



БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

EXPERIMENTAL BIOLOGY and BIOTECHNOLOGY

Издается с января 1969 г.
(с 1969 по 2016 г. – под названием
«Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География»,
с 2017 по 2021 г. – под названием
«Журнал Белорусского государственного университета. Биология»)
Выходит три раза в год

1

2022

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор	ДЕМИДЧИК В. В. – доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Заместитель главного редактора	СИДОРОВ А. В. – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. E-mail: sidorov@bsu.by
Ответственный секретарь	ПШИБЫТКО Н. Л. – кандидат биологических наук; заместитель декана по научной работе 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	DEMIDCHIK V. V. , doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: dzemidchik@bsu.by
Deputy editor-in-chief	SIDOROV A. V. , doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus. E-mail: sidorov@bsu.by
Executive secretary	PSHYBYTKO N. L. , PhD (biology); deputy dean for research, 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.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

REVIEWS

УДК 577.345

СВЕРХСЛАБАЯ ФОТОННАЯ ЭМИССИЯ БИООБЪЕКТОВ: ВОЗМОЖНОЕ БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ПУТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В. А. КОСТЮК¹⁾

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

Широко распространенная в природе способность биообъектов испускать фотоны (биофотоны) позволила создать приборы для неинвазивного и непрерывного контроля метаболизма органов и тканей, применяемые в качестве мощного клинического диагностического инструмента, а также в целях визуализации и пространственно-временного анализа функционирующих органов, и в частности мозга. Многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие об участии биофотонов в процессах меж- и внутриклеточной коммуникации, послужили теоретическим обоснованием медицинского использования низкоинтенсивной световой терапии для эффективного лечения широкого спектра заболеваний, в том числе при замедленном заживлении ран, болях при артрите, остром инсульте.

Ключевые слова: биофотоны; митогенетическое излучение; биосигнализация; низкоинтенсивная световая терапия; оксидантный стресс.

Образец цитирования:

Костюк ВА. Сверхслабая фотонная эмиссия биообъектов: возможное биологическое значение и пути практического использования. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:3–11.

For citation:

Kostyuk VA. Superweak biophoton emission: possible biological significance and ways of practical use. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:3–11. Russian.

Автор:

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

Author:

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
kostyuk@bsu.by



SUPERWEAK BIOPHOTON EMISSION: POSSIBLE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE AND WAYS OF PRACTICAL USE

V. A. KOSTYUK^a

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

Widespread in nature ability of biological objects to emit photons (biophotons) made it possible to create devices for non-invasive and continuous monitoring of the metabolism of organs and tissues, used as a powerful clinical diagnostic tool, as well as for visualisation and spatio-temporal analysis of functioning organs and, in particular, the brain. Numerous experimental data indicating the participation of biophotons in the processes of inter- and intracellular communication served as a theoretical basis for the medical use of low-intensity light therapy for the effective treatment of a wide range of diseases, including delayed wound healing, pain in arthritis, and acute stroke.

Keywords: biophotons; mitogenetic radiation; biosignaling; low-intensity light therapy; oxidative stress.

Введение

В настоящее время хорошо известно, что, помимо физических (естественных или искусственных) источников ионизирующего и неионизирующего излучения, которые обладают высокой энергией и в зависимости от дозы способны вызывать повреждения, приводящие к немедленной гибели клеток путем некроза либо инициирующие внутренние или внешние сигнальные пути, включающие механизмы апоптоза, источником излучения могут быть живые объекты. Исследование сверхслабого фотонного излучения живой материи было начато в 1920-х гг. российским биологом А. Г. Гурвичем, который обнаружил изменение митотического режима у одного биологического объекта (детектора) под внешним нехимическим воздействием другого биологического объекта (индуктора) и назвал это явление митогенетическим эффектом (МГЭ) [1]. На основании экспериментов с различными УФ-экранами сделан вывод, что действующим фактором индукторов является УФ-свет очень низкой интенсивности с длиной волны менее 350 нм. Эти световые волны получили название митогенетического излучения (МГИ) [2; 3]. МГЭ и МГИ вызвали огромный интерес научного сообщества, что привело к значительным академическим достижениям, включая публикацию известными биологами, физиками и химиками статей в ведущих журналах (например, не менее 10 статей в журнале «Nature») [4]. Однако наряду с исследованиями, показывающими существование межклеточной коммуникации посредством электромагнитного излучения, приводящей к стимуляции деления клеток, активации нейтрофилов, индукции респираторного взрыва и изменению стадий развития, были и многочисленные безуспешные попытки подтвердить биологическое значение МГИ. Подробный анализ результатов этих исследований приведен в ряде оригинальных и обзорных статей [4–9].

Общие представления о биофотонах

Хотя данные, касающиеся биологических эффектов МГИ, довольно противоречивы, способность биообъектов испускать фотоны (биофотоны) в спектральном диапазоне от 350 до 1300 нм оказалась широко распространенной в природе [6]. Еще в 1934 г. была выдвинута гипотеза, что МГИ возникает в результате рекомбинации свободных радикалов [9]. Последующие исследования доказали, что появление биофотонов связано с биолюминесцентными радикальными и нерадикальными реакциями активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА), а также с процессами превращения и рекомбинации возбужденных состояний [10–12].

Эмиссия биофотонов биохимически отличается от более известного явления биолюминесценции. Так, биолюминесценция (как, например, у светлячков) обычно видна без использования специального оборудования и происходит благодаря наличию специальных ферментных механизмов, в частности системы люциферин – люцифераза. Излучение биофотонов, напротив, намного слабее (как правило, составляет менее 1000 фотонов в секунду на 1 см², что на несколько порядков ниже уровня излучения, видимого глазом [13]) и протекает в обычных клетках и тканях. Современные разработки в области обнаружения МГИ с использованием малошумящих фотоэлектронных умножителей и способов их регистрации с помощью фоточувствительных матриц цифровых устройств с зарядовой связью позволяют усилить световой сигнал в 100 млн раз и детектировать даже отдельные фотоны [14]. Установлено, что в ходе естественных метаболических процессов, происходящих в различных живых организмах,

наблюдается постоянное и спонтанное сверхслабое излучение биофотонов в диапазоне от нескольких единиц до нескольких тысяч фотонов без какого-либо внешнего воздействия [8]. В частности, показано, что биофотоны могут возникать в виде когерентного излучения, и хроматин был предложен как один из наиболее важных источников излучения биофотонов [15; 16]. Получены убедительные экспериментальные данные, свидетельствующие, что эти процессы активируются в момент гибели клеток, в результате чего излучение становится намного сильнее, чем испускаемое в нормальных условиях [17].

Благодаря достижениям в области фотодетектирования в УФ, видимом и ближнем инфракрасном диапазонах электромагнитного спектра удалось визуализировать процессы окислительного метаболизма и окислительного стресса во времени и пространстве. С начала 1980-х гг. ученые регистрировали излучение биофотонов из печени, сердца, легких и мышечной ткани млекопитающих [18–23]. Данная методология использовалась для анализа излучения как цельных органов, так и тканевых гомогенатов и субклеточных фракций. Было показано, что митохондрии и микросомы (сферические частицы, образующиеся при разрушении эндоплазматического ретикулума) являются преобладающими источниками излучения клеточных биофотонов [24–26] благодаря наличию в данных структурах мембранно-связанных систем переноса электронов. В митохондриях это дыхательная цепь, локализованная на внутренней мембране, в микросомах – короткая электротранспортная цепь, включающая флавопротеиды и цитохром P450. В обеих структурах максимальная фотоактивность наблюдается в присутствии кислорода. Для более точной идентификации молекулярного источника биофотонов в клетках печени, мозга, легких и сердца, а также в микросомальных фракциях печени был проведен спектральный анализ испускаемого излучения и выявлен ряд полос излучения в диапазоне 400–700 нм, свидетельствующих, что основным источником испускания биофотонов во время свободнорадикальных процессов, и в частности перекисного окисления липидов, является синглетный молекулярный кислород [24–31].

