978.

5. Ivashkin V. M., Muchamadiev S. A. Key book for cattle helminthes identification. Moscow : Nauka, 1981 (in Russ.).
6. Anisimova E. I., Al-Fatlawi M. A. A. The eyeworm, *Thelazia gulosa* (Railliet and Henry, 1910), in cattle in IRAQ. *Sci. J. Vet. Med. Sci. Al-Qadisiyah*. 2012. Vol. 11, No. 3. P. 67–75.
7. Al-Fatlawi M. A. A., Anisimava E. I. Theliasiosis of cattle in the middle Interfluve (Iraq) : materials of the VI Int. sci. and practical conf. *Agricultural sciences and agricultural complex on the border of centuries* (Novosibirsk, 20 June, 2014). Novosibirsk, 2014. P. 161–166 (in Russ.).
8. Kejsеровskaya M. A. Distribution and species composition of thelasiosis causatives in cattle in different ecological zones of Azerbajdzan. *Materials of VOG* (Moscow, 11–13 Dec., 1969) : in 2 parts. Moscow, 1969. Part 1. P. 113–117 (in Russ.).
9. Klesov M. D. Theliasiosis of cattle : avtoreferat dissertatsii... doktora biol. nauk. Kyiv, 1950 (in Russ.).
10. Al-Fatlawi M. A. A., Volosach M. V., Buga S. V., et al. Dipterous insects (Insecta: Diptera) as possible vectors of the cattle thelaziosis in Mesopotamia (Iraq). *Proc. of the BSU*. 2013. Vol. 8 : in 2 parts. Part 1. P. 79–86 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 20.06.2017.
Received by editorial board 20.06.2017.

УДК 576.895.1

РОЛЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ХОЗЯЕВ В РАСПРОСТРАНЕНИИ ГЕЛЬМИНТОВ ДОМАШНИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ТЕРРИТОРИИ АЗЕРБАЙДЖАНА

Р. Ш. ИБРАГИМОВА¹⁾

¹⁾Институт зоологии НАНА, ул. А. Аббасзаде, кв. 504, пер. 1128, AZ 1073, г. Баку, Азербайджан

Определена роль промежуточных хозяев, обуславливающих распространение в природе, среди людей и жвачных животных гельминтов домашних плотоядных. Кроме того, были установлены значение промежуточных хозяев как основного фактора формирования комплекса гельминтофауны, их видовое разнообразие и образование очагов возбудителей главнейших гельминтозов. Промежуточные хозяева являются основным источником на пути заражения человека и жвачных животных потенциально опасными патогенными гельминтами.

Ключевые слова: домашние плотоядные животные; гельминты; грызуны; пресмыкающиеся; птицы; насекомые; дождевые черви; моллюски.

THE ROLE OF INTERMEDIATE HOSTS IN THE SPREAD OF WORMS DOMESTIC CARNIVORES IN AZERBAIJAN

R. Sh. IBRAHIMOVA^a

^a*Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Azerbaijan,
Abbaszade Street, 504 block, 1128 side street, Baku AZ 1073, Azerbaijan*

The paper is devoted to the definition of the role of intermediate hosts in the spread of helminthes of domestic carnivores in nature, among people and ruminants. In addition, it was established the significance of intermediate hosts, as a determining factor in the formation of the complex of helminthofauna, significant species diversity and formation of centers of the major agents of helminthiasis. Intermediate hosts are the main source of infection of men and ruminant animals, potentially dangerous pathogenic helminthes.

Key words: domestic carnivores; helminthes; rodents; reptiles; birds; insects; earthworm; molluscs.

Введение

Благоприятные климатические условия на территории Азербайджана стали причиной развития, размножения и широкого распространения различных видов позвоночных и беспозвоночных животных. Часть этих животных (грызуны, пресмыкающиеся, насекомые, наземные и пресноводные моллюски, дождевые черви, птицы, рыбы и др.), являясь промежуточными хозяевами опасных гельминтов, способствуют их распространению.

Образец цитирования:

Ибрагимова Р. Ш. Роль промежуточных хозяев в распространении гельминтов домашних плотоядных животных на территории Азербайджана // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 94–100.

For citation:

Ibrahimova R. Sh. The role of intermediate hosts in the spread of worms domestic carnivores in Azerbaijan. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 94–100 (in Russ.).

Автор:

Рейхан Шохлат Ибрагимова – старший научный сотрудник.

Author:

Reychan Shoxlat Ibrahimova, senior researcher.
qarafataliyev@bk.ru

Для развития гельминтов помимо наличия в пределах территорий их распространения свойственных им хозяев важно присутствие промежуточных хозяев. Последние считаются основным источником заражения человека и жвачных животных опасными гельминтами. Кроме того, промежуточные хозяева играют значительную роль в формировании комплекса гельминтофауны животных, возникновении разнообразия видов, составляющих гельминтофауну, циркуляции патогенных гельминтов в природе, среди людей, домашних жвачных животных и образовании очагов возбудителей главнейших гельминтозов.

Имеются сведения ряда исследователей о промежуточных хозяевах гельминтов домашних плотоядных животных из различных районов Азербайджана [1; 2]. Однако их оценку роли промежуточных хозяев в развитии и распространении гельминтов нельзя считать удовлетворительной в связи с недостаточной проработкой.

Произошедшая за последние 20–25 лет на территории Азербайджанской Республики антропогенная трансформация, вызванная процессами гиперурбанизации, миграции, развития туризма и некоторыми изменениями ландшафта, стала причиной изменений в формировании фауны промежуточных хозяев.

В связи с важностью влияния указанных факторов считается целесообразным выяснение роли промежуточных хозяев в развитии и распространении опасных гельминтов на территории республики. В настоящее время исследование роли промежуточных хозяев гельминтов домашних плотоядных животных является актуальным и имеющим важное практическое значение.

Материалы и методы исследований

В целях определения роли промежуточных хозяев в развитии и распространении гельминтов на территории Азербайджана с различными физико-географическими особенностями разными гельминтологическими методами были исследованы 947 бродячих собак, 1256 домашних кошек, собранные с их покровов блохи (856 – с шерсти собак и 967 – с шерсти кошек), 876 пресноводных моллюсков, 438 жуков, 12 желтопузиков, 15 полосатых ящериц, 6 кавказских агам, 5 прытких ящериц и 8 обыкновенных ужей [3; 4].

Из выявленных видов гельминтов трематоды, цестоды и акантоцефалы зафиксированы в 70 % спиртах, а нематоды – в 4 % формалине. Для определения трематод, цестод и акантоцефал используется метод окрашивания, затем из них приготавливаются постоянные препараты. Из нематод готовят временные препараты в смеси молочной кислоты с глицерином в соотношении 1 : 1.

Капсулы трихинелл, блохи и жуки, которые являются промежуточными хозяевами, исследуются компрессорным методом [4]. Под микроскопом МБИ-6 (Olympus SZ2=ST, Olympus corporation, Japan) при 20- и 40-кратном увеличении рассмотрены эти постоянные и временные препараты, проведены их биометрические измерения и определены до вида.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате исследования у домашних плотоядных животных выявлено 62 вида гельминтов: 7 видов – трематод, 26 – цестод, 1 – акантоцефал и 28 – нематод. По циклу развития 50 видов относятся к биогельминтам и 12 – к геогельминтам.

Нами установлена роль промежуточных хозяев в развитии и распространении 50 видов гельминтов (таблица).

Развитие и распространение гельминтов в природе, как видно из таблицы, обеспечиваются промежуточными хозяевами – представителями разных видов животных. Кроме того, эти промежуточные хозяева являются пищей для животных. Отмечено, что чем шире разнообразие промежуточных хозяев, составляющих рацион животного, и выше их количество, тем больше видовое разнообразие и численность гельминтов. Единственным фактором, приводящим к возникновению большого видового разнообразия гельминтов, являются промежуточные хозяева, так как существует коррелятивная связь между составом пищи и зараженностью гельминтами [5].

На территориях с развитым зерноводством широко распространены различные виды грызунов, которые, являясь промежуточными хозяевами многих цестод, служат причиной увеличения числа видов гельминтов домашних плотоядных животных и их широкого распространения.

В ходе наших многолетних исследований было установлено, что при поедании домашними плотоядными животными различных грызунов происходит заражение такими видами гельминтов, как *H. taeniaeformis*, *H. krepkogorski*, *M. lineatus*, *M. corti*, *M. petrowi*, *T. laticollis*, *T. pisiformis*, *T. crassiceps*, *T. solium* (larvae), *T. polyacantha*, *A. multilocularis*, *J. rossicum* и *T. spiralis* [1; 6].

При питании домашних плотоядных животных различного вида пресмыкающимися происходит заражение следующими гельминтами: *A. alata*, *D. nolleri*, *D. skryabini*, *Sp. erinacei-europei*, *J. echinorhynchoides*, *J. pasguallei*, *M. catulinus*, *Sp. lupi*, *Ph. sibirica*.

Наличие гельминтов домашних плотоядных животных
и их промежуточных хозяев на территории Азербайджана

Helminths of domestic carnivores and their intermediate
hosts on the territory of Azerbaijan

Гельминты	Домашние плотоядные животные		Промежуточные хозяева
	Бродячие собаки	Домашние кошки	
Трематоды			
<i>Alaria alata</i> Goeze	+	+	Пресноводные моллюски. Резервуарные хозяева: пресмыкающиеся, земноводные, птицы
<i>Plagiorchis elegans</i> Rudolphi	+	—	Моллюски. Дополнительный хозяин: ракообразные, пресмыкающиеся
<i>Euparyphium melis</i> Schrank	+	—	Моллюски (<i>Stagnicola emarginata</i> , <i>Lymnaea stagnalis</i>). Дополнительные хозяева: различные виды амфибий
<i>Echinochasmus perfoliatus</i> Ratz	+	+	Пресноводные рыбы. Промежуточный хозяин: пресноводные моллюски (<i>Balumis musstriatus</i>)
<i>Pharhyngostomum cordatum</i> Diesing	+	+	Пресноводные моллюски, змеи, амфибии
<i>Ph. fausti</i> Skryabin et Popov	—	+	Пресноводные моллюски
Цестоды			
<i>Spirometra erinacei-europei</i> Rudolphi	+	+	Циклопы. Дополнительные хозяева: амфибии, пресмыкающиеся
<i>Dipylidium caninum</i> Lühe	+	+	Блохи из родов <i>Ctenocephalus</i> , <i>Culex</i> , человек
<i>Diplopylidium nolleri</i> Skryabin	+	+	Цистицеркоиды на теле пресмыкающихся
<i>D. skryabini</i> Popov	—	+	Гекконы (ящерицы)
<i>Joyeuxiella Echinorhynchoides</i> Sonsino	+	+	Пресмыкающиеся
<i>J. pasqualei</i> Diamare	—	+	Пресмыкающиеся
<i>Taenia hydatigena</i> Pallas	+	+	Цисты (личиночная стадия), жвачные парнокопытные, грызуны, человек
<i>T. laticollis</i> Rudolphi	+	+	Белые мыши
<i>T. parenchimatosa</i> Pushmenkov	+	—	Северный и благородный олени
<i>T. ovis</i> Cobbold	+	—	Овцы, козы, газели, верблюды
<i>T. cervi</i> Christiansen	+	—	Дикие парнокопытные
<i>T. krabbei</i> Moniez	+	—	Северные олени
<i>T. pisiformis</i> Bloch	+	+	Зайцы, кролики, грызуны
<i>Hydatigera taeniaeformis</i> Batsch	+	+	Грызуны и насекомоядные
<i>Multiceps multiceps</i> Leske	+	—	Дикие и домашние копытные животные
<i>Alveococcus multilocularis</i> Leuckart	+	—	Грызуны
<i>Echinococcus granulosus</i> Batsch	+	—	Копытные млекопитающие (онкосферы)
<i>Tetratirotaenia polyacantha</i> Leuckart	+	—	Грызуны

Окончание таблицы
Ending table

Гельминты	Домашние плотоядные животные		Промежуточные хозяева
	Бродячие собаки	Домашние кошки	
<i>Mesocestoides lineatus</i> Goeze	+	+	Орибатидные клещи. Дополнительные хозяева: мышевидные грызуны, пресмыкающиеся
<i>M. corti</i> Hoppli	+	–	Грызуны
Акантоцефалы			
<i>Macracanthorhynchus catulinus</i> Kostylew	+	–	Жуки-чернотелки. Резервуарные хозяева: насекомоядные, грызуны, пресмыкающиеся
Нематоды			
<i>Capillaria plica</i> Rudolphi	+	+	Дождевые черви (<i>Lumbricus terrestris</i>)
<i>C. felis-cati</i> Bellingham	–	+	Дождевые черви
<i>C. putorii</i> Rudolphi	+	+	Дождевые черви
<i>Thominx aerophilus</i> Creplin	+	+	Дождевые черви
<i>Tr. vulpis</i> Froelich	+	–	–
<i>Trichinella spiralis</i> Owen	+	+	Облигатные. Млекопитающие, факультативные грызуны, насекомоядные
<i>Strongyloides vulpis</i> Petrow	+	–	–
<i>Ancylostoma caninum</i> Ercolani	+	+	–
<i>A. tubaeforme</i> Zeder	–	+	–
<i>Uncinaria stenocephala</i> Railliet	+	+	–
<i>Gongylonema pulchrum</i> Molin	+	–	Жуки (семейство Scarabaeidae)
<i>Grenosoma vulpis</i> Rudolphi	+	–	Наземные моллюски (<i>Arion intermedius</i>)
<i>Angiostrongylus vasorum</i> Railliet	+	–	Наземные моллюски
<i>Toxoascaris leonina</i> Linstow	+	+	–
<i>Toxocara canis</i> Werner	+	+	–
<i>T. mystax</i> Zeder	+	+	–
<i>Spirura rytipleurites</i> Deslongchamps	+	+	Жуки-чернотелки, черные тараканы
<i>Spirocerca arctica</i> Petrow	+	–	Жуки
<i>Physaloptera praeputiale</i> Linstow	+	+	Жесткокрылые, тараканы
<i>Ph. sibirica</i> Petrow et Gorbunow	+	+	Жесткокрылые, тараканы
<i>Rictularia affinis</i> Jagerskiold	+	+	Жесткокрылые, тараканы
<i>R. cahirensis</i> Jagerskiold	+	+	Жесткокрылые, тараканы
<i>Ascarops strongylina</i> Rudolphi	+	–	Жуки, личиночная стадия, пресмыкающиеся
<i>Dirofilaria repens</i> Railliet et Henry	+	+	Белокрылки родов <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i>
Всего	46	32	–

Нами установлено, что 2 из 12 желтопузиков были для *A. alata* дополнительными хозяевами. В полости тела желтопузиков были отмечены 2–3 особи *A. alata*. В полости тела одной особи зеленой ящерицы обнаружены 3 особи *D. skryabini*, а других ящериц – 2 особи цистицеркоид *D. nolleri*. У желтопузика и обыкновенного ужа отмечены 2–4 особи процеркоид *Sp. erinacei-europei*.

Установлено, что основным промежуточным хозяином видов гельминтов *J. echinorhynchoides* и *J. pasguallei* являются кавказская агама и прыткая ящерица. В них отмечены 2–7 и 3–6 процеркоид соответственно.

В брюшной полости кавказской агамы и прыткой ящерицы зарегистрированы 6 особей цистицеркоид *M. lineatus*. В препаратах мышечной ткани кавказской агамы и зеленой ящерицы обнаружены капсулированные личинки спироцерки (по 6–7 особей в каждом). Кавказская агама и зеленая ящерица выступают дополнительными хозяевами для *Sp. lupi*, *Ph. sibirica*. Кавказская агама, прыткая и зеленая ящерицы являются промежуточными хозяевами для *M. catulinus* [2; 7].

На территории Азербайджана производится забой большого количества сельскохозяйственных животных и зараженные гельминтозами их внутренние органы выбрасываются на мусорные свалки, где и происходит заражение питающихся ими домашних плотоядных такими видами гельминтов, как *T. hydatigena*, *T. ovis*, *E. granulosus*, *M. multiceps*. Решающую роль в распространении этих гельминтов играют в основном бродячие собаки.

Создание туристических баз и санаториев способствует скоплению вблизи них домашних плотоядных, что также стало причиной распространения промежуточных хозяев возбудителей главнейших гельминтозов [7].

В ходе исследования из синантропных очагов у бродячих собак нами были обнаружены такие виды гельминтов, как *T. krabbei*, *T. cervi*, *T. parenchimatosa*, промежуточными хозяевами которых считались дикие парнокопытные животные [8; 9].

При исследовании пресноводных моллюсков – промежуточных хозяев гельминтов, – собранных на различных территориях Азербайджана, у них были отмечены личинки гельминтов видов *A. alata*, *Pl. elegans*, *Ph. cordatum*, *Ph. fausti*, *E. melis*, *E. perfoliatus*, *Cr. lingua*. Заражение домашних плотоядных происходит на околотовных территориях при случайном заглатывании вместе с пищей зараженных гельминтами пресноводных моллюсков. В литературе отмечается, что у наземных моллюсков обнаружены виды *G. vulpis*, *A. vasorum* [9].

У домашних плотоядных зарегистрированы гельминты *D. caninum*, *D. repens*, *Sp. rytipleurites*, *Sp. lupi*, *M. catulinus*, *S. arctica*, *G. pulchrum*, *Ph. sibirica*, *R. affinis*, *R. cahirensis*, *Ph. praeputiale*, *A. strongylina*, промежуточными хозяевами которых были насекомые (блохи, комары, жуки, черные тараканы). Промежуточными хозяевами вида *D. caninum* выступают блохи с покрова собак (*Ctenocephalus canis*) и кошек (*Ct. felis*). Исследования показали, что зараженность цистицеркоидами блох с покрова собак составила 39,7 %, кошек – 32,4 %.

Промежуточными хозяевами *D. repens* являются комары родов *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*. В регионах с субтропическим климатом зараженность комаров равняется 30,8 %.

Гельминты *R. affinis*, *R. cahirensis*, *Ph. sibirica*, *Sp. lupi*, для которых роль промежуточных хозяев выполняют жуки и черные тараканы, экстенсивно распространяются среди домашних плотоядных.

В ходе исследований также выявлены гельминты *C. plica*, *C. putorii*, *Th. aerophilus*, предпочитающие условия с высокой влажностью, промежуточными хозяевами которых являются дождевые черви [1; 9]. У вида *D. latum* первый промежуточный хозяин – циклопы, второй – рыбы [10]. Следует отметить, что эти виды промежуточных хозяев служат фактором, влияющим на формирование комплекса гельминтофауны, так как все выявленные виды гельминтов распространяются среди животных при участии промежуточных хозяев и входят в состав комплекса гельминтофауны, обуславливая ее своеобразие [11].

Промежуточным хозяевам принадлежит решающая роль в передаче патогенных гельминтов от зараженных животных другим животным и человеку, а также в их циркуляции среди людей и животных, что имеет большое значение для экосистем. Например, передача гельминта *D. latum* рыбам, домашним плотоядным животным и человеку происходит с участием промежуточных хозяев – циклопа и рыб. Вид гельминта *D. caninum* передается домашним плотоядным и человеку от промежуточных хозяев – блох с покровов кошек и собак. В цикле развития вида *T. solium* происходит смена хозяев, в качестве которых выступают свиньи, грызуны, человек; вида *Ech. granulosus* – парнокопытные млекопитающие, собаки, человек; вида *Tr. spiralis* – свиньи, крысы, человек. При развитии гельминта *D. repens* в цикле смены хозяев – собаки, кошки, человек – задействованы комары. В цикле вида *M. catulinus* отчасти в качестве промежуточных хозяев выступают жуки, особенно жуки-чернотелки.

Значительна роль промежуточных хозяев в возникновении на определенных территориях очагов заражения, их расширении и устойчивости. Промежуточные хозяева являются одной из главных при-

чин распространения трансмиссивных заболеваний, образования очагов возбудителей главнейших гельминтозов, передачи их из одного очага в другой и сохранения в определенных местах в течение длительного периода.

В ходе исследований было выявлено участие грызунов как промежуточных хозяев в образовании сильносинантропных очагов заражения возбудителями главнейших гельминтозов – эхинококкоза, дипилидиоза, дифиллоботриоза и слабосинантропных очагов – тениидиоза, трихинеллеза, альвеококкоза [11].

Без участия промежуточных хозяев биогельминты не могут завершить свое развитие – прерывается связь между животными и человеком, цикл нарушается и заражения не происходит. Поскольку один из этапов развития биогельминтов происходит в промежуточных хозяевах, то после этого они становятся звеном в цепи их распространения.

Заключение

Наличие промежуточных хозяев обуславливает заражение человека и домашних жвачных животных патогенными гельминтами, входящими в состав гельминтофауны домашних плотоядных. В первую очередь необходимо выявить роль промежуточных хозяев как основного источника заражения, а затем подготовить научные основы профилактических мер борьбы с ними.

Таким образом, во-первых, необходимо прервать связь между животными и промежуточными хозяевами, способствующими развитию и распространению гельминтов, во-вторых, требуются соответствующие меры борьбы с грызунами и пресмыкающимися, которые являются промежуточными хозяевами, обеспечивающими связь между природными и синантропными очагами инвазионных заболеваний и их распространение.

Из сказанного следует, что промежуточные хозяева представляют опасность как фактор непосредственного влияния на развитие и распространение гельминтов домашних плотоядных животных, формирования комплекса гельминтофауны животных, возникновения большого видового разнообразия гельминтов и образования очагов возбудителей главнейших гельминтозов.

Библиографические ссылки

1. Елчуев М. Ш., Ибрагимова Р. Ш., Будагова Т. И. Роль в экосистеме гельминтов и их промежуточных хозяев домашних плотоядных животных на Прикаспийских территориях // Тр. Ин-та зоологии НАН Азербайджана. 2006. Вып. XXVIII. С. 905–911.
2. Фаталиев Г. Г., Елчуев М. Ш., Ибрагимова Р. Ш. Роль промежуточных хозяев в распространении гельминтов диких и домашних животных в Ширванской зоне // Материалы конференции, посвященные 90-летию юбилею журнала «Научные успехи в биологии» (Баку, 22–23 мая 2009 г.). Баку, 2009. С. 404–405.
3. Скрабин К. И. Методы полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека. М. : Издательство МГУ, 1982.
4. Боев С. Н., Соколова И. Б., Панин В. Я. Гельминты копытных животных Казахстана. Алма-Ата : Издательство АН Казахской ССР, 1962.
5. Елчуев М. Ш., Фаталиев Г. Г., Ибрагимова Р. Ш. Изучение видового разнообразия гельминтов диких и домашних плотоядных на территории горного Ширвана // Тр. О-ва зоологов Азербайджана. 2010. Вып. II. С. 230–233.
6. Асланова Э. К. Гельминтофауна грызунов в равнинном поясе Ленкоранской природной области и ее биоэкологические особенности // Изв. НАН Азербайджана. Сер.: Биол. и мед. науки. 2016. Вып. 71, № 1, С. 81–88.
7. Елчуев М. Ш., Ибрагимова Р. Ш. Гельминтофауна домашних плотоядных и влияние факторов на ее формирование в Ленкоранской природной области // Тр. Ин-та зоологии НАН Азербайджана. Сер.: Биол. и мед. науки. 2013. Вып. 31, № 2. С. 160–166.
8. Елчуев М. Ш. Экологическая характеристика гельминтов собак Шеки-Закатальской зоны // Материалы респ. науч.-практ. конф. молодых ученых (Баку, 12–14 мая 1982 г.). Баку, 1982. С. 94–96.
9. Ибрагимова Р. Ш. Гельминтофауна домашних плотоядных животных и ее эпизоотологическая, эпидемиологическая характеристика в Азербайджане // Сб. изв. Гянджинского регион. науч. центра НАН Азербайджана. 2016. № 1 (63). С. 36–41.
10. Елчуев М. Ш., Ибрагимова Р. Ш. Первое обнаружение широкого лентеца – *Diphyllobothrium latum* (L.) Lühe у домашних кошек в Азербайджане // Известия АН Азербайджана. Сер.: Биол. науки. 1993. № 1/3. С. 41–44.
11. Фаталиев Г. Г., Елчуев М. Ш., Ибрагимова Р. Ш. Природные и синантропные очаговости возбудителей главнейших гельминтозов диких и домашних плотоядных животных в Ширване // Изв. НАН Азербайджана. Сер.: Биол. науки. 2011. Вып. 66, № 3. С. 132–136.

References

1. Elchuev M. Sh., Ibragimova R. Sh., Budagova T. I. Role in the ecosystem of helminths and their intermediate hosts of domestic carnivores in the Caspian territories. *Tr. Inst. zool. NAN Azerbaijan*. 2006. Vol. XXVIII. P. 905–911 (in Russ.).
2. Fataliev G. G., Elchuev M. Sh., Ibragimova R. Sh. The role of intermediate hosts in the distribution of helminths of wild and domestic animals in the Shirvan zone. *Proc. conf. on the 90th anniversary of the «Scientific successes in biology»* (Baku, 22–23 May, 2009). Baku, 2009. P. 404–405 (in Russ.).

3. Scriabin K. I. Methods of complete helminthological autopsy of vertebrates, including humans. Moscow : Publishing house of Moscow State University, 1982 (in Russ.).
4. Boev S. N., Sokolova I. B., Panin V. Ya. Helminths of hoofed animals in Kazakhstan. Alma-Ata : Publishing house of AN Kazakhskoi SSR, 1962 (in Russ.).
5. Elchuev M. Sh., Fataliev G. G., Ibragimova R. Sh. A study of the species diversity of helminths of wild and domestic carnivores in the territory of the mountainous Shirvan. *Tr. Obschestva zoologov Azerbaidzhana*. 2010. Issue II. P. 230–233 (in Russ.).
6. Aslanova E. K. Helminth fauna of rodents in the lowland belt of the Lenkoran natural region and its bioecological features. *Izv. Natsional'noi akad. nauk Azerbaidzhana. Ser.: Biol. i med. nauki*. 2016. Issue 71, No. 1. P. 81–88 (in Russ.).
7. Elchuev M. Sh., Ibragimova R. Sh. Helminth fauna of domestic carnivores and the influence of factors on its formation in the Lenkoran natural region. *Tr. Inst. zoologii Natsional'noi akad. nauk Azerbaidzhana. Ser.: Biol. i med. nauki*. 2013. Issue 31, No. 2. P. 160–166 (in Russ.).
8. Elchuev M. Sh. Ecological characteristics of helminths of the dogs of the Sheki-Zagatala zone. *Materialy resp. nauchn.-prakt. konf. molodykh uch.* [Materials of the repub. sci.-pract. conf. of the young sci. (Baku, 12–14 May, 1982)]. Baku, 1982. P. 94–96 (in Russ.).
9. Ibragimova R. Sh. Helminth fauna of domestic carnivores and its epizootic, epidemiological characteristics in Azerbaijan. *Natl. Acad. Sci. Azerbaijan. «Izv. Collect.» Ganja Dep.* Ganja, 2016. No. 1 (63). P. 36–41 (in Russ.).
10. Elchuev M. Sh., Ibragimova R. Sh. The first discovery of a wide ribbon – *Diphyllbothrium latum* (L.) Lühe in domestic cats in Azerbaijan. *Izv. Acad. nauk Azerbaidzhana. Ser.: Biol. nauki*. 1993. No. 1/3. P. 41–44 (in Russ.).
11. Fataliev G. G., Elchuev M. Sh., Ibragimova R. Sh. Natural and synanthropic foci of the causative agents of the main helminthiasis of wild and domestic carnivores in Shirvan. *Izv. Natsional'noi akad. nauk Azerbaidzhana. Ser.: Biol. nauki*. 2011. Issue 66, No. 3. P. 132–136 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 22.03.2017.
Received by editorial board 22.03.2017.

ПИТАНИЕ ФОНОВЫХ ЛЕСНЫХ ВИДОВ ПЕРЕЛЕТНЫХ ВОРОБЬИНООБРАЗНЫХ ПТИЦ В РАННЕВЕСЕННИЙ ПЕРИОД

Д. Г. ДОМАНЦЕВИЧ¹⁾

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

В условиях ранневесеннего периода проанализирован состав питания четырех фоновых лесных перелетных воробьинообразных птиц Беларуси: зяблика (*Fringilla coelebs*), зарянки (*Erithacus rubecula*), черного и певчего дроздов (*Turdus merula*, *Turdus philomelos*). В основу работы положены результаты анализа содержимого пищеварительных трактов птиц, погибших в 2010–2015 гг. в последней декаде марта – последней декаде апреля в различных регионах Беларуси. В пищеварительных трактах исследуемых видов птиц было выявлено 919 кормовых объектов. В питании зяблика отмечаются высокая встречаемость и большая доля долгоносиков (Curculionidae). У зарянки зарегистрированы потребление беспозвоночных разных экологических групп и полное отсутствие растительных кормов. Установлено, что на территории Беларуси ранней весной в состав корма черного и певчего дроздов входят семена хвойных деревьев, о чем в литературе сообщается впервые. Для зяблика, зарянки и черного дрозда характерны некоторые общие закономерности в потреблении животных кормов: свыше 50 % всех кормовых объектов в их питании составляют насекомые, из которых более половины являются жесткокрылыми разных таксономических и экологических групп.

Ключевые слова: питание; состав питания; воробьинообразные; ранневесенний период; кормовые объекты; Беларусь.