Нервные клетки также непрерывно испускают биофотоны. Интенсивность излучения биофотонов находится в прямой зависимости от нервной активности, церебрального кровотока и энергетического метаболизма (окислительных процессов) [32; 33]. По данным [34], существует корреляция между колебаниями излучения биофотонов и колебаниями амплитуды альфа-ритма. Считается, что состояние биофотонного поля человека может быть связано с состоянием мозга, характеризуемым электроэнцефалограммой (ЭЭГ) (например, степенью синхронизации и когерентности), хотя исследования, достоверно подтверждающие согласованность биофотонного поля и показаний ЭЭГ, пока не проведены [35].

Поскольку излучение биофотонов связано с генерацией АФК и образованием электронно-возбужденных состояний в биологических системах, регистрацию биофотонов можно использовать в качестве мощного клинического диагностического инструмента. Возможность неинвазивно и непрерывно контролировать метаболизм органов и тканей, оценивать окислительно-восстановительный статус и степень оксидантного стресса *in vivo*, регистрируя продукцию биофотонов, обеспечивает существенное преимущество данной методологии перед методами, базирующимися на использовании электронного спинового резонанса, анализе углеводородного спектра в выдыхаемом воздухе или накопления продуктов перекисного окисления в плазме крови [36–40]. Кроме того, на основе обнаружения биофотонов разработаны методы визуализации и пространственно-временного анализа. Двумерная биофотонная визуализация мозга крысы *in vivo* осуществлена в 1999 г., когда с помощью высокочувствительной сверхмалошумящей системы камер было продемонстрировано, что пространственно-временная эмиссия биофотонов в головном мозге крысы коррелирует с энергетическим метаболизмом мозга и окислительным стрессом [33]. Окислительный стресс клеток можно определить как дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, приводящий к нарушению редокс-передачи сигналов и окислительному повреждению биомолекул [41]. Развитие окислительного стресса в клетках и тканях может происходить в результате воздействия многочисленных внешних факторов (химических, физических и биологических) [42]. В частности, получены убедительные доказательства, свидетельствующие, что окислительный стресс способны вызывать фармакологические препараты, имеющие в своей структуре хинонные группы [43]. Хиноны широко используются в качестве противоопухолевых, антибактериальных или противомаларийных препаратов и фунгицидов. Окислительный стресс возникает, когда хинон восстанавливается редуктазами до семихинонового радикала, который восстанавливает кислород до супероксидных радикалов и преобразует хинон. Этот окислительно-восстановительный цикл и активацию кислорода можно рассматривать как побочную реакцию, которая создает цитотоксические уровни перекиси водорода и окисленного глутатиона (GSSG). Кроме того, большинство хинонов образуют конъюгаты с восстановленным глутатионом (GSH), которые также вовлекаются в побочный окислительно-восстановительный цикл, ведущий к активации кислорода [43]. Среди производных п-бензохинона очень высокая цитотоксическая активность, обусловленная рассмотренными выше механизмами, была обнаружена у 2,3,5-(CH₃)-3-бензохинона (кумохинон) и 2,3,5,6-(CH₃)-4-бензохинона (дурохинон) [44].

Термин «сверхслабая биолюминесценция» («сверхслабая фотонная эмиссия биообъектов») может вводить в заблуждение, поскольку можно думать, что в силу чрезвычайно низкой продукции биофотоны не важны для клеточных процессов и организма в целом. Однако теоретические выкладки, учитывающие способность внутриклеточных хромофоров поглощать фотоны, позволяют считать, что реальная интенсивность потока биофотонов, генерируемого в клетках, может быть на 2 порядка выше, чем интенсивность, которую можно было бы ожидать от измерения сверхслабой биолюминесценции, обычно осуществляющейся макроскопически на расстоянии нескольких сантиметров от ткани или клеточной культуры [45–48]. Причем поглощение «сигнальных биофотонов» происходит в клетках наиболее интенсивно [48]. Биофотоны могут поглощаться естественными хромофорами, такими как кольца порфирина, флавиновой кислоты, пиридиновые кольца, липидные хромофоры, ароматические аминокислоты и др. [29; 48–50]. Митохондриальные цепи переноса электронов содержат несколько хромофоров, среди которых наиболее значимым является фермент цитохромоксидаза [29; 49]. В результате поглощения биофотонов светочувствительными молекулами последние переходят в электронно-возбужденное состояние, которое обычно характеризуется другими химическими и физическими свойствами по сравнению с основным состоянием. При этом биофотоны могут выполнять сигнальную функцию, запуская и регулируя меж- и внутриклеточную передачу сигналов [51].

Механизм продукции и физиологическая роль биофотонов в митохондриях нервных клеток

Считается, что микротрубочки (МТ) играют важную роль в передаче сигналов и обработке информации, которые происходят в мозге [52–54]. Нейроны позвоночных обычно имеют нитчатые митохондрии, связанные с МТ цитоскелета и образующие вместе с ними непрерывную сеть (митохондриальный ретикулум) [55]. В составе таких структур митохондрии благодаря МТ способны совершать быстрые движения [56]. Показатель преломления как митохондрий, так и МТ выше, чем у окружающей цитоплазмы [48]. Это означает, что митохондрии и МТ могут действовать как оптические волноводы, т. е. электромагнитное излучение может распространяться в их сетях [48; 53; 57]. Формирование и рост МТ, а следовательно, и быстрый митохондриальный трафик могут регулироваться редокс-зависимым фосфорилированием, связанным с кальциевой сигнализацией. Таким образом, митохондриальный ретикулум может действовать как Ca^{2+} -регулируемая органическая квантовая оптоволоконная система в нейронах. МТ состоят из димеров тубулина, каждый из которых включает восемь остатков триптофана [58], являющихся независимыми центрами флуоресценции. Общеизвестно, что положение максимумов поглощения и испускания, а также интенсивность флуоресценции зависят от конформации тубулина. Это позволяет использовать определение данных параметров в качестве стандартного метода оценки состояния полимеризации МТ.

Изложенный выше феномен можно рассматривать как один из возможных механизмов, обуславливающих взаимосвязь между колебаниями в процессе роста МТ и в процессе поглощения и излучения биофотонов. Существуют и другие энергетические состояния колебательного характера [53; 58; 59], которые реализуются на уровне димеров тубулина и МТ в целом и могут поддерживаться энергией митохондрий [60]. Кроме того, полимеризация МТ чувствительна к УФ [61] и синему свету [62], а митохондрии, как известно, являются источниками биофотонов, соответствующих этим же длинам волн [63–65], что подтверждает возможность реализации молекулярных механизмов, обеспечивающих взаимосвязь между ростом МТ и поглощением и излучением биофотонов. Также получены убедительные данные, свидетельствующие, что излучение фотонов в видимом и инфракрасном диапазонах отражает патофизиологические изменения в митохондриях, приводящие как к нарушению продукции АТФ, так и к развитию окислительного стресса. Таким образом, регистрация кинетики испускания биофотонов и определение их спектральных характеристик позволяют оценивать функциональное состояние системы окислительного фосфорилирования митохондрий [33].

Биофотоны и низкоинтенсивная световая терапия

Установление сигнальной функции биофотонов послужило теоретическим обоснованием медицинского использования низкоинтенсивной световой терапии (НИСТ) для эффективного лечения широкого спектра заболеваний, в том числе при замедленном заживлении ран, болях при артрите, остром инсульте [66–69]. Результаты многочисленных экспериментальных исследований свидетельствуют, что под воздействием НИСТ активируется образование АТФ и снижается глубина окислительного стресса, который возникает из-за чрезмерного производства АФК или низкой эффективности антиоксидантной защитной системы [70–72]. Активация митохондриальных процессов красным и ближним инфракрасным светом, в свою очередь, стимулирует метаболизм в клетках и тканях, обеспечивающих развитие

местного иммунного ответа [73–76]. Показано, что результат воздействия красной и инфракрасной низкоинтенсивной фототерапии на клетки и ткани зависит от длины волны, интенсивности и частоты импульсов [71; 72], а также от степени оксигенации клеток и тканей и уровня продукции АФК [73]. По мнению ряда исследователей, вариабельность результатов лечения пациентов с помощью НИСТ можно объяснить различиями в редокс-состоянии клеток и тканей мишеней [77; 78]. Еще одним фактором, определяющим чувствительность клеток к красному и инфракрасному свету *in vitro* и *in vivo*, является фаза клеточного роста [67; 71], которая, в свою очередь, связана с уровнем АФК [78; 79].