Благодарность. Автор выражает глубокую благодарность кандидату биологических наук Л. С. Чумакову, кандидату биологических наук Ж. Е. Мелешко, кандидату биологических наук Д. И. Третьякову, кандидату биологических наук О. Л. Нестеровой и кандидату биологических наук В. Н. Тихомирову за консультативную помощь в определении кормовых объектов. В сборе материалов принимали участие заведующий кафедрой общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета БГУ доктор биологических наук, профессор В. В. Гричик, научный сотрудник Национального парка «Беловежская пуща» А. И. Кузьмицкий, а также студенты биологического факультета БГУ С. Ч. Смялковская, А. В. Рак, С. А. Орловский и А. О. Саулов.

NUTRITION OF BACKGROUND FOREST SPECIES OF MIGRATORY PASSERINE BIRDS DURING THE EARLY-SPRING PERIOD

D. G. DOMANTSEVICH^a

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

In this work the food content of four background forestry migratory passerine birds of Belarus: Chaffinch (*Fringilla coelebs*), Robin (*Erithacus rubecula*), Blackbird and Song thrush (*Turdus merula*, *Turdus philomelos*) in conditions of the early-spring period is analyzed. The work is based on the results of digestive tracts contents analysis of birds that died during the period from 2010 to 2015 from the last ten-day period of March to the last ten-day period of April in different regions of the country. Totally 919 food items were found in the digestive tracts of studied species of birds. In Chaffinch nutrition it is noted a high occurrence and proportion of weevils (Curculionidae). In Robin nutrition – the presence of

Образец цитирования:

Доманцевич Д. Г. Питание фоновых лесных видов перелетных воробьинообразных птиц в ранневесенний период // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 101–112.

For citation:

Domantsevich D. G. Nutrition of background forest species of migratory passerine birds during the early-spring period. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 101–112 (in Russ.).

Автор:

Дмитрий Геннадьевич Доманцевич – аспирант кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета. Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор В. В. Гричик.

Author:

Dmitry G. Domantsevich, postgraduate student at the department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.
dimondoman@mail.ru

invertebrates of different ecological groups and the complete absence of plant foods. The consumption of coniferous trees seeds on the territory of Belarus in the early spring by Blackbirds and Song trushes is noted, that is reported in the literature for the first time. For Chaffinches, Robins and Blackbirds some general patterns in the consumption of animal feeds have been revealed: more than 50 % of all food objects in their diet are insects, of which more than half are coleopterans of different taxonomic and ecological groups.

Key words: nutrition; food content; passerine birds; early-spring period; food items; Belarus.

Acknowledgements. The author expresses his thanks to PhD (biology) L.S. Chumakov, PhD (biology) Zh. E. Melishko, PhD (biology) D. I. Tret'yakov, PhD (biology) O. L. Nesterova, PhD (biology) V. N. Tikhomirov for the advisory help in identification of feed objects. In collection of materials were also involved doctor of science (biology), head of the department of general ecology and methods of biology teaching V. V. Grichik (faculty of biology, Belarusian State University), researcher at the National Park «Belovezhskaja Pusthia» A. I. Kuz'mitskii, as well as students of the faculty of biology (Belarusian State University) S. Ch. Smyalkovskaya, A. V. Rak, S. A. Orlovskii and A. O. Saulov.

Введение

К настоящему времени различные аспекты питания большинства видов воробьинообразных птиц изучены относительно неплохо [1–6]. Тем не менее сведения об их трофических связях на территории Беларуси до сих пор остаются фрагментарными, что обуславливает актуальность проведения данного исследования.

В настоящей работе рассмотрены качественные и некоторые аспекты количественных характеристик питания лесных воробьинообразных птиц Беларуси в ранневесенний период (март – апрель). Исследованы наиболее многочисленные, фоновые, виды лесных воробьинообразных: зяблик (*Fringilla coelebs*), зарянка (*Erithacus rubecula*), черный и певчий дрозды (*T. merula*, *T. philomelos*). Для Беларуси указанные виды являются ближними и средними мигрантами, у которых на обозначенный период года приходятся сезон миграций и начало гнездования [7, Bd. 11, Buch 1, S. 59–96; Bd. 11, Buch 2, S. 866–1099; Bd. 14, Buch 2, S. 358–414; 8; 9]. Появление этих видов на территории страны в разные годы часто происходит в условиях, когда типичные для них группы кормовых объектов, в первую очередь беспозвоночные, еще могут отсутствовать или быть труднодоступными. Все исследуемые виды в этот период кормятся на земле или у земли, однако особенности их микробиотопического распределения и места сбора корма, в сравнении с таковыми в последующие периоды, могут несколько отличаться [10; 11]. Для отдельных видов (зяблик) ранней весной и во время гнездования также наблюдается четкая смена стратегий кормодобывания [10; 11]. Таким образом, в ранневесенний период для исследуемых видов птиц складываются довольно специфические условия, характеризующиеся возможным отсутствием отдельных групп кормовых объектов в среде и сопутствующими различиями в их пространственном распределении, отдельными аспектами их трофических взаимодействий. Изучение особенностей их питания в период подобных условий представляет особый интерес.

Цель настоящего исследования – характеристика питания указанных видов птиц на территории Беларуси в ранневесенний период.

Материалы и методы исследований

Основой работы стали результаты анализа содержимого пищеварительных трактов птиц. Проанализированы желудки 26 зябликов, 11 зарянок, 8 черных и 6 певчих дроздов. Абсолютное большинство особей, желудки которых подверглись анализу, составили птицы, погибшие в последней декаде марта – последней декаде апреля в орнитологических сетях при отлове в целях кольцевания; при столкновении с зеркальными стеклами государственных и частных сооружений, автотранспортом и линиями электропередач (ЛЭП); от лап хищников (в том числе домашних котов вблизи населенных пунктов) и в силу иных причин. Желудки птиц, обстоятельства гибели которых могли существенно исказить данные о питании (погибшие в неволе, с признаками болезни и т. п.), не исследовались. Материал был собран в 2010–2015 гг. в семи районах четырех областей Беларуси. В подавляющем большинстве случаев анализировались желудки птиц, погибших незадолго до их обнаружения. Время с момента нахождения погибших птиц до их последующей заморозки, как правило, не превышало 15–30 мин, что способствовало сохранению в их желудках даже мягких, легкоперевариваемых объектов. На наш взгляд, это позволяет в достаточно полной мере отразить качественные и количественные аспекты питания исследуемых видов птиц. Большинство местообитаний регионов, в которых был собран материал, характеризовались высокой мозаичностью и умеренным либо высоким уровнем антропогенного воздействия.

Подсчет числа животных кормовых объектов проводился на основе анализа числа голов, брюшек, переднеспинки, тельсонов, эдеагусов, пар крыльев и надкрыльев, а также других отделов тел беспозвоночных, по которым такой подсчет был возможен в принципе. В большинстве случаев идентификация животных объектов оказалась возможной до таксонов среднего ранга – семейств, отрядов, классов. Отдельные беспозвоночные фрагментированы не были, что позволяло идентифицировать их до уровней рода и вида. При невозможности более детального установления их таксономической принадлежности такие объекты объединялись в группы «Arthropoda, ближе не определенные», «Insecta, ближе не определенные», «Coleoptera, ближе не определенные» и т. д. Растительные объекты сохранялись в желудках несколько лучше, что в большинстве случаев также позволяло установить их видовую принадлежность.

Результаты исследований и их обсуждение

В совокупности в пищеварительных трактах исследуемых видов птиц было выявлено 919 кормовых объектов: 406 – у зябликов, 278 – у зарянок, 136 и 99 – у черного и певчего дроздов соответственно. Абсолютное большинство проанализированных желудков зябликов и значительная часть желудков зарянок содержали гастролиты.

В силу неравноценного объема анализируемых данных, а также известных различий в особенностях кормового поведения, пространственного и микростационального распределений, экологии питания и трофической специализации исследуемых видов птиц в целом в настоящей работе особенности питания каждого вида рассмотрены отдельно.

Зяблик. Известно, что зяблик является одним из наименее специализированных видов среди лесных воробьинообразных птиц, высокая пластичность и ширина спектра питания которого обеспечивают его эвритопность и доминирующее положение в большинстве пригодных природных станций [2; 10–13]. В настоящее время по исследованиям в разных частях ареала в питании зябликов зарегистрированы семена более 60 видов растений и представители свыше 15 отрядов беспозвоночных [2; 13]. Отмечается большая насекомоядность вида в сравнении с прочими вьюрковыми [3], увеличивающаяся по мере наступления гнездового периода [5; 6; 13].

С момента прилета и до начала сезона гнездования вид проявляет себя как истинный собиратель, добывающий корм на поверхности земли и наземных субстратов, при этом он использует минимальный набор кормовых маневров, позволяющих добывать общедоступные и небольшие по размеру объекты [10; 11]. При указанной стратегии кормодобывания зяблик собирает только ту пищу, которую видит, не передвигает и не переворачивает различные элементы лесной подстилки, лишь иногда может отбрасывать посторонние предметы путем резких боковых движений закрытым клювом [13].

Отмечается, что в ранневесенний период доля растительных кормов в рационе этого вида птиц может быть особенно велика, что согласно литературным данным наблюдается на Куршской косе в Калининградской области России [13]. В это время в питании зяблика на долю семян цветковых растений здесь приходится около 50 %, семена хвойных (в первую очередь – сосны) составляют 15 %, почки, сережки, цветы и побеги – 25 % [13].

В нашем материале растительная пища в питании зябликов также оказалась представлена семенами хвойных деревьев, травянистых растений и некоторыми прочими растительными объектами, включая соцветия, однако ее доля без преобладания каких-либо групп не превысила 22 %, а встречаемость составила только чуть более 50 % общего количества проанализированных желудков (табл. 1).

Таблица 1

Растительные объекты в питании зяблика в ранневесенний период

Table 1

Plant objects in Chaffinch diet in the early-spring period

Объекты питания	Количество растительных объектов (N, экз.) и их доля (%) в содержимом желудков (ж) зяблика			
	N	%	N _ж	% _ж
Семена				
<i>Pinus sylvestris</i>	5	1,24	1	3,85
<i>Picea abies</i>	21	5,17	1	3,85
<i>Persicaria maculata</i>	1	0,24	1	3,85
<i>Rumex acetosella</i>	9	2,21	1	3,85

Окончание табл. 1
Ending table 1

Объекты питания	Количество растительных объектов (N , экз.) и их доля (%) в содержимом желудков (ж) зяблика			
	N	%	$N_{\text{ж}}$	% _ж
<i>Rubus idaeus</i>	2	0,49	1	3,85
<i>Atriplex patula</i>	≥6	1,48	1	3,85
<i>Chenopodium album</i>	6	1,48	1	3,85
Fabaceae, включая <i>Vicia</i> sp.	≥6	1,48	2	7,7
Gramineae	2	0,49	1	3,85
Прочие сорные травы	≤12	2,96	5	19,23
Всего семян	70	17,24	11	42,3
Прочие растительные объекты, включая соцветия	≤17	4,19	4	15,38
Всего растительных объектов	87	21,43	14	53,84

Животная пища встречалась в каждом исследуемом желудке и была представлена исключительно членистоногими, при этом свыше 50 % составляли насекомые. Многоножки (в том числе *Lithobius forficatus*) и паукообразные встречались единично.

Полученные результаты дифференцированы нами по двум отрезкам времени: первой половине ранневесеннего периода (последняя декада марта – середина апреля), приходящейся на период миграций – период с низкой активностью беспозвоночных и возможными температурными колебаниями от слабых оттепелей до умеренных морозов; второй половине ранневесеннего периода (с середины по конец апреля), характеризующейся последовательным повышением показателей среднесуточной температуры и, соответственно, увеличением общей активности беспозвоночных (табл. 2).

Таблица 2

Состав питания зяблика в ранневесенний период

Table 2

Feed composition of Chaffinch in the early-spring period

Объекты питания	Первая половина ранневесеннего периода ($N_{\text{ж}} = 8$)				Вторая половина ранневесеннего периода ($N_{\text{ж}} = 18$)				Ранневесенний период			
	N	%	$N_{\text{ж}}$	% _ж	N	%	$N_{\text{ж}}$	% _ж	N	%	$N_{\text{ж}}$	% _ж
Растительная пища												
Семена	27	13,43	3	37,5	43	20,97	8	44,44	70	17,24	11	42,3
Прочие растительные объекты, включая соцветия	15	7,46	2	25	2	0,98	2	11,11	≤17	4,19	4	15,38
Всего растительной пищи	42	20,89	5	62,5	45	21,95	9	50	87	21,43	14	53,84
Животная пища												
Myriapoda	1	0,49	1	12,5	1	0,49	1	5,55	2	0,49	2	7,7
Arthropoda, ближе не определенные	2	0,99	2	25	5	2,44	1	5,55	7	1,73	3	11,54
Arthropoda (ova)	65	32,34	2	25	24	11,7	3	16,66	89	21,92	5	19,23
Arachnida	2	0,99	2	25	1	0,49	1	5,55	3	0,74	3	11,54
Insecta	89	44,28	8	100	129	62,93	18	100	218	53,69	26	100
Insecta, ближе не определенные, включая личинки	8	3,98	4	50	17	8,29	6	33,33	25	6,16	10	38,46
Homoptera: Ortheziidae	8	3,98	1	12,5	–	–	–	–	8	1,97	1	3,85

Окончание табл. 2
Ending table 2

Объекты питания	Первая половина ранневесеннего периода ($N_{\text{ж}} = 8$)				Вторая половина ранневесеннего периода ($N_{\text{ж}} = 18$)				Ранневесенний период			
	N	%	$N_{\text{ж}}$	% _ж	N	%	$N_{\text{ж}}$	% _ж	N	%	$N_{\text{ж}}$	% _ж
Hemiptera	1	0,49	1	12,5	1	0,49	1	5,55	2	0,49	2	7,7
Coleoptera, ближе не определенные	5	2,49	5	62,5	19	9,27	10	55,55	24	5,91	15	57,69
Curculionoidae, в том числе <i>Phyllobius</i> sp.	64	31,84	6	75	82	40	15	83,33	146	35,96	21	80,77
Chrysomelidae, в том числе Alticinae	—	—	—	—	3	1,46	3	16,66	3	0,74	3	11,54
Elateridae, в том числе <i>Negastrius pulchellus</i>	1	0,49	1	12,5	1	0,49	1	5,55	2	0,49	2	7,7
Dytiscidae	—	—	—	—	1	0,49	1	5,55	1	0,24	1	3,85
Hymenoptera, ближе не определенные	1	0,49	1	12,5	5	2,44	2	11,11	6	1,48	3	11,54
Lepidoptera larvae (?)	1	0,49	1	12,5	—	—	—	—	≥1	0,24	1	3,85
Всего животной пищи	159	79,1	8	100	160	78,05	18	100	319	78,57	26	100
Всего объектов питания	201	—	8	—	205	—	18	—	406	100	26	100

Таксономическое разнообразие насекомых, как видно из табл. 2, оказалось невысоким. В течение обеих половин ранневесеннего периода зябликами потреблялись практически одни и те же группы кормовых объектов. Среди насекомых преобладали жуки (80,73 % общего количества насекомых и 43,35 % общего количества всех кормовых объектов), представители других отрядов – клопы, равнокрылые, перепончатокрылые и чешуекрылые – также встречались единично. В анализируемый период года жуки доминировали в питании зябликов и в Ленинградской области России [2].