Есть мнение, что НИСТ и биофотоны имеют общие молекулярные механизмы, и, подобно НИСТ, биофотоны могут влиять на клетки посредством фотобиостимуляции [15; 80]. Противники этой идеи, которая основывается в том числе и на работах, выполненных в 1920-х гг. А. Г. Гурвичем [1; 2; 5], в качестве возражения указывают, что низкоинтенсивные лазеры и светодиоды эффективны при интенсивности светового потока, как минимум на несколько порядков превышающей интенсивность зарегистрированной эмиссии биофотонов. Однако выше уже указывалось, что реальная интенсивность потока биофотонов, генерируемого в клетках, может быть на 2 порядка выше, чем интенсивность, которую можно было бы ожидать от измерения сверхслабой биолюминесценции [45–48]. Таким образом, несмотря на отсутствие убедительных доказательств, несколько лабораторий в разных странах продолжают проводить систематические исследования возможной роли биофотонов в межклеточной коммуникации.

Межклеточная коммуникация сигналами, проходящими через неводную среду

Интересное исследование, подтверждающее наличие физической связи между клетками, находящимися на значительном удалении друг от друга, выполнено с использованием *Paramecium caudatum* – одноклеточного пресноводного, обитающего в Евразии [81]. Авторы работы изучали, каким образом плотность клеток-индукторов влияет на рост популяции как самих клеток-индукторов, так и клеток-детекторов. С этой целью две популяции были отделены друг от друга с помощью кварцевых или стеклянных кювет (флаконов) двух размеров. Клетки-индукторы с плотностью в диапазоне 50–300 клеток на 1 мл помещали в большие кюветы, а клетки-детекторы с начальной плотностью 5 клеток на 1 мл помещали в малые кюветы, которые располагали внутри больших кювет. Такие пары взаимно экспонировались в условиях полной темноты в течение 48 ч, после чего определялась плотность клеток в кюветах и рассчитывалась скорость роста популяций. Оказалось, что скорость роста популяции клеток-индукторов была обратно пропорциональна их исходной плотности. Однако наибольший интерес представляют результаты, свидетельствующие, что и скорость роста популяции клеток-детекторов как в кварцевых, так и в стеклянных кюветах уменьшалась с увеличением плотности клеток-индукторов во внешней кювете. При этом эффект подавления роста популяции клеток-детекторов отсутствовал, когда внутренние кюветы были экранированы графитом, который, как известно, экранирует электромагнитное излучение от 10^9 до 10^{15} Гц, поскольку поглощает энергию от микроволн до света.

Синхронность клеточных ответов механически разделенных биологических систем хорошо известна. Обычно такое синхронное поведение обеспечивается с помощью химической или электрической сигнализации. Однако со времени публикации работ А. Г. Гурвича получены многочисленные данные, свидетельствующие, что механизмы синхронизации поведения биообъектов могут реализовываться и при участии биофотонов. В этом плане весьма интересны эксперименты, выполненные А. Фархади и др. [82], в которых культура клеток Сасо-2 была разделена на три группы. Клетки-индукторы подвергали воздействию H_2O_2 . Клетки-детекторы помещали в отдельные контейнеры рядом с клетками-индукторами, но не подвергали воздействию H_2O_2 . Контрольные клетки также не подвергали воздействию H_2O_2 , но инкубировали в соседней лаборатории. В качестве тестируемых маркеров оценивали концентрацию общего белка, активацию фактора транскрипции NFκB – ключевого звена внутриклеточной передачи сигналов, связанных с воздействием на клетки различных стресс-факторов, а также изменение морфологии актиновых филаментов цитоскелета и нарушение соединительных клеточных контактов через 10; 30 и 60 мин после воздействия. Установлено, что воздействие H_2O_2 на клетки-индукторы привело к значительному снижению общего содержания белка (–50 %), увеличению ядерной активации NFκB (+38 %) и структурному повреждению цитоскелета в 56 % клеток по сравнению с контролем. Сходные, хотя и несколько менее выраженные, изменения – снижение общего содержания белка (–48 %), увеличение ядерной фракции NFκB (+35 %) и структурные повреждения цитоскелета (25 %) – отмечены и у клеток-детекторов.

Межклеточная коммуникация сигналами, проходящими через неводную среду, была выявлена и в случае развития окислительного стресса в клетках-индукторах под воздействием триметил-п-бензохинона (кумохинон) [83]. В этих экспериментах использовались кератиноциты HaCaT, фибробласты легких

и клетки рака молочной железы MCF-7. Клетки высевали в 96-луночных планшетах таким образом, что на каждом планшете был ряд (8 лунок) клеток-индукторов, по обе стороны которого находились два ряда (16 лунок) клеток-детекторов, через четыре ряда от клеток-индукторов высевали условно-контрольные клетки. После достижения клетками 100 % монослоя полную ростовую среду заменяли на среду без сыворотки, которая в случае клеток-индукторов дополнительно содержала 200 мкмоль/л кумохинона. Клетки культивировали 24 ч, после чего различными методами оценивали их жизнеспособность. В результате развития окислительного стресса в клетках-индукторах наблюдалась не только практически стопроцентная гибель последних, но и достоверная гибель клеток-детекторов. Наиболее выраженный эффект был отмечен для кератиноцитов HaCaT, в случае которых количество жизнеспособных клеток снижалось более чем на 80 %, тогда как в экспериментах с культурой MCF-7 количество жизнеспособных клеток снижалось менее чем на 40 %. Интересно, что внесение в среду культивации клеток-детекторов ингибиторов апоптоза достоверно повышало количество жизнеспособных клеток через 24 ч инкубации. Таким образом, выявлена способность различных типов клеток в условиях окислительного стресса, вызванного п-бензохиноном, генерировать сигналы смерти, которые могут воздействовать на клетки-мишени на больших расстояниях через неводную среду, что приводит к их морфологическим изменениям и потере жизнеспособности.

Представленные выше результаты могут рассматриваться как доказательства в поддержку нехимической неэлектрической межклеточной коммуникации. Такого рода сигналы, возможно, играют роль в синхронных клеточных ответах на повреждающие стимулы, что может обусловить ряд клеточных феноменов, которые трудно объяснить, основываясь только на обычных клеточных сигнальных системах. Р. А. Миллер и Б. Уэб [84] рассматривали нехимическую коммуникацию между клетками как функцию генома, который может напрямую отправлять и получать электромагнитную информацию. Недавно было высказано предположение, что электроакустические резонансы между сходными последовательностями ДНК составляют основу передачи сигналов в геноме и координируют функцию клетки [85].

Заключение

Наряду с хорошо известными физическими источниками ионизирующего и неионизирующего излучения в 1920-х гг. А. Г. Гурвичем было обнаружено, что живые объекты также могут быть источником излучения, получившего название «митогенетическое излучение». Последующие исследования доказали, что способность биообъектов испускать фотоны (биофотоны) широко распространена в природе и связана с биолюминесцентными радикальными и нерадикальными реакциями и процессами превращения и рекомбинации возбужденных состояний. Кроме того, биофотоны могут возникать в виде когерентного излучения, генерируемого на уровне хроматина и митохондриального ретикула. Современные разработки в области обнаружения МГИ позволили создать приборы для неинвазивного и непрерывного контроля метаболизма органов и тканей, способные детектировать даже отдельные фотоны, и использовать их в качестве мощного клинического диагностического инструмента, а также для визуализации и пространственно-временного анализа функционирующих органов, и в частности мозга. К настоящему времени получено много экспериментальных данных, свидетельствующих, что биофотоны способны участвовать в процессах меж- и внутриклеточной коммуникации. Установление сигнальной функции биофотонов послужило теоретическим обоснованием медицинского использования НИСТ для эффективного лечения широкого спектра заболеваний.

Библиографические ссылки / References

1. Gurwitsch A. Die Natur des spezifischen Erregers der Zellteilung. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*. 1923;100(1–2):11–40. DOI: 10.1007/BF02111053.
2. Gurwitsch A. Physikalisches über mitogenetische Strahlen. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*. 1924; 103(3–4):490–498. DOI: 10.1007/BF02107498.
3. Reiter T, Gábor D. *Zellteilung und Strahlung: Sonderheft der Wissenschaftlichen Veröffentlichungen aus dem Siemens-Konzern*. Berlin: Springer-Verlag; 1928. 193 p. DOI: 10.1007/978-3-642-50832-5.
4. Volodyaev I, Beloussov LV. Revisiting the mitogenetic effect of ultra-weak photon emission. *Frontiers in Physiology*. 2015;6:241. DOI: 10.3389/fphys.2015.00241.
5. Gurwitsch A. A historical review of the problem of mitogenetic radiation. *Experientia*. 1988;44(7):545–550. DOI: 10.1007/BF01953301.
6. Cifra M, Pospíšil P. Ultra-weak photon emission from biological samples: definition, mechanisms, properties, detection and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014;139:2–10. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.009.
7. Sanders CL. *Radiobiology and radiation hormesis. New evidence and its implications for medicine and society*. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. XI, 273 p. DOI: 10.1007/978-3-319-56372-5.
8. Rahnama M, Tuszyński JA, Bókkon I, Cifra M, Sardar P, Salari V. Emission of mitochondrial biophotons and their effect on electrical activity of membrane via microtubules. *Journal of Integrative Neuroscience*. 2011;10(1):65–88. DOI: 10.1142/S0219635211002622.

9. Gurwitsch A, Gurwitsch L. Ultra-violet chemi-luminescence. *Nature*. 1939;143(3633):1022–1023. DOI: 10.1038/1431022b0.
10. Kruk I, Lichszteid K, Michalska T, Wrońska J, Bounias M. The formation of singlet oxygen during oxidation of catechol amines as detected by infrared chemiluminescence and spectrophotometric method. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*. 1989;44(11–12):895–900. DOI: 10.1515/znc-1989-11-1203.
11. Nakano M. Low-level chemiluminescence during lipid peroxidations and enzymatic reactions. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. 1989;4(1):231–240. DOI: 10.1002/bio.1170040133.
12. Watts BP, Barnard M, Turens JF. Peroxynitrite-dependent chemiluminescence of amino acids, proteins, and intact cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995;317(2):324–330. DOI: 10.1006/abbi.1995.1170.
13. Vogel R, Süßmuth R. Weak light emission from bacteria and their interaction with culture media. In: Jiin-Ju Chang, Fisch J, Popp F-A, editors. *Biophotons*. Dordrecht: Springer Science + Business Media; 1998. p. 19–44. DOI: 10.1007/978-94-017-0928-6_2.
14. Flyckt S-O, Marmonier C. *Photomultiplier tubes: principles and applications*. Brive: Philips Photonics; 2002. 311 p.
15. Popp F-A. Properties of biophotons and their theoretical implications. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2003;41(5):391–402.
16. Popp F-A, Li K-H. Hyperbolic relaxation as a sufficient condition of a fully coherent ergodic field. *International Journal of Theoretical Physics*. 1993;32(9):1573–1583. DOI: 10.1007/BF00672857.
17. Slawinski J. Electromagnetic radiation and the afterlife. *Journal of Near-Death Studies*. 1987;6(2):79–94.
18. Shtrankfel'd IG, Klimenko LL, Komarov NN. Very weak luminescence of muscles. *Biophysics*. 1968;13(5):1082–1084.
19. Perelygin VV, Tarusov BN. Flash of very weak radiation on damage to living tissues. *Biophysics*. 1966;11(3):616–618.
20. Boveris A, Cadenas E, Chance B. Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Federation Proceedings*. 1981;40(2):195–198.
21. Barsacchi R, Camici P, Battigli U, Salvadori PA, Pelosi G, Maiorino M, et al. Correlation between hydroperoxide-induced chemiluminescence of the heart and its function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 1983;762(2):241–247. DOI: 10.1016/0167-4889(83)90077-0.
22. Cadenas E, Arad ID, Boveris A, Fisher AB, Chance B. Partial spectral analysis of the hydroperoxide-induced chemiluminescence of the perfused lung. *FEBS Letters*. 1980;111(2):413–418. DOI: 10.1016/0014-5793(80)80839-8.
23. Artem'ev VV, Goldobin AS, Gus'kov LN. Recording the optical emission of a nerve. *Biophysics*. 1967;12(6):1278–1280.
24. Cadenas E, Varsavsky AI, Boveris A, Chance B. Oxygen- or organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. *The Biochemical Journal*. 1981;198(3):645–654. DOI: 10.1042/bj1980645.
25. Cadenas E, Boveris A, Chance B. Hydroperoxide-dependent chemiluminescence of submitochondrial particles and its relationship to superoxide anion and other oxygen radicals. In: Bannister JV, Hill HAO, editors. *Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase*. New York: Elsevier; 1980. p. 92–103 (Developments in biochemistry; volume IIA).
26. Cadenas E, Boveris A, Chance B. Low-level chemiluminescence of bovine heart submitochondrial particles. *The Biochemical Journal*. 1980;186(3):659–667. DOI: 10.1042/bj1860659.
27. Cadenas E, Sies H. Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. Relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence, and lipid peroxidation. *European Journal of Biochemistry*. 1982;124(2):349–356. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06599.x.
28. Sugioka K, Nakano M. A possible mechanism of the generation of singlet molecular oxygen in NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1976;423(2):203–216. DOI: 10.1016/0005-2728(76)90179-1.
29. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1999;49(1):1–17. DOI: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X.
30. Okuda M, Lee HC, Kumar C, Chance B. Oxygen radical generation during ischemia-reperfusion in the isolated perfused rat liver monitored by enhanced chemiluminescence. *Circulatory Shock*. 1992;38(4):228–237.
31. Cadenas E, Wefers H, Sies H. Low-level chemiluminescence of isolated hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1981;119(3):531–536. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05640.x.
32. Isojima Y, Isoshima T, Nagai K, Kikuchi K, Nakagawa H. Ultraweak biochemiluminescence detected from rat hippocampal slices. *NeuroReport*. 1995;6(4):658–660. DOI: 10.1097/00001756-199503000-00018.
33. Kobayashi M, Takeda M, Sato T, Yamazaki Y, Kaneko K, Ito K-I, et al. *In vivo* imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress. *Neuroscience Research*. 1999;34(2):103–113. DOI: 10.1016/S0168-0102(99)00040-1.
34. Van Wijk R, Bosman S, Ackerman J, Van Wijk EPA. Correlation between fluctuations in human ultra-weak photon emission and EEG alpha rhythm. *NeuroQuantology*. 2008;6(4):452–463.
35. Bischof M. Biophotons – the light in our cells. *Journal of Optometric Phototherapy*. 2005:1–5.
36. Dillard CJ, Dumelin EE, Tappel AL. Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. *Lipids*. 1977;12(1):109–114. DOI: 10.1007/BF02532981.
37. Riely CA, Cohen G, Lieberman M. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science*. 1974;183(4121):208–210. DOI: 10.1126/science.183.4121.208.
38. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 1979;59(3):527–605. DOI: 10.1152/physrev.1979.59.3.527.
39. Kramer JH, Arroyo CM, Dickens BF, Weglicki WB. Spin-trapping evidence that graded myocardial ischemia alters post-ischemic superoxide production. *Free Radical Biology and Medicine*. 1987;3(2):153–159. DOI: 10.1016/S0891-5849(87)80011-4.
40. Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circulation Research*. 1987;61(5):757–760. DOI: 10.1161/01.RES.61.5.757.
41. Sies H. Chapter 13. Oxidative stress: eustress and distress in redox homeostasis. In: Fink G, editor. *Stress: physiology, biochemistry, and pathology*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 153–163 (Handbook of stress; volume 3). DOI: 10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.
42. Gagné F. Chapter 6. Oxidative stress. In: *Biochemical ecotoxicology: principles and methods*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 103–115. DOI: 10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4.
43. O'Brien PJ. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 1991;80(1):1–41. DOI: 10.1016/0009-2797(91)90029-7.