Преобладающей группой жесткокрылых в нашем материале оказались долгоносики (Curculionoidae) (82,95 % общего числа жуков). Их доля существенно не различается в течение обеих половин анализируемого периода. В совокупности Curculionoidae составили 35,96 % общего количества всех обнаруженных групп кормовых объектов, а их встречаемость превысила 80 %. Более того, содержимое 3 из 26 желудков было представлено исключительно долгоносиками (при среднем количестве жуков, равном 7 экз.), а содержимое еще 7 желудков на 50 % и более состояло из фрагментов именно этой группы жесткокрылых (при среднем количестве 10,57 экз.). Отметим, что из всего многообразия долгоносиков, обитающих на территории Беларуси, зябликами потреблялись исключительно небольшие формы размером от 2 до 5 мм. Значительная часть обнаруженных долгоносиков являются представителями подсемейства Arionidae.

Большое количество долгоносиков найдено в составе корма данного вида птиц как в ранневесенний, так и в последующие периоды и в других регионах [2; 14]. В Подмоскowie летом в питании взрослых зябликов долгоносики составляли 50 % общего числа жуков [14]. В Ленинградской области России их доля оставалась высокой (27 % общего числа кормовых объектов и 53,4 % общего количества жуков) в период с апреля по сентябрь [2]. Отмечается, что одна из вероятных причин потребления зябликами долгоносиков в таком количестве может быть связана с общей малой подвижностью последних даже относительно других групп жесткокрылых [2], что полностью укладывается в общую картину представлений о кормовом поведении и стратегии кормодобывания этого вида птиц. Долгоносики также являлись субдоминирующей группой кормовых объектов в питании птенцов зябликов в гнездовой период в Белорусском Полесье [15].

Другие группы жуков, как и большинство иных групп животных кормов в целом, сколько-нибудь существенного значения в питании исследуемого вида птиц не имеют.

Таким образом, в ранневесенний период на территории Беларуси для зябликов характерно потребление растительных и животных кормов с явным перевесом в сторону кормов животного происхождения. В состав животной пищи в этот период входят различные группы членистоногих, ведущее значение среди которых принадлежит жесткокрылым насекомым, а среди них – разным группам Curculionoidae. При этом есть основания полагать, что потребление долгоносиков, равно как и животной пищи в це-

лом, у зябликов начинается практически сразу с их прилетом на территорию Беларуси. Растительная пища регулярно встречалась в рационе зябликов в течение обеих половин анализируемого периода, однако ключевого значения в питании вида в обозначенный период года она не имеет.

Зарянка. В течение всего ранневесеннего периода этот вид проявляет стратегию проникающего собирателя, при которой возникает необходимость осматривать поверхность субстрата с присады, а также ловко лазать среди густой растительности [11]. В связи с этим во всех типах биотопов зарянка выбирает участки, характеризующиеся определенной структурой предпочитаемых микростаций: участки с хорошо развитым подлеском и подростом, валежником и прочими субстратами, с которых удобно высматривать добычу [10; 11].

Кормится зарянка преимущественно в нижнем ярусе леса, на высоте до одного метра от земли, среди ветвей подлеска и подростка, используя нижние горизонтальные ветви кроны деревьев для осматривания поверхности земли, среди валежника, сухих или скелетных ветвей у ствола, лишенных листьев, на земле [10; 11]. Отмечаются незначительные сезонные вариации кормового поведения зарянки, при которых весной зарянка чаще охотится на земле, а летом – среди ветвей подлеска и подростка в нижнем ярусе леса [10].

Согласно литературным данным в ранневесенний период на всей европейской части своего ареала зарянка остается исключительно животной. Доминирующей группой ее кормовых объектов являются членистоногие, а среди них – насекомые [16–18]. Спектр потребляемых насекомых довольно широк, однако состав преобладающих групп регионально варьирует слабо: общими объектами питания зарянки в разных регионах становились жуки (жужелицы, хрущи, долгоносики и листоеды), муравьи, клопы, личинки двукрылых и чешуекрылых. В ряде регионов суммарная доля и встречаемость жуков превышали 50 %, хотя относительное число представителей отдельных семейств различалось [16–18]. Подавляющее количество ее кормовых объектов в ранневесенний период в разных регионах Европы составляли преимущественно обитатели напочвенного покрова [8; 16–18].

Согласно данным нашего исследования на территории Беларуси ранневесенний рацион этого вида птиц представлен также исключительно животными кормами. Состав животной пищи образуют моллюски, многоножки, насекомые и прочие членистоногие. При этом ключевое значение в питании вида также принадлежит насекомым (табл. 3).

Таблица 3

Состав питания зарянки в ранневесенний период

Table 3

Feed composition of Robin in the early-spring period

Объекты питания	Количество корма			
	<i>N</i>	%	<i>N_ж</i>	% _ж
Mollusca (Gastropoda)	≥5	1,8	2	18,18
Myriapoda (Diplopoda)	≥4	1,44	3	27,27
Arthropoda, ближе не определенные	≥9	3,24	3	27,27
Insecta, ближе не определенные, включая личинки	≥11	3,96	8	72,72
Dermoptera	1	0,36	1	9,09
Homoptera (nymphs)	17	6,11	4	36,36
Hemiptera	2	0,72	2	18,18
Coleoptera	22	7,9	9	81,81
Carabidae	9	3,24	6	54,54
Staphylinidae	7	2,52	3	27,27
Histeridae: <i>Atholus bimaculatus</i>	≤2	0,72	1	9,09
Hydrophilidae	≥23	8,27	3	27,27
Chrysomelidae	8	2,88	5	45,45
Monotomidae	2	0,72	1	9,09

Окончание табл. 3
Ending table 3

Объекты питания	Количество корма			
	<i>N</i>	%	<i>N</i> _ж	% _ж
Curculionidae	30	10,79	9	81,81
Scarabaeidae: <i>Aphodius</i> sp.	50	17,98	6	54,54
Diptera (муха)	1	0,36	1	9,09
Hymenoptera	8	2,88	4	36,36
Formicidae	≥67	24,1	7	63,63
Всего насекомых	260	93,52	11	100
Всего кормовых объектов	278	100	11	100

Подавляющее большинство насекомых, обнаруженных в желудках птиц, являются представителями 5 отрядов. Аналогично результатам изучения питания зарянок в других регионах при нашем исследовании более половины общего количества насекомых также составили жесткокрылые (55 %). В несколько меньших количествах зарянками добывались перепончатокрылые (главным образом – муравьи) и равнокрылые, а клопы и мухи встречались единично.

Многие из обнаруженных жуков были идентифицированы до вида или рода. К таковым относятся стафилины (*Oxytelus* sp.), карапузики (*Atholus bimaculatus*), водолюбы (*Cercyon analis*, *Cercyon* sp. и *Helophorus* sp.), листоеды (*Chaetocnema* sp., *Oulema* sp., *Phatora* sp.), пластинчатоусые рода *Aphodius*.

В количественном отношении среди жуков несколько превалировали представители семейств Scarabaeidae, Curculionidae и Hydrophilidae (17,98; 10,79 и 8,27 % соответственно). Жуки указанных групп, а также муравьи и нимфы равнокрылых регулярно поедались зарянками в окрестностях одного из обследуемых биотопов, где располагался довольно крупный участок, занятый складировавшимися отходами животноводства.

Анализ таксономического состава обнаруженных кормовых объектов также позволяет заключить, что в рацион исследуемого вида птиц входят представители разных экологических групп: обитатели напочвенного покрова (муравьи, жуки, кивсяки, брюхоногие моллюски и др.), представители фитофильной макрофауны (водолюбы, морщинники), различные копробионты (афодии, грязевики, карапузики и стафилины).

Таким образом, как показывает наше исследование, ранневесеннее питание зарянки на территории Беларуси слабо отличается от такового в других регионах Европы. Обнаруживается тесная связь кормового поведения зарянки и структуры предпочитаемых ею микростадий с составом ее животных кормов. Преобладающей таксономической группой ее кормовых объектов в данный период являются жесткокрылые. Однако использование более широкого, чем у зяблика, набора кормовых маневров при охоте в нижнем ярусе леса и добыче пищи с поверхности земли позволяет зарянке потреблять более разнообразный корм, представленный беспозвоночными разных экологических групп и различными таксономическими группами жуков.

Черный и певчий дрозды. Ранневесеннее питание черного и певчего дроздов изучено значительно слабее относительно других периодов года. В настоящее время в литературе имеется очень мало публикаций, посвященных ранневесеннему питанию этих видов птиц [7, Bd. 11, Buch 2, P. 866–1099].

Известно, что с момента весеннего прилета и до осеннего отлета главной стратегией кормодобывания обоих видов дроздов является собирательство – извлекачество, когда добыча пищи осуществляется путем выклеивания корма, расклеивания, долбления, раскапывания лесной подстилки [11]. Оба вида при этом сравнительно редко извлекают добычу из почвы, предпочитая кормиться открыто живущими беспозвоночными [19].

Данные нашего исследования в отношении рассматриваемых видов интересны прежде всего тем, что в составе рациона черного и певчего дроздов в числе неслучайных объектов обнаружены семена хвойных деревьев: сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) и ели европейской (*Picea abies*) (табл. 4).

Семена сосны встречались в желудках черных дроздов, погибших 23 апреля 2014 г. в окрестностях дачного поселка Асино Дзержинского района Минской области и 17 апреля 2015 г. в д. Налибоки Столбцовского района Минской области, а также 28 апреля 2015 г. вблизи д. Гадиловичи Рогачевского района Гомельской области. Семена ели обнаружены также в желудке певчего дрозда, погибшего 16 апреля 2015 г. в д. Налибоки Столбцовского района Минской области.

Таблица 4

Состав рациона черного и певчего дроздов в ранневесенний период

Table 4

Feed composition of Blackbird and Song trush in the early-spring period

Объекты питания	Черный дрозд				Певчий дрозд			
	<i>N</i>	%	<i>N</i> _ж	% _ж	<i>N</i>	%	<i>N</i> _ж	% _ж
Растительная пища								
Семена <i>Pinus sylvestris</i>	≥ 13	9,56	3	37,5	—	—	—	—
Семена <i>Picea abies</i>	—	—	—	—	≥ 57	57,57	1	16,77
Прочие растительные объекты (хвоя)	≤ 5	3,67	2	25	1	1,01	1	16,77
Всего растительных объектов	≥ 18	13,23	3	37,5	≥ 58	58,58	1	16,77
Животная пища								
Mollusca (Gastropoda)	≥ 2	1,47	1	12,5	≥ 15	15,15	1	16,67
Myriapoda: Chilopoda	2	1,47	1	12,5	—	—	—	—
Diplopoda	≥ 14	10,3	4	50	—	—	—	—
Arthropoda, ближе не определенные	16	11,76	1	25	1	1,01	1	16,67
Arachnida	4	2,94	1	25	—	—	—	—
Insecta, всего	80	58,82	8	100	25	25,25	6	100
Insecta, ближе не определенные, включая личинки	≥ 4	2,94	3	50	≥ 3	2,6	3	50
Orthoptera	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Dermatoptera, включая <i>Forficula auricularia</i>	4	2,94	2	25	—	—	—	—
Coleoptera, ближе не определенные	12	8,82	6	75	3	3,03	2	33,33
Carabidae, включая <i>Agonum</i> sp., <i>Pterosticus</i> sp.	18	13,23	2	25	1	1,01	1	16,67
Staphylinidae	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Histeridae, включая <i>Atholus bimaculatus</i>	3	2,2	1	12,5	—	—	—	—
Silphidae: <i>Silpha obscura</i>	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Elateridae imago + larvae	4	2,94	1	12,5	—	—	—	—
Tenebrionidae	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Cerambycidae (?)	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Chrysomelidae	—	—	—	—	3	3,03	2	33,33
Curculionidae, включая <i>Strophosoma capitatum</i> , <i>Otiorhynchus</i> sp.	≥ 23	16,9	5	75	≥ 12	12,12	2	33,33
Scarabeidae, включая <i>Aphodius</i> sp.	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Diptera	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Hymenoptera, ближе не определенные	2	1,47	2	25	1	1,01	1	16,67
Formicidae	≥ 2	1,47	2	25	—	—	—	—
Lepidoptera larvae	1	0,735	1	12,5	—	—	—	—
Всего животных объектов	118	86,76	8	100	41	41,41	6	100
Всего объектов питания	136	100	8	100	99	100	6	100

Известно, что растительная пища является неотъемлемой частью рациона обоих видов дроздов в летний и последующие периоды [7, Bd. 11, Buch 2, S. 866–1099; 8; 14; 20; 21], достигает своего максимума в их питании в октябре – ноябре и составляет его основу на местах зимовок [7, Bd. 11, Buch 2, S. 920–924; 20]. Состав растительных кормов обоих видов достаточно разнообразен, а черный дрозд считается одним из наиболее универсальных фруктоедов среди палеарктических лесных воробьинообразных птиц [7, Bd. 11, Buch 2, S. 920–924]. На всей территории ареалов этих видов растительные корма представлены главным образом плодами аборигенных и интродуцированных видов кустарниковых, кустарниковых и древесных растений [7, Bd. 11, Buch 2, S. 920–924, 1094–1099; 8; 14; 20; 21]. Семена хвойных и травянистых растений в их желудках находили крайне редко [14; 21]. Например, семена ели были обнаружены у птенцов певчего дрозда в Ленинградской области России [21], а семена диких трав – у взрослых птиц в летний период в Подмоскowie [14]. Таким образом, сведения о поедании дроздами ранней весной на территории Беларуси семян хвойных приводятся впервые в настоящей работе.

Среди животных кормов черного дрозда, так же как зяблика и зарянки, существенную часть кормовых объектов составляют насекомые (58,82 %), 80 % которых приходится на жесткокрылых. В количественном отношении среди последних выделяются долгоносики и жуки (16,9 и 13,23 % общего количества кормовых объектов соответственно). Отметим, что черный дрозд добывал жесткокрылых и в личиночной стадии развития. Выделить какую-либо доминирующую группу животных объектов в составе питания дрозда певчего при имеющемся объеме используемых материалов довольно проблематично.

Обнаружение же семян в полученном нами материале позволяет предположить, что в условиях труднодоступности или отсутствия беспозвоночных в достаточных количествах растительная пища может служить дополнением к ранневесеннему рациону обоих видов дроздов. Однако ранняя весна может являться периодом их плавного перехода от одного типа пищи к другому, что и наблюдается в марте на местах зимовок дроздов в Крыму [20]. Отмечается, что в Ленинградской области России семена ели и другие растительные корма приносились певчими дроздами своим птенцам в затянувшуюся дождливую и мокрую погоду [21].