44. Moore GA, Rossi L, Nicotera P, Orrenius S, O'Brien PJ. Quinone toxicity in hepatocytes: studies on mitochondrial Ca^{2+} release induced by benzoquinone derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1987;259(2):283–295. DOI: 10.1016/0003-9861(87)90495-4.
45. Sławiński J. Luminescence research and its relation to ultraweak cell radiation. *Experientia*. 1988;44(7):559–571. DOI: 10.1007/BF01953303.
46. Chwirut BW. Ultraweak luminescence studies of microsporogenesis in larch. In: Popp FA, Li KH, Gu Q, editors. *Recent advances in biophoton research and its applications*. Singapore: World Scientific; 1992. p. 259–285. DOI: 10.1142/9789814439671_0010.
47. Bókkon I, Salari V, Tuszyński JA, Antal I. Estimation of the number of biophotons involved in the visual perception of a single-object image: biophoton intensity can be considerably higher inside cells than outside. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010;100(3):160–166. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.06.001.
48. Thar R, Kühl M. Propagation of electromagnetic radiation in mitochondria? *Journal of Theoretical Biology*. 2004;230(2):261–270. DOI: 10.1016/j.jtbi.2004.05.021.
49. Kato M, Shinzawa K, Yoshikawa S. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria. *Photobiochemistry and Photobiophysics*. 1981;2(4–5):263–269.
50. Mazhul' VM, Shcherbin DG. Phosphorescence analysis of lipid peroxidation products in liposomes. *Biophysics*. 1999;44(4):656–661.
51. Cilento G. Photobiochemistry without light. *Experientia*. 1988;44(7):572–576. DOI: 10.1007/BF01953304.
52. Jibu M, Pribram KH, Yasue K. From conscious experience to memory storage and retrieval: the role of quantum brain dynamics and boson condensation of evanescent photons. *International Journal of Modern Physics B*. 1996;10(13–14):1735–1754. DOI: 10.1142/S0217979296000805.
53. Jibu M, Hagan S, Hameroff SR, Pribram KH, Yasue K. Quantum optical coherence in cytoskeletal microtubules: implications for brain function. *Biosystems*. 1994;32(3):195–209. DOI: 10.1016/0303-2647(94)90043-4.
54. Mavromatos NE, Mershin A, Nanopoulos DV. QED-cavity model of microtubules implies dissipationless energy transfer and biological quantum teleportation. *International Journal of Modern Physics B*. 2002;16(24):3623–3642. DOI: 10.1142/S0217979202011512.
55. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in Biochemical Sciences*. 2001;26(1):23–29. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)01735-7.
56. Tong JJ. Mitochondrial delivery is essential for synaptic potentiation. *The Biological Bulletin*. 2007;212(2):169–175. DOI: 10.2307/25066594.
57. Faber J, Portugal R, Rosa LP. Information processing in brain microtubules. *Biosystems*. 2006;83(1):1–9. DOI: 10.1016/j.biosystems.2005.06.011.
58. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 1998;391(6663):199–203. DOI: 10.1038/34465.
59. Deriu MA, Soncini M, Orsi M, Patel M, Essex JW, Montevecchi FM, et al. Anisotropic elastic network modeling of entire microtubules. *Biophysical Journal*. 2010;99(7):2190–2199. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.06.070.
60. Cifra M, Pokorný J, Havelka D, Kučera O. Electric field generated by axial longitudinal vibration modes of microtubule. *Biosystems*. 2010;100(2):122–131. DOI: 10.1016/j.biosystems.2010.02.007.
61. Tegmark M. Importance of quantum decoherence in brain processes. *Physical Review E: Covering Statistical, Nonlinear, Biological, and Soft Matter Physics*. 2000;61(4):4194–4206. DOI: 10.1103/PhysRevE.61.4194.
62. Murata T, Kadota A, Wada M. Effects of blue light on cell elongation and microtubule orientation in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Plant and Cell Physiology*. 1997;38(2):201–209. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029153.
63. Bat'yanov AP. Distant-optical interaction of mitochondria through quartz. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1984;97(6):740–742. DOI: 10.1007/BF00804160.
64. Hideg E, Kobayashi M, Inaba H. Spontaneous ultraweak light emission from respiring spinach leaf mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1991;1098(1):27–31. DOI: 10.1016/0005-2728(91)90005-9.
65. Vladimirov YuA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Moscow)*. 2009;74(13):1545–1566. DOI: 10.1134/s0006297909130082.
66. Schindl M, Kerschman K, Schindl A, Schön H, Heinzl H, Schindl L. Induction of complete wound healing in recalcitrant ulcers by low-intensity laser irradiation depends on ulcer cause and size. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 1999;15(1):18–21. DOI: 10.1111/j.1600-0781.1999.tb00047.x.
67. Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*. 2001;19(6):305–314. DOI: 10.1089/104454701753342758.
68. Brosseau L, Welch V, Wells G, Tugwell P, de Bie R, Gam A, et al. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *The Journal of Rheumatology*. 2000;27(8):1961–1969.
69. Oron A, Oron U, Chen J, Eilam A, Zhang C, Sadeh M, et al. Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke*. 2006;37(10):2620–2624. DOI: 10.1161/01.STR.0000242775.14642.b8.
70. Oron A, Oron U, Streeter J, De Taboada L, Alexandrovich A, Trembovler V, et al. Low-level laser therapy applied transcranially to mice following traumatic brain injury significantly reduces long-term neurological deficits. *Journal of Neurotrauma*. 2007;24(4):651–656. DOI: 10.1089/neu.2006.0198.
71. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He – Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1995;27(3):219–223. DOI: 10.1016/1011-1344(94)07078-3.
72. Eells JT, Wong-Riley MTT, VerHoeve J, Henry M, Buchman EV, Kane MP, et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*. 2004;4(5–6):559–567. DOI: 10.1016/j.mito.2004.07.033.
73. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2004;80(2):366–372. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2004.tb00097.x.
74. El Sayed SO, Dyson M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1996;19(4):433–437. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9101(1996)19:4<433::AID-LSM8>3.0.CO;2-T.
75. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1989;9(5):497–505. DOI: 10.1002/lsm.1900090513.

76. Agaiby AD, Ghali LR, Wilson R, Dyson M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2000;26(4):357–363. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9101(2000)26:4<357::AID-LSM3>3.0.CO;2-O.
77. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005;81(2):98–106. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2005.07.002.
78. Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008;26(4):323–328. DOI: 10.1089/pho.2007.2184.
79. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(4):775–794. DOI: 10.1016/0891-5849(94)00198-S.
80. Trushin MV. The possible role of electromagnetic fields in bacterial communication. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2003;36(3):153–160.
81. Fels D. Endogenous physical regulation of population density in the freshwater protozoan *Paramecium caudatum*. *Scientific Reports*. 2017;7(1):13800. DOI: 10.1038/s41598-017-14231-0.
82. Farhadi A, Forsyth C, Banan A, Shaikh M, Engen P, Fields JZ, et al. Evidence for non-chemical, non-electrical intercellular signaling in intestinal epithelial cells. *Bioelectrochemistry*. 2007;71(2):142–148. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2007.03.001.
83. Potapovich A, Kostyuk V. Cell cell death communication by signals passing through non-aqueous environments. *Results in Chemistry*. 2021;3:100107. DOI: 10.1016/j.rechem.2021.100107.
84. Miller RA, Webb B. Embryonic holography: an application of the holographic concept of reality. *DNA Decipher Journal* [Internet]. 2012 [cited 2021 November 15];2(2). Available from: <https://dnadecipher.com/index.php/ddj/article/view/26>.
85. Savelev I, Myakishev-Rempel M. Possible traces of resonance signaling in the genome. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2020;151:23–31. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2019.11.010.

Получена 08.12.2021 / исправлена 21.12.2021 / принята 21.12.2021.
Received 08.12.2021 / revised 21.12.2021 / accepted 21.12.2021.

КАТАЛАЗА КЛЕТКИ: СТРОЕНИЕ, БИОГЕНЕЗ, МНОГООБРАЗИЕ, ФУНКЦИИ

Т. Л. АЛАДЬЕВА¹⁾, С. М. ЗИМАТКИН¹⁾

¹⁾Гродненский государственный медицинский университет,
ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Беларусь

Каталаза – важный антиоксидантный фермент, который разрушает пероксид водорода, образующийся в результате нормального метаболизма клетки, до воды и кислорода, предупреждая перекисное окисление липидов мембран и повреждение клетки. В настоящем обзоре анализируется и обобщается информация об истории открытия, строении, биогенезе, полиморфизме и биологических функциях каталазы клеток.