Обращает на себя внимание отсутствие в желудках исследуемых видов птиц представителей почвенной мезофауны, а именно кольчатых червей, являющихся, по литературным данным, неотъемлемой составной частью их рациона (в частности, рациона дроздов). На наш взгляд, это может быть связано не столько с их быстрым перевариванием и возникающими отсюда погрешностями при применении метода анализа содержимого пищеварительных трактов птиц, сколько с действием следующих факторов:

- четкая положительная избирательность в отношении кольчатых червей у обоих видов дроздов наблюдается в гнездовой период при выкармливании птенцов. В разных частях ареалов доля этих червей в питании птенцов певчего дрозда варьирует от 9,3 до 35,1 % [7, Bd. 11, Buch 2, S. 1094–1099; 22], а биомасса может достигать 50 % общей массы кормовых объектов [7, Bd. 11, Buch 2, S. 1094–1099; 22; 23]; у дрозда черного их доля варьирует от 5,2 до 12,8 % [7, Bd. 11, Buch 2, S. 920–924; 24] (как исключение – апельсиновые плантации в Сагунто (Испания), где она равна 69,6 %) [25], по биомассе максимально составляет 33,7 % [7, Bd. 11, Buch 2, S. 920–924; 25]. Однако в рационе взрослых птиц кольчатые черви встречаются гораздо реже [7, Bd. 11, Buch 2, S. 920–924, 1094–1099; 14];

- черный и певчий дрозды из почвы извлекают пищу гораздо реже, чем другие виды дроздов (рябинник, *T. pilaris*, и белобровик, *T. iliacus*), что вытекает из анализа их кормового поведения [19], о чем говорилось выше (исключение – гнездовой период). Этим, вероятно, объясняется незначительная доля кольчатых червей в питании взрослых птиц;

- в ранневесенний период кольчатые черви, как и многие другие группы беспозвоночных, могут быть труднодоступными для обоих видов дроздов, в результате чего птицы вынуждены переходить на растительную пищу, что, по всей видимости, и имело место у птиц, желудки которых нами проанализированы;

- в исследуемых желудках дроздов были обнаружены другие группы «мягких» кормов: гусеницы, личинки жуков, пауки. Однако следов или фрагментов кольчатых червей в них не обнаружено, что практически полностью исключает версию о их переваривании к моменту вскрытия желудков.

Причины отсутствия кольчатых червей в рационе зарянки лежат в основе ее кормового поведения, микростабиального распределения и стратегии кормодобывания, обусловленных, в свою очередь, ее размерами, строением ротового аппарата и набором кормовых маневров. Очевидно, меньшие в сравнении с дроздами размеры, более короткий клюв и присущий ей набор кормовых маневров не позволяют переворачивать лесную подстилку и извлекать из почвы вышеуказанную группу беспозвоночных. По всей видимости, эти характеристики эволюционно способствовали формированию у нее иной стра-

тегии кормодобывания, при которой добыча высматривается с присад, а ее поимка осуществляется не только на поверхности земли, но и в нижних частях кроны деревьев, у основания ствола и т. д. Это справедливо и в отношении зяблика, трофическая специализация которого существенно отличается от таковой у *Turdidae*. Согласно литературным сведениям кольчатые черви не встречались в рационе птенцов зарянок и зябликов и ни в один из периодов в питании взрослых особей данных видов птиц [2; 5–7, Bd. 11, Buch 1, S. 94–96; Bd. 14, Buch 2, S. 410–414; 8; 10; 14–18; 21].

Заключение

Данные настоящего исследования во многих аспектах существенно дополняют имеющиеся сведения о питании исследуемых видов птиц на территории Беларуси ранней весной и позволяют раскрыть некоторые особенности их рациона в обозначенный период года.

Несмотря на известную высокую генерализацию питания зяблика, анализ содержимого желудков 26 птиц показал относительно невысокое таксономическое разнообразие растительных и животных кормов в полученном нами материале. Доминирующей группой кормовых объектов оказались долгоносики. Прочие группы жуков, а также перепончатокрылые, чешуекрылые, многоножки и паукообразные встречались единично. Растительный корм на территории Беларуси в ранневесенний период, по нашим данным, ключевого значения в рационе зяблика не имеет.

Полученные данные по ранневесеннему питанию зарянки оказались во многом схожими с таковыми из других регионов Европы. Ее рацион состоял исключительно из животных кормов. В желудках данного вида оказались фрагменты представителей разных экологических групп: обитателей напочвенного покрова, представителей фитофильной макрофауны, различных копробионтов. Однако ключевой таксономической группой кормовых объектов оказались жесткокрылые.

В питании черного и певчего дроздов в числе неслучайных объектов отмечаются семена хвойных видов деревьев. Поедание этих семян дроздами в разные годы в различных регионах Беларуси позволяет рассматривать их в качестве дополнительного корма в условиях недостатка животных кормов, с одной стороны, может являться свидетельством постепенного перехода дроздов в этот период от одного типа пищи к иному – с другой. Сведения о поедании дроздами ранней весной на территории Беларуси семян хвойных деревьев в литературе приводятся впервые.

Данные нашего исследования также позволяют выявить и некоторые общие закономерности в питании исследуемых видов птиц. В составе их животных кормов отмечается высокая доля насекомых, превышающая 50 % общего количества кормовых объектов. Из них более половины составляют жесткокрылые разных таксономических и экологических групп. Вероятно, эти закономерности характерны и для дрозда певчего, однако объем анализируемых данных пока не позволяет установить это.

Библиографические ссылки

1. Иноземцев А. А. Элективность питания птиц и некоторые причины ее изменчивости // Орнитология. 1963. № 6. С. 424–450.
2. Прокофьева И. В. Материалы по питанию зяблика в Ленинградской области // Учен. зап. Ленингр. гос. пед. ин-та им. Герцена. 1963. Вып. 9. С. 71–86.
3. Прокофьева И. В. Роль животных кормов в питании семяноядных вьюрковых // Рус. орнитол. журн. 1997. № 13. С. 3–9.
4. Прокофьева И. В. Долгоносики Curculionidae в пище птиц // Рус. орнитол. журн. 2008. № 17 (431). С. 1119–1124.
5. Френкина Г. И. О питании взрослых птиц и их птенцов в гнездовой период // Влияние антропогенных факторов на структуру и функционирование экосистем : сб. науч. тр. / Калинин. гос. ун-т ; науч. ред. В. И. Зиновьева. Калинин, 1983. С. 166–178.
6. Иноземцев А. А., Френкина Г. И. Питание лесных птиц в условиях ландшафтно-преобразовательного антропогенного воздействия в Калининской области // Влияние антропогенных факторов на структуру и функционирование экосистем : сб. науч. тр. / Калинин. гос. ун-т ; науч. ред. А. А. Иноземцева. Калинин, 1985. С. 159–191.
7. Glutz U. N., Bauer K. M. Handbuch der Vögel Mitteleuropas : in 22 Bd. Wiesbaden : AULA-Verlag, 1988.
8. Федюшин А. В., Долбик М. С. Птицы Белоруссии. Минск : Наука и техника, 1967. С. 476–478.
9. Никифоров М. Е., Яминский Б. В., Шкляр Л. П. Птицы Белоруссии : справочник-определитель гнезд и яиц. Минск : Вышэйшая школа, 1989. С. 369–412.
10. Шемякина О. А. Трофические и пространственные связи птиц в естественных и антропогенных местообитаниях // Поведение, экология и эволюция животных : монографии, статьи, сообщения / Рязан. гос. ун-т им. С. А. Есенина ; под общ. ред. В. М. Константинова. Рязань, 2009. С. 151–294.
11. Марочкина Е. А. Трофические и пространственные отношения воробьиных птиц лесных биотопов Мещерской низменности // Поведение, экология и эволюция животных : монографии, статьи, сообщения / Рязан. гос. ун-т им. С. А. Есенина ; под общ. ред. В. М. Константинова. Рязань, 2011. С. 377–533.

12. Коренберг Э. И., Руденская А. В., Чернов Ю. И. Пищевые связи лесных птиц с насекомыми в условиях южной тайги // Орнитология. 1972. № 10. С. 151–160.
13. Дольник В. Р., Паевский В. А., Гаврилов В. М. и др. Пищевое поведение, питание и усвоение пищи зябликом // Популяционная экология зяблика / под ред. В. Р. Дольника. Л., 1982. С. 18–40.
14. Птушенко Е. С., Иноземцев А. А. Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М. : Издательство Московского университета, 1968.
15. Тарлецкая Р. Ю. Да вывучэння харчавання фонавых відаў вераб'іных птушак у лясах Беларускага Палесся // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1980. № 3. С. 109–111.
16. Ганя М. Н., Литвак М. Д., Кукурузяну Л. С. Животный корм в питании некоторых видов насекомоядных птиц Молдавии // Вопросы экологии и практического значения птиц и млекопитающих Молдавии : сб. науч. ст. / под ред. Я. И. Принца. Кишинев, 1969. С. 26–54.
17. Groppali R. Sull' Alimentazione di dieci specie di Passeriformes in Italia // Naturo Bresciana. 1992. Vol. 28. P. 407–415.
18. Чернецов Н. С., Тутов Н. В. Питание и стратегии весенней миграции зарянки *Erithacus rubecula* (Aves, Turdidae) в юго-восточной Прибалтике // Зоол. журн. 2010. Т. 82, вып. 12. С. 1525–1529.
19. Барановский А. В., Хлебосолов Е. И., Марочкина Е. А. и др. Механизмы экологической сегрегации четырех совместно обитающих видов дроздов – рябинника *Turdus pilaris*, белобровика *T. iliacus*, певчего *T. philomelos* и черного *T. merula* // Рус. орнитол. журн. 2007. № 377. С. 1219–1230.
20. Бескаравайный М. М. Роль древесно-кустарниковых экзотов в зимнем питании черного дрозда на южном берегу Крыма // Бюл. Гос. Никит. бот. сада. 1980. Т. 43, вып. 3. С. 15–18.
21. Мальчевский А. С., Пукинский Ю. Б. Птицы Ленинградской области и сопредельных территорий. Л. : Издательство Ленинградского университета, 1983.
22. Березанцева М. С. Питание птенцов певчего дрозда *Turdus philomelos* в лесостепной дубраве «Лес на Ворскле» // Рус. орнитол. журн. 1997. № 12. С. 8–15.
23. Барановский А. В., Иванов Е. С. Сравнительная характеристика птенцовой трофики дроздов симпатричного обитания в антропогенном ландшафте // Вестн. КрасГАУ. 2013. № 6. С. 88–93.
24. Березанцева М. С. Питание гнездовых птенцов черного дрозда *Turdus merula* и сравнение его с питанием дрозда певчего *T. philomelos* в лесостепной дубраве «Лес на Ворскле» // Рус. орнитол. журн. 1997. № 20. С. 12–20.
25. Iglesias D. J., Gil-Delgado J. A., Barba E. Diet of Blackbird nestlings in orange groves: seasonal and Age-related variation // Ardeola. 1993. Vol. 40, № 2. P. 113–119.

References

1. Inozemtsev A. A. Elektivnost pitaniya ptits i nekotorye prichiny ee izmenchivosti. *Ornitologiya*. 1963. No. 6. P. 424–450 (in Russ.).
2. Prokof'eva I. V. Materialy po pitaniyu zyblika v Leningradskoy oblasti. *Uchen. zap. Leningr. gos. ped. inst. im. Gertsena*. 1963. Issue 9. P. 71–86 (in Russ.).
3. Prokof'eva I. V. Rol zhivotnykh kormov v pitanii semenoyadnykh vyurkovykh. *Russ. ornitol. zh.* 1997. No. 13. P. 3–9 (in Russ.).
4. Prokof'eva I. V. Dolgonosiki Curculionidae v pishche ptits. *Russ. ornitol. zh.* 2008. No. 17 (431). P. 1119–1124 (in Russ.).
5. Frenkina G. I. O pitanii vzroslykh ptits i ikh pntsov v gnezdovoy period. *Vliyanie antropogennykh faktorov na strukturu i funktsionirovanie ekosistem* : sb. nauchn. tr. Kalinin, 1983. P. 166–178 (in Russ.).
6. Inozemtsev A. A., Frenkina G. I. Pitaniye lesnykh ptits v usloviyakh landshaftno-preobrazovatel'nogo antropogennogo vozdeystviya v kalininskoy oblasti. *Vliyanie antropogennykh faktorov na strukturu i funktsionirovanie ekosistem* : sb. nauchn. tr. Kalinin, 1985. P. 159–191 (in Russ.).
7. Glutz U. N., Bauer K. M. Handbuch der Vögel Mitteleuropas : in 22 Bd. Wiesbaden : AULA-Verlag, 1988.
8. Fedyushin A. V., Dolbik M. S. Ptitsy Belorussii. Minsk : Nauka i tekhnika, 1967. P. 476–478 (in Russ.).
9. Nikiforov M. Ye., Yaminskiy B. V., Shklyarov L. P. Ptitsy Belorussii: spravochnik-opredelitel' gnezd i yaits. Minsk : Vyshhejschaja shkola, 1989. P. 369–412 (in Russ.).
10. Shemyakina O. A. Troficheskie i prostranstvennye svyazi ptits v estestvennykh i antropogennykh mestoobitaniyakh. *Povedenie, ekologiya i evolyutsiya zhivotnykh* : monografii, stat'i, soobshcheniya. Ryazan, 2009. P. 151–294 (in Russ.).
11. Marochkina Ye. A. Troficheskie i prostranstvennye otnosheniya vorob'inykh ptits lesnykh biotopov Meshcherskoy nizmennosti. *Povedenie, ekologiya i evolyutsiya zhivotnykh* : monografii, stat'i, soobshcheniya. Ryazan, 2011. P. 377–533 (in Russ.).
12. Korenberg E. I., Rudenskaya A. V., Chernov Yu. I. Pishchevye svyazi lesnykh ptits s nasekomymi v usloviyakh yuzhnoy taygi. *Ornitologiya*. 1972. No. 10. P. 151–160 (in Russ.).
13. Dolnik V. R., Paevskii V. A., Gavrilov V. M., et al. Pishchevoe povedenie, pitaniye i usvoenie pishchi zyblikom. *Populyatsionnaya ekologiya zyblika*. Leningrad, 1982. P. 18–40 (in Russ.).
14. Ptushenko E. S., Inozemtsev A. A. Biologiya i hozjajstvennoye znachenie ptic Moskovskoy oblasti i sopredel'nykh territorij. Moscow : Publishing house of Moscow University, 1968 (in Russ.).
15. Tarleckaja R. Ju. Da vyvuchennja harchavannja fonavyh vidaw verab'inyh ptushak u ljasah Belaruskaga Palessja. *Vesci AN BSSR. Seryja bijalagichnyh navuk*. 1980. No. 3. P. 109–111 (in Belarus.).
16. Ganya M. N., Litvak M. D., Kukuruzyanu L. S. Zhivotnyy korm v pitanii nekotorykh vidov nasekomoyadnykh ptits Moldavii. *Voprosy ekologii i prakticheskogo znacheniya ptits i mlekopitayushchikh Moldavii* : sb. nauchn. st. Kishinev, 1969. P. 26–54 (in Russ.).
17. Groppali R. Sull' Alimentazione di dieci specie di Passeriformes in Italia. *Naturo Bresciana*. 1992. Vol. 28. P. 407–415 (in Italian).