Ключевые слова: каталаза клетки; пероксид водорода; окислительный стресс.

CELLULAR CATALASE: STRUCTURE, BIOGENESIS, DIVERSITY, FUNCTIONS

T. L. ALADYEVA^a, S. M. ZIMATKIN^a

^aGrodno State Medical University, 80 Horkaha Street, Hrodna 230009, Belarus
Corresponding author: T. L. Aladyeva (aladyevatl@mail.ru)

Catalase is an important antioxidant enzyme that destroys hydrogen peroxide formed in a result of normal cell metabolism, with the formation of water and oxygen, preventing lipid peroxidation of membranes and cell damage. This review analyses and summarises information about the history of discovery, structure, biogenesis, polymorphism and biological functions of cellular catalase.

Keywords: cellular catalase; hydrogen peroxide; oxidative stress.

Введение

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз. Она катализирует гетеролитическое расщепление O—O-связи в пероксиде водорода (H₂O₂) с образованием молекулярного кислорода и воды [1] и является одним из основных ферментов, предотвращающих накопление пероксида водорода в клетке [2]. Это особенно важно в связи с тем, что в результате действия H₂O₂ мембранные липиды подвергаются перекисному окислению, которое повреждает структуру мембран и нарушает их функции. При этом образуются высокореактивные гидроксильные радикалы, вызывающие дальнейшее повреждение и гибель клетки [3].

Образец цитирования:

Аладьева ТЛ, Зиматкин СМ. Каталаза клетки: строение, биогенез, многообразие, функции. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:12–22.

For citation:

Aladyeva TL, Zimatkin SM. Cellular catalase: structure, biogenesis, diversity, functions. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:12–22. Russian.

Авторы:

Татьяна Леонидовна Аладьева – ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии педиатрического факультета.

Сергей Михайлович Зиматкин – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии педиатрического факультета.

Authors:

Tatyana L. Aladyeva, assistant at the department of histology, cytology and embryology, faculty of pediatrics.

aladyevatl@mail.ru

Sergey M. Zimatkin, doctor of science (biology), full professor; head of the department of histology, cytology and embryology, faculty of pediatrics.

smzimatkin@mail.ru

Исследования каталазы имеют давнюю историю [4]. В 1818 г. Л. Ж. Тенар и Ж. Л. Гей-Люссак открыли пероксид водорода, а позже Л. Ж. Тенар заметил, что ткани животных и растений его разлагают. Вещество, ответственное за эту реакцию, в 1900 г. О. Лоу назвал каталазой [5], высказав предположение, что нет ни одного растения или животного, которые существовали бы без данного фермента [6]. Известно, что даже некоторые анаэробные бактерии содержат каталазу [7]. Ген каталазы человека был выделен и охарактеризован в 1986 г. Он расположен на хромосоме 11, полосе p13 и разделен на 13 экзонов 12 интронами и промежутками [8; 9].

Каталаза – это фермент с очень высокой каталитической активностью [10–12]. При этом скорость реакции лимитируется лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру каталазы [12; 13]. Фермент сохраняет высокую каталитическую активность в широком диапазоне pH (5,0–10,5), он термостабилен и устойчив к действию органических растворителей (спирт, ксилол, ацетон и др.) [14].

Каталаза содержится преимущественно в пероксисомах (концентрация – до 10^{-6} моль/л) [15], в меньшей степени в митохондриях [16; 17] и микросомах [18] всех типов про- и эукариотических аэробных клеток, но, в отличие от других ферментов антиоксидантной системы, не требует восстановителя для протекания реакции [19].

Широкое распространение, фундаментальное значение каталазы в живой природе и важные прикладные аспекты ее функций в организме определяют необходимость дальнейшего исследования этого фермента.

Строение каталазы

Каталаза представляет собой гомотетрамёрный белок с молекулярной массой 240 кДа [20], который содержит четыре гема (в составе каталазы присутствует 0,09 % железа, по одному атому железа приходится на один мономер фермента) [21] с молекулярной симметрией 222 (по системе Германа – Могена). Каждая субъединица включает 527 аминокислотных остатков, один гем, а именно протопорфирин IX железа(III), и прочно связанную молекулу НАДФН [6; 22; 23].

Субъединица каталазы разделена на четыре домена: N-концевое нитевидное плечо (содержит дистальный гистидин – незаменимую аминокислоту для каталазной реакции); C-концевые спирали; оборачивающую петлю; β -баррель [20; 24]. β -Нити расположены антипараллельно и формируют линейный β -лист (β -складчатый лист), при этом первая и последняя нити взаимодействуют в месте соединения, образуя классическую бочкообразную форму, от которой происходит их название – β -баррель (β -бочонок) [25]. Каждая субъединица имеет гидрофобное ядро, включающее β -баррель из восьми переплетенных антипараллельных β -нитей ($\beta 1$ – $\beta 8$), окруженный α -спиралями [24]. Между нитями $\beta 1$ – $\beta 4$ расположен гем, нити $\beta 5$ – $\beta 8$ принимают участие в создании кармана, связывающего НАДФН. N-концевое нитевидное плечо субъединицы (остатки 5–70) соединяет две субъединицы через длинную оборачивающую петлю (остатки 380–438). На одной из граней β -баррелей спиральная область состоит из четырех C-концевых спиралей (рис. 1) [26].

Вода заполняет промежутки между данными четырьмя доменами субъединицы и между субъединицами внутри тетрамера (как в любом гидрофильном белке), но в каталазе есть гидрофобный β -баррель и область в непосредственной близости от активного центра, которые практически не имеют структурных молекул воды [21]. Помимо гема, активная часть фермента содержит по одной прочно связанной молекуле НАДФН в каждой субъединице [6; 27]. Механизм сборки этой сложной конструкции пока остается неизвестным [1; 28].

Биогенез каталазы млекопитающих

Клеточные механизмы, влияющие на биогенез каталазы, до настоящего времени не совсем ясны. Ранее сообщалось о наличии апокаталазы (промежуточного продукта созревания каталазы) [29; 30], при этом недостаток гема может увеличивать пул апокаталазы и способствовать ее обороту [31; 32].

Первоначально считалось, что каталаза в основном является пероксисомным белком, но последующие исследования показали также значительный цитозольный пул [29; 33].

Для пероксисомной транслокации каталазы требуется челночный рецептор (PEX5), который взаимодействует только с мономерной каталазой. Следует отметить, что PEX5 функционирует как растворимый рецептор, распознающий белки в цитозоле и способствующий их перемещению через мембрану внутрь пероксисом [34]. Это взаимодействие ингибирует тетрамеризацию каталазы в цитозоле, так как тетрамеризация – пероксисомное явление. Однако некоторые зарубежные исследователи сообщают, что цитозольная сборка каталазы может происходить независимо от пероксисом: ферментативно активные тетрамерные комплексы образуются и в цитозоле (рис. 2) [35]. М. Уэда и его соавторы в результате проведения анализа белковой структуры каталазы бычьей печени выявили, что N-концевой участок каталазы важен для полной сборки белка в активный тетрамер, а консервативная спираль $\alpha 2$ необходима не только для сборки тетрамера, но и для связывания гема [36].