18. Chernetsov N. S., Titov N. V. Foraging and spring migratory strategy of the Robin *Erithacus rubecula* (Aves, Turdidae) in the southeastern Baltic sea region. *Zool. zh.* 2010. Vol. 82, issue 12. P. 1525–1529 (in Russ.).
19. Baranovskij A. V., Hlebosolov E. I., Marochkina E. A., et al. Mechanizmy jekologicheskoy segregacii chetyreh sovместno obitajushhih vidov drozdov – rjabinnika *Turdus pilaris*, belobrovika *T. iliacus*, певчего *T. philomelos* i чernого *T. merula*. *Russ. ornitol. zh.* 2007. No. 377. P. 1219–1230 (in Russ.).
20. Beskaravaynyy M. M. Rol' drevesno-kustarnikovyykh ekzotov v zimnem pitanii chernogo drozda na yuzhnom beregu Kryma. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada.* 1980. Vol. 43, issue 3. P. 15–18 (in Russ.).
21. Malchevskii A. S., Pukinskii Ju. B. Pticy Leningradskoy oblasti i sopredel'nyh territorij. Leningrad : Leningrad University Published, 1983 (in Russ.).
22. Berezantseva M. S. Pitanie ptencov певчего drozda *Turdus philomelos* v lesostepnoj dubrave «Les na Vorskle». *Russ. ornitol. zh.* 1997. No. 12. P. 8–15 (in Russ.).
23. Baranovskij A. V., Ivanov E. S. The thrush nestlings trophism comparative characteristic in the conditions of simpatric habitation in the anthropogenous landscape. *Vestnik KrasGAU.* 2013. No. 6. P. 88–93 (in Russ.).
24. Berezantseva M. S. Pitanie gnezdovyykh ptentsov чernого drozda *Turdus merula* i sravnenie ego s pitaniem drozda певчего *T. philomelos* v lesostepnoj dubrave «Les na Vorskle». *Russ. ornitol. zh.* 1997. No. 20. P. 12–20 (in Russ.).
25. Iglesias D. J., Gil-Delgado J. A., Barba E. Diet of Blackbird nestlings in orange groves: seasonal and Age-related variation. *Ardeola.* 1993. Vol. 40, No. 2. P. 113–119.

Статья поступила в редколлегию 07.07.2017.

Received by editorial board 07.07.2017.

УДК 583.669.25(477)

DIANTHUS CARTHUSIANORUM L. И DIANTHUS POLONICUS ZAPAL. ВО ФЛОРЕ БЕЛАРУСИ

Т. А. САУТКИНА¹⁾, А. И. ПАЦЕВИЧ¹⁾

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

Проведена критико-систематическая обработка всего гербарного материала, собранного на территории Республики Беларусь и идентифицированного ранее как *Dianthus carthusianorum* L. Установлено, что подавляющее большинство изученных образцов представлены не *D. carthusianorum* L., а *Dianthus polonicus* Zapal., видом, который ранее в основополагающих работах белорусских флористов не отмечался. Таким образом, документально подтверждено произрастание *D. polonicus* на территории Беларуси. Показаны различия в строении и окраске прицветных чешуй обоих видов. Получены статистически обработанные морфометрические данные о длине влагалищ и ширине листьев, величине прицветных чешуй и их остей. Указанные признаки позволяют достаточно четко различать эти виды. На основании гербарных этикеток впервые составлены точечные карты местонахождений видов *D. polonicus* и *D. carthusianorum*. Установлено, что *D. polonicus* распространен в Беларуси шире, чем *D. carthusianorum*, а это полностью меняет ранее существовавшие представления. Высказано предположение о том, что хорологические особенности *D. polonicus* и *D. carthusianorum*, возможно, обусловлены приуроченностью их к карбонатным почвам. Оба вида являются для Беларуси редкими и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: *Dianthus carthusianorum* L.; *Dianthus polonicus* Zapal.; вегетативные органы; местонахождения; точечные карты.

DIANTHUS CARTHUSIANORUM L. AND DIANTHUS POLONICUS ZAPAL. IN THE FLORA OF BELARUS

T. A. SAUTKINA^a, A. I. PATCEVICH^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus
Corresponding author: T. A. Sautkina (tamara.sautkina.bsu@gmail.com)

The whole herbarium material collected on the territory of the Republic and identified as *Dianthus carthusianorum* L. underwent critical and systematical processing. It has been established that the overwhelming majority of the studied samples was presented not as *D. carthusianorum* L., but as *Dianthus polonicus* Zapal., which was not mentioned in the works of Belarusian florists before. Thus the upgrowth of *D. polonicus* inside Belarus was documented. The differences in formation and coloration of lemmas of both species are shown. The statistical and morphometric data concerning the length of axilla and the width of leaves as well as the size of lemmas and their awns were received. The specified features allow distinguishing between these species. Based on the herbarium labels the dot maps of the locations of *D. polonicus*

Образец цитирования:

Сауткина Т. А., Пацевич А. И. *Dianthus carthusianorum* L. и *Dianthus polonicus* Zapal. во флоре Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 113–120.

For citation:

Sautkina T. A., Patceвич A. I. *Dianthus carthusianorum* L. and *Dianthus polonicus* Zapal. in the flora of Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 113–120 (in Russ.).

Авторы:

Тамара Александровна Сауткина – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Ангелина Игоревна Пацевич – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Т. А. Сауткина.

Authors:

Tamara A. Sautkina, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.

tamara.sautkina.bsu@gmail.com

Angelina I. Patceвич, student at the faculty of biology.

angelina.pacevich@gmail.com

and *D. carthusianorum* were made for the first time ever. It was found that *D. polonicus* is more widespread in Belarus than *D. carthusianorum*, which completely contradicts the pre-existing representations. It is suggested that the chorologic characteristics of *D. polonicus* and *D. carthusianorum* are probably determined by their belonging to carbonate soils. Both species are rare within Belarus and warrant further study.

Key words: *Dianthus carthusianorum* L.; *Dianthus polonicus* Zapal.; vegetative organs; location; dot maps.

Введение

Гвоздика картузианская – *Dianthus carthusianorum* L. – была описана К. Линнеем в работе «Species plantarum» в 1753 г. по материалам из Центральной Европы и Средиземноморья (тип: «in Germaniae, Italiae, Siciliae sterilibus apricis») [1, p. 85–102]. В 1994 г. вид был лектотипифицирован. Лектотип: Thuringia, Bauhin in Herb. Busser XI: 92 – UPS (Jonsell, Jarvis, 1994, Nordic Journ. Bot. 14, 2: 157) [1; 2, с. 290]. На территории Западной Европы гвоздика картузианская является довольно редким видом, в Польше она подлежит частичной охране [3, с. 416].

Встречается этот центральноевропейский вид и на территории Восточной Европы. В [4] указано, что северо-западная часть ареала произрастания *D. carthusianorum* находится на территории Украины. Вид характерен для Закарпатья и юго-западных склонов Украинских Карпат, где он обычно регистрируется на скалистых участках и задерненных известняковых обнажениях [2, с. 290].

Основополагающие флористические работы белорусских ботаников [5–7] представляют *D. carthusianorum* как редкий вид, приуроченный к юго-западной и западной частям Беларуси. Более того, в [7] он был описан как вид третьей категории охраны. К описанию приложена точечная карта, составленная по материалам Гербария Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси и отражающая на тот момент местонахождения особей вида (рис. 1).

В [3, с. 416; 8, с. 440] гвоздика картузианская внесена в список видов профилактической охраны как «редкий “пограничный” опушечно-лесной вид, требующий внимания».

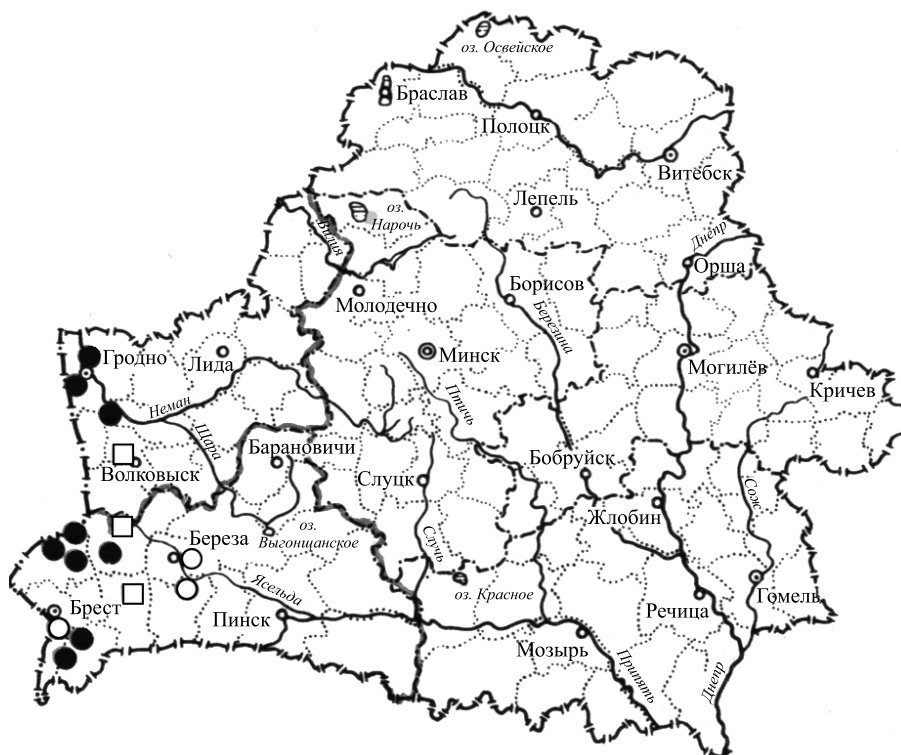


Рис. 1. Местонахождения *Dianthus carthusianorum* (по [7]):

□ – местонахождения по данным литературы; ● – современные находки (до 1993 г.); ○ – старые находки

Fig. 1. Location *Dianthus carthusianorum* (in the [7]):

□ – location according to the literature; ● – modern finds (until 1993); ○ – old finds

Однако по [9] *D. carthusianorum* – чрезвычайно полиморфный вид, включающий семь разновидностей (varietas): 1) var. *humilis* Grisselich; 2) var. *polonicus* (Zapal.) Kulcz.; 3) var. *commutatus* Zapal.; 4) var. *saxigenus* Schur.; 5) var. *carpaticus* (Woloszcz.) Zapal.; 6) var. *pratensis* Nielr.; 7) var. *validus* Zapal.

О полиморфизме гвоздики картузианской говорят и данные, приведенные в [10], а также сведения о том, что «при широкой трактовке под названием *D. carthusianorum* объединяются различные родственные таксоны, имеющие весьма определенные морфологические отличия. Для многих из них давно существуют самостоятельные видовые эпитеты» [2, с. 290]. Это касается и разновидности *D. carthusianorum* L. var. *polonicus* (Zapal.) Kulcz., которую многие ботаники признают как самостоятельный вид, – *Dianthus polonicus* Zapal.

Dianthus polonicus Zapal. – гвоздика польская – была описана польским ботаником Г. Запаловичем (H. Zapalowicz) в 1911 г. в работе «Conspectus florum Galicie criticus» (pars XVIII, p. 14–15) с территории Украины. Однако в 1921 г. С. Кульчинский (S. Kulczynski) понижает статус этого вида до разновидности, и уже в [9] вид фигурирует как *D. carthusianorum* L. var. *polonicus* (Zapal.) Kulcz. В то же время украинские [4; 11; 12] и российские [1; 2, с. 290; 13] ботаники признают *D. polonicus* Zapal. в ранге вида.

Сведения о произрастании *D. polonicus* Zapal. на территории Беларуси в работах белорусских флористов отсутствуют, но они неоднократно приводились украинскими ботаниками [4; 11; 12]. Например, кроме нахождения вида на территории Закарпатья в качестве общего распространения, указывается также «західна частина Беларуської РСР» [11, с. 607]. Аналогичные данные приведены в [4, с. 11]: «За межами України зростає в Польщі та в західній частині Білорусі». И наконец, в [1, р. 91; 2, с. 290; 13, с. 260] приводится конкретная точка нахождения гвоздики польской в Беларуси – окрестности г. Бреста. Однако на основании чего сделано это заявление, неизвестно, и о месте хранения гербарного материала (если он служил источником сведений) не говорится.

Эти публикации побудили нас к критико-систематической обработке всех доступных нам гербарных образцов, собранных в Беларуси и идентифицированных разными авторами как *D. carthusianorum* L.

Материалы и методы исследований

В процессе выполнения работы были критически обработаны гербарные коллекции Гербария БГУ (MSKU), Гербария Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (MSK), Гербария Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина и Гербария Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, а также личные сборы доцента кафедры ботаники биологического факультета БГУ М. А. Джуса. Всего было просмотрено более 80 гербарных листов. Камеральная обработка проводилась с помощью бинокулярного микроскопа Stemi 2000 фирмы Zeiss (Германия). При идентификации образцов использовались различные источники [1; 2, с. 290; 9; 11].

Для уточнения диагностических признаков вегетативных органов и цветка были сняты и статистически обработаны [14] морфометрические показатели листьев, листовых влагалищ и прицветных чешуй. Для получения сопоставимых данных листья и листовые влагалища изучались на третьем – пятом узлах от соцветия. Выявление морфологических и морфометрических особенностей прицветных чешуй проводили с помощью размачивания цветков в воде (первоначальная температура составляла около 100 °С, время экспозиции равнялось 24–48 ч) и последующего препарирования. Для наглядной демонстрации соотношения длины чашечки цветка и прицветных чешуй отпрепарированные материалы наклеивались с помощью клея ПВА на цветную бумагу и фотографировались.

На основании полученных данных, документально подтвержденных гербарными материалами, были составлены точечные карты местонахождений видов на территории Беларуси.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ данных литературы [1; 2] показал, что морфологические признаки вегетативных органов *D. carthusianorum* и *D. polonicus*, которые в дихотомических ключах приводятся в качестве диагностических, сходны, что, естественно, затрудняет четкое разграничение этих видов. Более того, в некоторых случаях указываемые признаки противоречивы, так, если в [1] указывается, что у *D. polonicus* чашечка зеленая или светло-пурпурная, то в [12] говорится, что у *D. carthusianorum* чашечка пурпурная или зеленоватая, а у *D. polonicus* – пурпурная. Имеются некоторые неточности и в характеристике окраски прицветных чешуй. В [12] прицветные чешуи *D. carthusianorum* описываются как бурые или черноватые, а цвет прицветных чешуй *D. polonicus* вообще не указан, тогда как в [11] они охарактеризованы как бурые или светло-бурые.

Однако согласно данным [1; 2] окраска прицветных чешуй у *D. carthusianorum* и *D. polonicus* различная и является четким диагностическим признаком: у *D. carthusianorum* прицветные чешуи темно-коричневые, у *D. polonicus* – соломенно-желтые. Различаются эти виды также отношением длины острия (остей) цветочных чешуй к длине чашечки цветка [1; 2, с. 92; 12]. У *D. carthusianorum* острие прицветных чешуй доходит (или немного не доходит) до основания зубцов чашечки, у *D. polonicus* оно не доходит до половины длины чашечки.

Критическая обработка всех гербарных материалов, идентифицированных ранее разными авторами как *D. carthusianorum*, показала, что большинство из них по признакам следует рассматривать как *D. polonicus*. Только для 26 гербарных экземпляров нами было подтверждено название *D. carthusianorum*.



Рис. 2. *Dianthus polonicus* (а); *Dianthus carthusianorum* (б)

Fig. 2. *Dianthus polonicus* (a); *Dianthus carthusianorum* (b)

Сравнительное изучение обоих видов, проведенное нами, подтвердило, что они действительно сходны по вегетативным органам и типам соцветий (рис. 2). Это многолетники с цветками, скупенными в плотные головчатые соцветия.

Сходной является и вегетативная сфера растений. У обоих видов гвоздики стебли облиственные, однако у *D. polonicus* листья расположены очень густо, в то время как у *D. carthusianorum* – довольно рыхло. Стеблевые узлы вздутые, междоузлия хорошо выражены, одинаковые по величине (табл. 1). Длина и ширина листовых пластинок *D. carthusianorum* и *D. polonicus* также приблизительно равны. Листья линейно-ланцетные, сидячие, в основании сросшиеся в достаточно длинные влагалища (см. табл. 1).

Таблица 1

Морфометрическая характеристика вегетативной сферы
D. polonicus и *D. carthusianorum*

Table 1

The morphological characteristic of the *D. polonicus* and *D. carthusianorum*

Название вида	Длина междоузлия, см, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Длина листа, см, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Ширина листа (Ш), мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Длина влагалища, (Д), мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Отношение Д : Ш, отн. ед.
<i>D. polonicus</i>	$7,17 \pm 0,35$	$7,74 \pm 0,47$	$2,46 \pm 0,12$	$13,72 \pm 0,33$	5,57
<i>D. carthusianorum</i>	$7,25 \pm 0,74$	$6,85 \pm 0,10$	$2,62 \pm 0,10$	$16,28 \pm 0,60$	6,20

Сведения о длине влагалищ в литературе отсутствуют, но в [12, с. 80] указывается, что «длина влагалищ листа у обоих видов в несколько раз превышает ширину листа». Наши данные подтверждают это указание. Однако согласно полученным результатам (табл. 1) влагалища листа *D. carthusianorum* значительно длиннее влагалищ листа *D. polonicus*. Мы полагаем, что этот признак можно использовать в качестве таксономического. В то же время отношение длины влагалища к ширине листа у обоих видов почти одинаковое, лежит в пределах ошибки выборки (см. табл. 1) и не может служить диагностическим признаком.

У обоих видов чашечки одинаково окрашенные. Они пурпурные, хотя интенсивность окраски может несколько отличаться, что, возможно, связано с интенсивностью освещения цветков. Размеры чашечек, по нашим данным, у *D. carthusianorum* и *D. polonicus* различаются незначительно (табл. 2), что, вполне вероятно, можно объяснить недостаточной выборкой материала из-за ограниченного количества сборов с территории Беларуси. Однако в то же время эти данные согласуются с данными [4], где указывается, что чашечка у *D. polonicus* короче и уже, чем у *D. carthusianorum*.

Важным диагностическим признаком изучаемых гвоздик, как было указано выше, является окраска прицветных чешуй. Наши данные по этому вопросу согласуются с данными [1; 2, с. 92]. В процессе работы нами было подтверждено, что для *D. polonicus* характерны светло- или темно-соломенные прицветные чешуи, а для *D. carthusianorum* – темно-коричневые.

Наши данные согласуются со сведениями из литературы [1; 2, с. 290; 11, с. 607] и по поводу длины острия (остей) прицветных чешуй *D. carthusianorum* и *D. polonicus* (см. табл. 2 и рис. 3). Ости прицветных чешуй *D. carthusianorum* значительно длиннее остей *D. polonicus* (см. табл. 2). Острие прицветных чешуй *D. carthusianorum* достигает (или почти достигает) основания зубцов чашечки или доходит до их верхушки, в то время как у *D. polonicus* острие не превышает (или едва превышает) середину чашечки (рис. 3).

Таблица 2

Морфометрические данные чашечек и прицветных чешуй
D. polonicus и *D. carthusianorum*, мм

Table 2

The morphological characteristic of the *D. polonicus* and
D. carthusianorum calyx and epicalyx scales, mm

Название вида	Длина чашечки, мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Характеристика прицветных чешуй			
		Длина чешуи без острия, мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Ширина в верхней части, мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Ширина в основании, мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Длина острия чешуи, мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
<i>D. polonicus</i>	14,60 ± 0,11	6,32 ± 0,19	4,40 ± 0,15	2,55 ± 0,11	2,85 ± 0,15
<i>D. carthusianorum</i>	15,33 ± 0,25	8,46 ± 0,24	3,02 ± 0,18	1,62 ± 0,09	4,07 ± 0,24

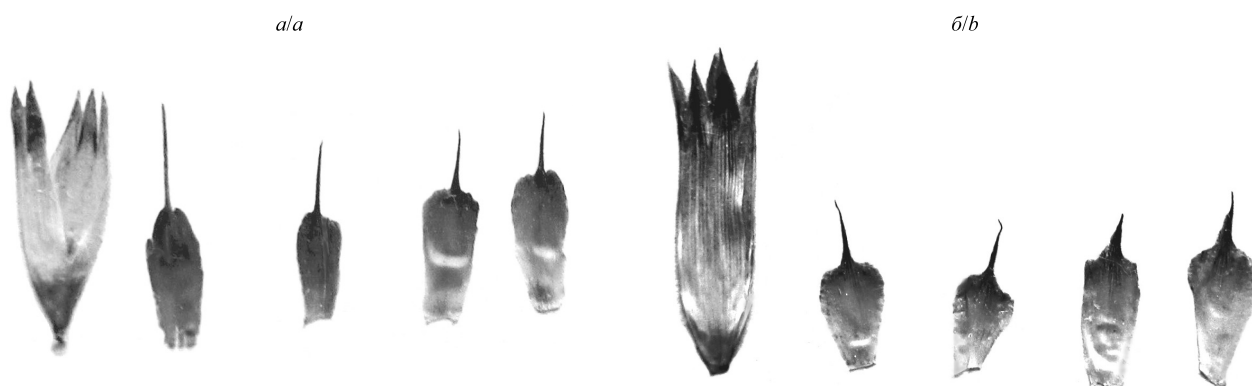


Рис. 3. Чашечки и прицветные чешуи: *D. carthusianorum* (а); *D. polonicus* (б)

Fig. 3. The calyx and epicalyx scales: *D. carthusianorum* (a); *D. polonicus* (b)

Форма прицветных чешуй, на наш взгляд, является важным таксономическим признаком, но она кратко описана только для *D. polonicus* [11]. Согласно нашим данным прицветные чешуи *D. carthusianorum* и *D. polonicus* хорошо различаются по форме (см. рис. 3). О форме чешуй можно судить по соотношению ширины чешуи в верхней части и в основании (см. табл. 2). Как видно из табл. 2, прицветные чешуи *D. carthusianorum* в верхней части и в основании значительно уже, чем у *D. polonicus*, у которого они шире и в верхней части, и в основании. Это позволяет определить форму чешуй. Прицветные чешуи *D. carthusianorum* продолговато-эллиптические без пленчатого окаймления по краю или с узким, едва заметным окаймлением, длинным острием, равным или почти равным длине самой чешуи (см. рис. 3, а). У *D. polonicus* прицветные чешуи обратнойцевидные с широким бело-пленчатым краем, на верхушке с небольшой выемкой, из которой выходит короткое острие (см. рис. 3, б). Длина самой чешуи у *D. carthusianorum* больше, чем у *D. polonicus* (см. табл. 2).

Несомненный интерес представляют хорологические особенности гвоздики картузианской и гвоздики польской на территории Республики Беларусь.

На основании гербарных материалов, которые являются документальным подтверждением достоверности местонахождений, нами впервые были составлены точечные карты, отражающие на данный момент местонахождения *D. polonicus* и *D. carthusianorum* на территории Беларуси (рис. 4 и 5).

Местонахождения *D. polonicus*, как видно из рис. 4, приурочены преимущественно к Брестской области. Большинство из них находятся на юго-западе области, и лишь единичные сборы отмечены в юго-восточной части (рис. 4). Несколько находок имеются из западной части Гродненской области.

Известные в настоящее время точки нахождения *D. carthusianorum* сосредоточены преимущественно в Гродненской области, в пределах Гродненской возвышенности. Наибольшее число гербарных образцов зарегистрированы в окрестностях г. Гродно. Известны единичные сборы с Волковысской возвышенности. Как показали наши исследования, в Брестской области *D. carthusianorum* отмечен всего в четырех точках. Три из них находятся в западной части региона, одна – в центральной (рис. 5).

Хорологические особенности *D. polonicus* и *D. carthusianorum* на территории Беларуси, возможно, обусловлены их требованием к типу почв. Как известно, эти виды тяготеют к карбонатным почвам [1; 2, с. 91, 92; 13], а в Волковысском, Гродненском, Дятловском и Кореличском районах Гродненской области, а также в Брестском и Малоритском районах Брестской области находятся крупнейшие месторождения мела и во многих местах ведется промышленная заготовка мела и извести [15, с. 37].

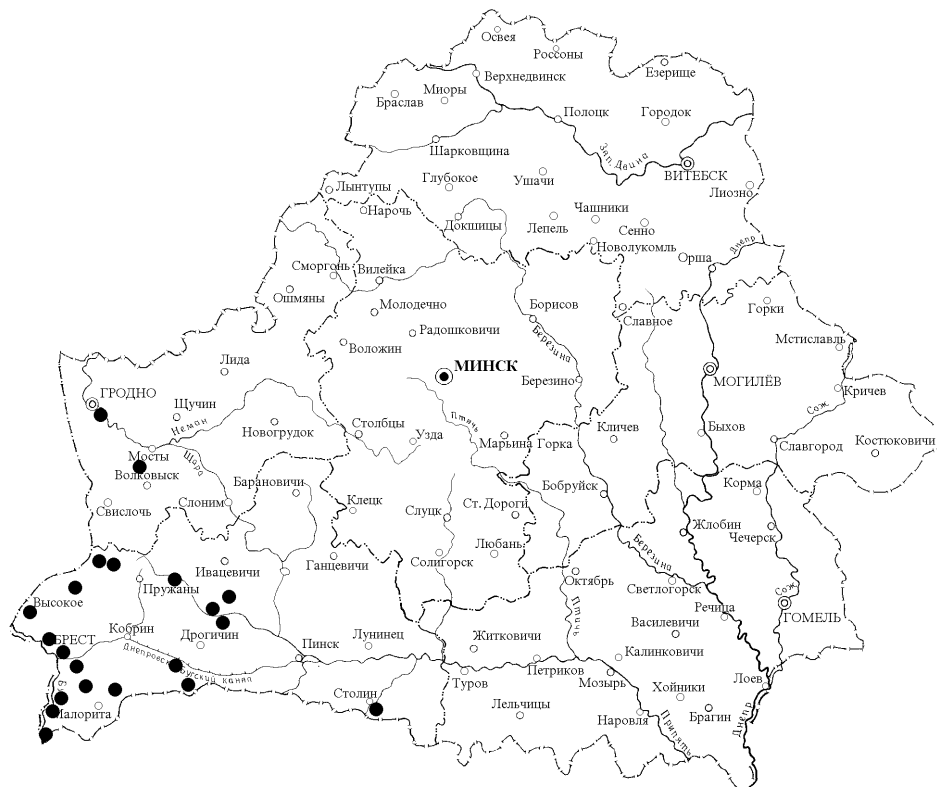


Рис. 4. Местонахождения *D. polonicus* во флоре Беларуси

Fig. 4. Location *D. polonicus* in the flora of Belarus

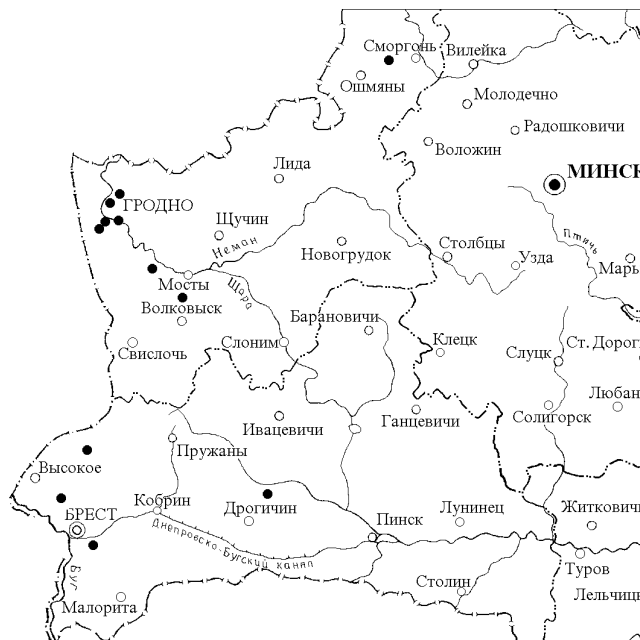


Рис. 5. Местонахождения *D. carthusianorum* во флоре Беларуси
Fig. 5. Location *D. carthusianorum* in the flora of Belarus

Заклучение

Таким образом, наши данные меняют ранее существовавшие представления о распространении *D. carthusianorum* на территории республики (см. рис. 1) [5–7] и показывают, что этот вид является узколокализированным, приуроченным преимущественно к Гродненской возвышенности. В то же время нами документально подтверждено произрастание *D. polonicus* в Беларуси и установлено, что этот вид распространен в Брестской области гораздо шире, чем указывалось в [1; 2; 13]. Кроме Брестской области единичные местонахождения *D. polonicus* выявлены и в Гродненской области.

Ревизия материалов трех гербариев крупнейших белорусских университетов и Гербария Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси подтвердила, что оба вида являются для Беларуси редкими и требуют дальнейшего изучения. Это касается как морфолого-биологических, так и хорологических особенностей.