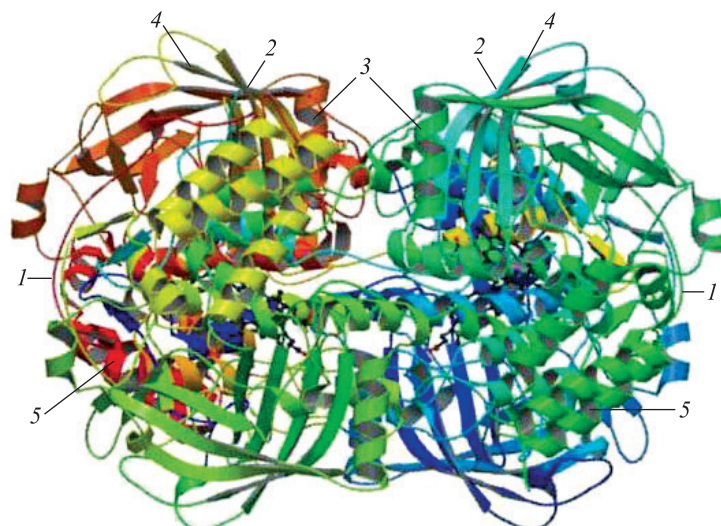


Рис. 1. Кристаллическая структура молекулы каталазы эритроцита человека:
1 – N-концевое нитевидное плечо; 2 – β -баррель; 3 – C-концевая спираль;
4 – β -нить β -барреля; 5 – α -спираль.
Источник: [24]

Fig. 1. Crystal structure of the human erythrocyte catalase molecule:
1 – N-terminal filamentous arm; 2 – β -barrel; 3 – C-terminal spiral;
4 – β -thread of β -barrel; 5 – α -spiral.
Source: [24]

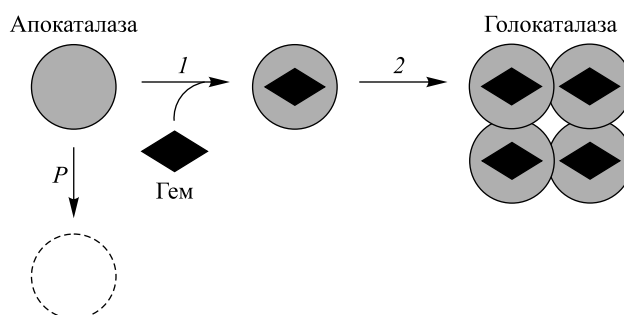


Рис. 2. Сборка каталазы из апопротеина и гема
Fig. 2. Assembly of catalase from apoprotein and heme

Порядок событий в процессе биогенеза каталазы: шаг 1 – связывание гема с частично свернутой мономерной апокаталазой; шаг 2 – олигомеризация гемилированных субъединиц с образованием ферментативно активного тетрамера. В отсутствие гема апокаталаза разрушается протеазами (стадия *P*) (см. рис. 2) [32].

Каталаза в различных живых системах может встречаться в виде олигомера высокого порядка, димера или мономера [37; 38]. В некоторых случаях также было выявлено, что димерная каталаза активна. Однако известно, что апокаталаза не является ни активной, ни тетрамерной по структуре [26; 39].

Регуляция экспрессии генов каталазы

Структура гена каталазы человека была впервые определена Ф. Куаном [8]. В гене каталазы идентифицированы несколько однонуклеотидных полиморфизмов, из которых наиболее широко изучен полиморфизм rs1001179 (C262T) [40; 41]. Полиморфизм C262T кодируется в промоторной области и влияет на регуляцию транскрипции и сплайсинга [42]. По сравнению с аллелем варианта С аллель варианта Т полиморфизма C262T указывает на более низкую активность фермента и повышает содержание активных форм кислорода (АФК) [43].

Экспрессия генов каталазы регулируется на уровне транскрипции [44; 45] активированным пролифератором пероксисом рецептором γ (PPAR γ) [46; 47]. Известно, что PPAR γ – это активируемый лигандом транскрипционный фактор, который контролирует экспрессию гена каталазы непосредственно через

PPAR γ -связывающие элементы в его промоторной области. Лиганды PPAR γ , которыми в основном являются тиазолидиндионы (сиглитазон, росиглитазон, пиоглитазон), повышают количество мРНК и активность каталазы [48; 49]. Целевым геном для PPAR γ выступает ген каталазы [50].

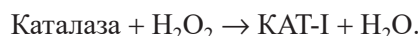
При длительном воздействии АФК снижают экспрессию каталазы путем гиперметилования CpG-сайтов в промоторе гена каталазы. Причем АФК регулируют каталазу не только по прямому механизму, но и через транскрипционный активатор Oct-1 [51].

Также регуляция каталазы может осуществляться белком p53 (опухолевый супрессор). При повреждении ДНК он активирует несколько генов, обуславливающих повышенное образование АФК, что способствует индукции апоптоза в клетках с поврежденной ДНК, не подлежащей репарации [52]. Белок p53 и его мишени – p53-индуцибельная рибонуклеотидредуктаза (p53R2) и p53-индуцибельный ген 3 (*PIG3*) – взаимодействуют с каталазой для эффективной регуляции внутриклеточных АФК в зависимости от интенсивности окислительного стресса. В физиологических условиях антиоксидантные функции белка p53 опосредуются рибонуклеотидредуктазой p53R2, которая поддерживает повышенную активность каталазы и тем самым защищает клетку от эндогенных АФК [53].

Ряд исследований показали, что экспрессия генов каталазы может быть стимулирована H₂O₂ [54; 55] или окисленными липидами [56].

Каталитические реакции с участием каталазы

Ферментативная реакция, приводящая к разрушению H₂O₂, происходит в два этапа. Первый этап включает окисление железа гема с использованием H₂O₂ в качестве субстрата с образованием соединения I каталазы (КАТ-I):

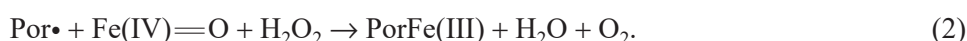


На втором этапе другая молекула H₂O₂ выступает донором электрона (восстановление соединения I):



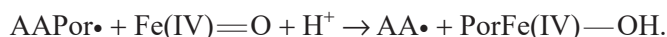
Таким образом, соединение I каталазы выполняет согласованное двухэлектронное окисление второй молекулы H₂O₂ и возвращается в исходное состояние фермента [57; 58].

Соединение I каталазы представляет собой π -катионный радикал оксоирона(IV) порфирина (Por $\cdot$ + Fe(IV)=O) – двухэлектронного продукта окисления группы гема [59], который восстанавливается обратно в фермент с трехвалентным железом второй молекулой пероксида водорода с выделением молекулярного кислорода и воды:



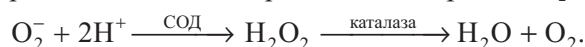
Таким образом, в каталазном цикле H₂O₂ действует как окислитель (реакция (1)) и восстановитель (реакция (2)).

Соединение I также может подвергаться внутримолекулярному одноэлектронному восстановлению, что приводит к образованию альтернативного соединения I, которое каталитически неактивно:



Здесь белковая часть (AA) отдает электрон, который гасит радикал порфирина. Данная реакция отвечает за снижение активности каталазы со временем, поскольку образовавшийся промежуточный продукт очень медленно возвращается к изначальному состоянию фермента. НАДФН при связывании с некоторыми разновидностями монофункциональных каталаз выступает донором двух электронов для перехода AAPor $\cdot$ + Fe(IV)=OH обратно в железо каталазы [60].

Каталаза в пероксисомах клетки объединена в функциональном комплексе с ферментом супероксиддисмутазой (СОД), их кооперативное действие представлено в реакции [61]



Многообразие форм каталазы в живой природе

В настоящее время известны более 300 аминокислотных последовательностей каталазы, которые подразделяются на монофункциональные каталазы (свыше 225 последовательностей), бифункциональные каталазы-пероксидазы (более 50) и марганецсодержащие каталазы (более 25). Биохимические и физиологические исследования каталаз различных организмов выявили широкий спектр их каталитической активности, несмотря на схожую аминокислотную последовательность [10].

Каталазы развивались в организмах по трем филогенетическим направлениям. Из них два основных направления – гемовые ферменты с высокой каталитической активностью, но большими различиями в структурах активного центра, а также третичных и четвертичных структурах, такие как монофункциональные (типичные) каталазы [31] и бифункциональные каталазы-пероксидазы. Третье направление – второстепенные негемовые марганецсодержащие каталазы. Изначально марганецсодержащие каталазы назывались псевдокаталазами, они присутствуют только в бактериях [62; 63].

Монофункциональные каталазы (к которым относят каталазу млекопитающих) в основном выделяют из клеток животных, растений, грибов и бактерий. Молекулярные свойства каталаз этой группы сходны: они образованы четырьмя равными по размеру субъединицами, содержащими 2,5–4,0 протогема IX на тетрамер, с молекулярной массой 225–270 кДа [39]. Отдельные белковые мономеры фермента не обладают активностью по разложению пероксидов. По размеру субъединиц эту группу можно подразделить на каталазы с малыми (55–69 кДа) и крупными (75–84 кДа) субъединицами. Помимо размера, существует различие и в простетической группе гема. В ферментах с малыми субъединицами присутствует гем В (например, каталаза печени крупного рогатого скота), а в ферментах с большой субъединицей – гем D (например, каталаза кишечной палочки). Каждый мономер каталазы содержит один гем [64].