Библиографические ссылки

1. Kuzmina M. L. The sections Carthusiani and Armerium of the genus *Dianthus* (Caryophyllaceae) in East Europe and the Caucasus // Komarovia. 2003. № 3.
2. Кузьмина М. Л. Гвоздика – *Dianthus* L. // Флора Восточной Европы : в XI т. М. ; СПб. : Товарищество научных изданий КМК, 2004. Т. XI.
3. Красная книга Республики Беларусь. Минск : Белорусская энциклопедия имени Петруся Бровки, 2015.
4. Федорончук М. М., Чорней І. І. Рід *Dianthus* L. (Caryophyllaceae Juss.) флори України: таксономічний і соціологічний аналіз // Заповідна справа в Україні : в 16 т. Київ : Наукова думка, 2005. Т. 11.
5. Протасевич Р. Т. *Dianthus* L. – Гвоздика // Определитель растений Беларуси. Минск : Вышэйшая школа, 1967.
6. Млынарчик М. П. *Dianthus* L. – Гвоздика // Определитель высших растений Беларуси. Минск : Дизайн ПРО, 1999.
7. Чырвоная кніга Рэспублікі Беларусь. Мінск : Беларуская энцыклапедыя імя Петруся Броўкі, 1993.
8. Красная книга Республики Беларусь. Растения. Минск : Беларуская энцыклапедыя імя Петруся Броўкі, 2005.
9. Sychowa M. *Dianthus* L. – Goździk // Flora Polski. Rośliny naczyniowe : w 6 t. Krakow : Instytut Botaniki im. W. Szafera : Polska Akademia Nauk, 1992. Т. 3.
10. Tutin T. G., Walters S. M. *Dianthus* L. // Flora Europaea : in 5 vol. 2nd ed. Cambridge : Cambridge University Press, 1996. Vol. 1 : Psilotaceae to Plantaginaceae.
11. Клоков М. В. Флора УРСР : в 6 т. Київ : Видавництво академії наук Української РСР, 1952. Т. 4.
12. Зиман С. Н. Гвоздика – *Dianthus* L. // Определитель высших растений Украины. Киев : Наукова думка, 1987.
13. Князев М. С. *Dianthus* L. – Гвоздика // Конспект флоры Восточной Европы : в 4 т. М. ; СПб. : Товарищество научных изданий КМК, 2012. Т. 1.
14. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск : Вышэйшая школа, 1973.
15. Природа Белоруссии // Популярная энциклопедия. Минск : Белорусская энциклопедия имени Петруся Бровки, 1986.

References

1. Kuzmina M. L. The sections Carthusiani and Armerium of the genus *Dianthus* (Caryophyllaceae) in East Europe and the Caucasus. *Komarovia*. 2003. No. 3.
2. Kuzmina M. L. Gvozdika – *Dianthus* L. *Flora Vostochnoy Evropy* : in XI vol. Moscow ; Saint Petersburg : Tovarithchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2004. Vol. XI (in Russ.).
3. The Red Book of the Republic of Belarus. Minsk : Belorusskaya entsiklopediya imeni Petrusya Brovki, 2015 (in Russ.).
4. Fedoronchuk M. M., Chorney I. I. Genus *Dianthus* L. (Caryophyllaceae Juss.) of flora of Ukraine: taxonomical and zoological analysis. *Reserved work in Ukraine* : in 16 vol. Kyiv : Naukova dumka, 2005. Vol. 11 (in Ukrainian).
5. Protasevich R. T. *Dianthus* L. – Gvozdika. *Opredelitel' rastenii Belarusi* [*Dianthus* L. – Carnation. Manual of Plants of Belarus]. Minsk : Vyshnejshaja shkola, 1967 (in Russ.).
6. Mlynarchik M. P. *Dianthus* L. – Gvozdika. *Opredelitel' vysshikh rastenii Belarusi* [*Dianthus* L. – Carnation. Manual of Vascular Plants of Belarus]. Minsk : Dizain PRO, 1999 (in Russ.).
7. The Red Book of the Republic of Belarus. Minsk : Belaruskaja jencyklapedyja imja Petrusja Browki, 1993 (in Belarus.).
8. The Red Book of the Republic of Belarus. Plants. Minsk : Belaruskaja jencyklapedyja imja Petrusja Browki, 2005 (in Russ.).
9. Sychowa M. *Dianthus* L. – Goździk. *Flora Polski. Rośliny naczyniowe* : w 6 t. Krakow : Instytut Botaniki im. W. Szafera : Polska Akademia Nauk, 1992. T. 3 (in Pol.).
10. Tutin T. G., Walters S. M. *Dianthus* L. *Flora Europaea* : in 5 vol. Cambridge : Cambridge University Press, 1996. Vol. 1 : Psilotaceae to Plantaginaceae.
11. Klovov M. V. Flora URSS [Flora of the Ukraine] : in 6 vol. Kyiv : Vydavnytstvo akademyy nauk Ukrain'skoj SSR, 1952. Vol. 4 (in Ukrainian).
12. Ziman S. N. Gvozdika – *Dianthus* L. *Opredelitel' vysshikh rasteniy Ukrainy*. Kiev : Naukova dumka, 1987 (in Russ.).
13. Knyazev M. S. *Dianthus* L. – Gvozdika [*Dianthus* L. – Carnation]. *Konspekt flory Vostochnoy Yevropy* : in 4 vol. Moscow ; Saint Petersburg : A partnership of scientific publications KMK, 2012. Vol. 1 (in Russ.).
14. Rokitskiy P. F. Biologicheskaya statistika [Biological Statistics]. Minsk : Vyshnejshaja shkola, 1973 (in Russ.).
15. Priroda Belarusi [The Nature of Belarus]. *Popularnaya encyclopediya* [Popular encyclopedia]. Minsk : Belorusskaya entsiklopediya imeni Petrusya Brovki, 1986 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 19.06.2017.

Received by editorial board 19.06.2017.

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

УДК 614.8(075.8)

Безопасность жизнедеятельности человека [Электронный ресурс] : учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 03 01 «Математика (по направлениям)», 1-31 03 02 «Механика и математическое моделирование (по направлениям)», 1-31 03 08 «Математика и информационные технологии», 1-31 03 09 «Компьютерная математика и системный анализ» / сост.: О. Д. Бичан [и др.] ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2017. 30 с. : табл. Библиогр.: с. 20–30. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/182508>. Загл. с экрана. Деп. 02.09.2017, № 006902102017.

Содержит материалы, которые используются в учебном процессе: учебную программу, учебные пособия, включающие лекционный и практический материал по дисциплине, тематику и учебно-методические рекомендации по семинарским и практическим занятиям, теоретические вопросы и тесты для контроля знаний, вопросы для подготовки к зачету, список рекомендуемой литературы.

УДК 57(06)

Биологическая осень 2017 [Электронный ресурс] : к Году науки в Беларуси : тез. докл. Междунар. науч. конф. молодых ученых (Минск, 9 нояб. 2017 г.) / редкол.: В. В. Лысак (гл. ред.) [и др.] ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск, БГУ. 2017. 317 с. Библиогр. в тексте. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/184697>. Загл. с экрана. Деп. 08.11.2017, № 008508112017.

В издании представлены тезисы докладов участников Международной научной конференции «Биологическая осень 2017», прошедшей на биологическом факультете БГУ (9 ноября 2017 г.). Предназначено для широкого круга специалистов-биологов.

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Шахрани М., Сидоров А. В. Сравнительная характеристика электрофизиологических показателей идентифицированных дофаминергических (R.Pe.D.1) и серотонинергических (L.Pe.D.1) нейронов центральной нервной системы моллюска <i>Lymnaea stagnalis</i>	3
Кохановский А. И., Орёл Н. М., Кохановская Е. Ю. Эффективность использования казеината железа для коррекции дефицита железа и гематологических показателей в условиях экспериментальной модели алиментарной анемии у крыс	10
Веремеенко Е. Г., Леончик Е. В., Максимова Н. П. Анализ биологической активности феназинового комплекса бактерий <i>Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca</i> в отношении нормальных и малигнизированных клеточных линий	14

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Гринев В. В., Хайденрайх О. Нокдаун гибридного онкогена <i>KMT2A-AFF1</i> ассоциирован с дифференциальным сплайсингом РНК в клетках острого лимфобластного лейкоза человека	21
Кравченко Л. М., Прокулевиц В. А., Кудин К. В. Разработка и проверка функционирования генетических конструкций для ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2	28
Саврицкая А. А., Ильющёнок И. Н., Гринев В. В. Создание лентивирусного вектора, несущего сегмент GC-богатой промоторной области гибридного онкогена <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	38
Юй Чао, Шонина М. Ю., Лагодич А. В. Разработка общей концепции регулируемой инактивации гена шикиматкиназы для модификации шикиматного пути у бактерий <i>Bacillus subtilis</i>	45

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Кулешова Ю. М., Рыбакова В. А., Феклистова И. Н., Гринева И. А., Ломоносова В. А., Скакун Т. Л., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Максимова Н. П. Принципы отбора стимуляторов корнеобразования растений среди бактерий <i>Pseudomonas</i> с антагонистической активностью	54
Гринева И. А., Кулешова Ю. М., Ломоносова В. А., Маслак Д. В., Садовская Л. Е., Скакун Т. Л., Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Сохранение в процессе хранения у элиситорного биопрепарата способности индуцировать системную устойчивость	63

ЗООЛОГИЯ И БОТАНИКА

Мороз М. Д., Байчоров В. М., Гигиняк Ю. Г. Фауна водных беспозвоночных водотоков Национального парка «Беловежская пуща»	68
Дубровская В. А., Переварюха А. Ю., Трофимова И. В. Модель динамики структурированных субпопуляций осетровых рыб Каспия с учетом отклонений в темпах развития молоди	76
Анисимова Е. И. Сравнительный анализ видового состава, ландшафтного распределения и динамики встречаемости телязий крупного рогатого скота в Ираке и Дагестане	87
Ибрагимова Р. Ш. Роль промежуточных хозяев в распространении гельминтов домашних плотоядных животных на территории Азербайджана	94
Доманцевич Д. Г. Питание фоновых лесных видов перелетных воробьинообразных птиц в ранневесенний период	101
Сауткина Т. А., Пацевич А. И. <i>Dianthus carthusianorum</i> L. и <i>Dianthus polonicus</i> Zapal. во флоре Беларуси	113
Аннотации депонированных в БГУ работ	121

CONTENTS

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

<i>Shahrani M., Sidorov A. V.</i> Comparative study of electrophysiological characteristics of identified dopamine-containing (R.Pe.D.1) and serotonin-containing (L.Pe.D.1) neurons within CNS of mollusc <i>Lymnaea stagnalis</i>	3
<i>Kakhanouski A. I., Arol N. M., Kakhanouskaya K. Y.</i> The effectiveness of the use of iron caseinate for correcting iron deficiency and hematological parameters under the experimental model of alimentary anemia in rats	10
<i>Veremeenko E. G., Liavonchyk K. V., Maximova N. P.</i> Analysis of the biological activity of the phenazine complex of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> in relation to normal and malignant cell lines	14

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Grinev V. V., Heidenreich O.</i> The knockdown of the fusion oncogene <i>KMT2A-AFF1</i> is associated with differential RNA splicing in human acute lymphoblastic leukemia cells	21
<i>Kravchenko L. M., Prakulevich U. A., Kudzin K. V.</i> Development and verification of the functioning of genetic constructs for DNA vaccine against porcine circovirus type 2	28
<i>Sauryskaya H. A., Ilyushonak I. M., Grinev V. V.</i> Development of the lentiviral vector with GC-rich segment of the promoter region of fusion oncogene <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	38
<i>Yu Chao, Shonina M. Y., Lahodzich A. V.</i> Design of the general concept of regulated inactivation of the gene shikimatkinase for modification of the shikimat way in bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	45

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Kuleshova Y. M., Rybakova V. A., Feklistova I. N., Grineva I. A., Lomonosova V. A., Skakun T. L., Maslak D. V., Sadovskaya L. E., Maximova N. P.</i> Selection principles of plant korne formation stimulators among bacteria <i>Pseudomonas</i> with antagonistic activity	54
<i>Grineva I. A., Kuleshova Y. M., Lomonosova V. A., Maslak D. V., Sadovskaya L. E., Skakun T. L., Feklistova I. N., Maximova N. P.</i> The elicitor preparation retains the ability to induce systemic resistance during storage	63

ZOOLOGY AND BOTANY

<i>Moroz M. D., Baitchorov V. M., Giginia Ju. G.</i> Fauna of aquatic invertebrate water currents of National Park «Beloviezskaja Pustchia»	68
<i>Dubrovskaya V. A., Perevaryukha A. Yu., Trofimova I. V.</i> Model of dynamics of structured subpopulations of sturgeon fish in the Caspian Sea takes into account deviations in the rate of development of immature fish	76
<i>Anisimova E. I.</i> Comparative analysis of species composition, landscape distribution and dynamics of occurrence of veals in cattle in Iraq and Dagestan	87
<i>Ibrahimova R. Sh.</i> The role of intermediate hosts in the spread of worms domestic carnivores in Azerbaijan	94
<i>Domantsevich D. G.</i> Nutrition of background forest species of migratory passerine birds during the early-spring period	101
<i>Sautkina T. A., Patcevich A. I.</i> <i>Dianthus carthusianorum</i> L. and <i>Dianthus polonicus</i> Zapal. in the flora of Belarus	113
Indicative abstracts of the papers deposited in the BSU	121

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

**Журнал Белорусского
государственного университета. Биология.
№ 3. 2017**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

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

Почтовый адрес: ул. Кальварийская, 9, каб. 636, 637,
220004, г. Минск.

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

E-mail: vestnikbsu@mail.ru
vestnikbsu@bsu.by

«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология» издается с января 1969 г.
До 2017 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»
(ISSN 2308-9164).

Редактор *Е. В. Павлова*
Технический редактор *Ю. А. Тарайковская*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 28.12.2017.
Тираж 100 экз. Заказ 776.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского
государственного университета».
ЛП № 02330/117 от 14.04.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, г. Минск.

© БГУ, 2017

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 3. 2017**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: Niezaliežnasci Ave., 4,
220030, Minsk.

Correspondence address: Kal'varyjskaja Str., 9, office 636, 637,
220004, Minsk.

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

E-mail: vestnikbsu@mail.ru
vestnikbsu@bsu.by

«Journal of the Belarusian State University. Biology»
published since January, 1969.
Until 2017 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»
(ISSN 2308-9164).

Editor *E. V. Pavlova*
Technical editor *Y. A. Taraikouskaya*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 28.12.2017.
Edition 100 copies. Order number 776.

Publishing Center of BSU.
License for publishing No. 02330/117, 14 April, 2014.
Čyrvonaarmiejskaja Str., 6, 220030, Minsk.

© BSU, 2017