Филогенез каталазы

Филогенетический анализ, основанный на аминокислотной последовательности монофункциональной каталазы, выявил четкое подразделение фермента на три клады [65].

Каталазы клады 1 обладают малыми субъединицами (55–69 кДа) и содержат гем В в качестве простетической группы. Преимущественно они имеют растительное происхождение. Также их содержат непатогенные или условно-патогенные бактерии, широко распространенные в природе, такие как *Pseudomonas*.

Каталазы клады 2 представляют собой ферменты с крупными субъединицами (75–84 кДа), гемом D в качестве простетической группы и дополнительным флаводоксинаподобным доменом. Их включают бактерии и грибы [66].

Каталазы клады 3 имеют субъединицы размером 43–75 кДа, содержат гем В и НАДФН в качестве второго редокс-активного кофактора. Они есть у бактерий, архей, а также грибов и других эукариот. К этой разновидности каталаз относятся важные с научной и медицинской точек зрения каталазы эритроцитов человека и печени крупного рогатого скота [7; 24; 67].

В эволюционном развитии организмов каталаза была одним из первых возникших ферментов антиоксидантной защиты [66; 68].

Каталаза в организме человека и млекопитающих

Каталаза является широко распространенным ферментом у млекопитающих и содержится в различных органах, где ее активность значительно варьирует. Так, максимальная активность каталазы наблюдается в печени и эритроцитах, относительно высокая – в почках и жировой ткани, промежуточная – в легких и поджелудочной железе, очень низкая – в сердце и головном мозге [19; 39; 69]. У человека каталаза отсутствует в гладкомышечных клетках сосудов и эндотелиальных клетках. Ее активность также была выявлена в человеческом молоке (в 10 раз превышает таковую в коровьем молоке) [70].

Каталаза эритроцитов защищает гемоглобин путем удаления более половины пероксида водорода, образующегося в нормальных эритроцитах человека, которые подвергаются воздействию значительных концентраций кислорода. Также каталаза эритроцитов защищает гетерологичные соматические клетки от воздействия высоких уровней экзогенного H_2O_2 , например, в зонах воспаления [71; 72]. При отсутствии каталазы в эритроцитах гемоглобин окисляется H_2O_2 до метгемоглобина (т. е. $PorFe(III)$), а затем до оксоирона(IV) ($Por\bullet + Fe(IV)=O$) с радикалами на основе белка. Как следствие, наблюдаются гемолиз эритроцитов, полимеризация гемоглобина и агрегация поврежденных эритроцитов [73].

Каталаза предохраняет β -клетки поджелудочной железы от повреждения H_2O_2 [74]. Было высказано предположение, что дефицит каталазы и окислительное повреждение способствуют развитию диабета [75; 76].

В отличие от печени, где окисление алкоголя осуществляется преимущественно алкогольдегидрогеназой, в головном мозге основным этанолюкисляющим ферментом является каталаза [77; 78]. В головном мозге каталаза окисляет этанол до ацетальдегида, который опосредует действие алкоголя в мозге и участвует в патогенезе алкоголизма [77; 78]. Введение крысам ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола снижает добровольное потребление этанола [79].

По количеству и динамике активности каталазы можно косвенно судить о состоянии организма, степени оксидативного стресса и уровне эндогенной интоксикации, которые являются следствием патологических процессов [80]. Каталаза активно исследуется из-за предполагаемого ее влияния на продолжительность жизни, вероятно, за счет снижения окислительного стресса [81].

С. Е. Шрайнер и другие ученые в целях определения значения АФК для продолжительности жизни млекопитающих создали трансгенных мышей (МСАТ), которые сверхэкспрессируют каталазу человека, локализованную в пероксисомах, ядре или митохондриях. Максимальная продолжительность жизни мышей МСАТ была увеличена в среднем на 5,5 месяца. При этом сердечная патология и развитие катаракты были заторможены, продукция H_2O_2 и индуцированная H_2O_2 инактивация аконитазы ослаблены, а развитие митохондриальных делеций и окислительное повреждение уменьшены [82].

Заключение

Таким образом, каталаза – древнейший и широко распространенный в живой природе фермент, важнейшее значение которого заключается в участии в антиокислительной защите клеток и поддержании клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза. Кроме того, каталаза выступает маркером важных органелл клетки – пероксисом, которые преимущественно и являются носителями этого фермента.

Библиографические ссылки

1. Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalase: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1999;72(1):19–66. DOI: 10.1016/S0079-6107(98)00058-3.
2. Switala J, Loewen PC. Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;401(2):145–154. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00049-8.
3. Mahaseth T, Kuzminov A. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: from catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. 2017;773:274–281. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.08.006.
4. Góth L. A kataláz kutatás kétszáz éve, 1818–2018. *Orvosi Hetilap*. 2018;159(24):959–964. DOI: 10.1556/650.2018.31096.
5. Loew O. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*. 1900;11(279):701–702. DOI: 10.1126/science.11.279.701.
6. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007;32(1):44–50. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.11.003.
7. Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008;10(9):1527–1548. DOI: 10.1089/ars.2008.2046.
8. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research*. 1986;14(13):5321–5335. DOI: 10.1093/nar/14.13.5321.
9. Zhengwen Jiang, Akey JM, Jinxiu Shi, Momiao Xiong, Ying Wang, Yayun Shen, et al. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Human Genetics*. 2001;109(1):95–98. DOI: 10.1007/s004390100553.
10. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61(2):192–208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
11. Половинкина ЕО, Сеницына ЮВ. Окислительный стресс и особенности воздействия слабых стрессоров физической природы на перекисный гомеостаз растительной клетки. Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского; 2010. 62 с.
12. Lledias F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(17):10630–10637. DOI: 10.1074/jbc.273.17.10630.
13. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(2):219–236.
14. Мирошниченко ОС. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы. *Биополимеры и клетка*. 1992;8(6):3–25. DOI: 10.7124/bc.00033C.
15. Loewen PC, Switala J, Triggs-Raine BL. Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985;243(1):144–149. DOI: 10.1016/0003-9861(85)90782-9.
16. Xia Li, May JM. Catalase-dependent measurement of H_2O_2 in intact mitochondria. *Mitochondrion*. 2002;1(5):447–453. DOI: 10.1016/S1567-7249(02)00010-7.
17. Dogar I, Dixon S, Gill R, Young A, Mallay S, Oldford C, et al. C57BL/6J mice upregulate catalase to maintain the hydrogen peroxide buffering capacity of liver mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020;146:59–69. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.409.
18. Komatsu T, Yamazaki H, Nakajima M, Yokoi T. Identification of catalase in human livers as a factor that enhances phenytoin dihydroxy metabolite formation by human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*. 2002;63(12):2081–2090. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01024-9.
19. Меньщикова ЕБ, Ланкин ВЗ, Зенков НК, Бондарь ИА, Круговых НФ, Труфакин ВА. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. Москва: Слово; 2006. 556 с.
20. Håkansson KO, Brugna M, Tasse L. The three-dimensional structure of catalase from *Enterococcus faecalis*. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2004;60(8):1374–1380. DOI: 10.1107/S0907444904012004.
21. Ko T-P, Safo MK, Musayev FN, Di Salvo ML, Wang C, Wu S-H, et al. Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2000;56(2):241–245. DOI: 10.1107/S0907444999015930.
22. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(14):4343–4347. DOI: 10.1073/pnas.81.14.4343.

23. Safo MK, Musayev FN, Wu S-H, Abraham DJ, Ko T-P. Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2001;57(1):1–7. DOI: 10.1107/s0907444900013767.
24. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 2000;296(1):295–309. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3458.
25. Noinaj N, Gumbart JC, Buchanan SK. The β -barrel assembly machinery in motion. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(4):197–204. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.191.
26. Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell*. 2010;1(10):888–897. DOI: 10.1007/s13238-010-0113-z.
27. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH: kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(20):13908–13914. DOI: 10.1074/jbc.274.20.13908.
28. Nicholls P, Fita I, Loewen PC. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*. 2000;51:51–106. DOI: 10.1016/S0898-8838(00)51001-0.
29. Sugita Y, Higashi T. Biosynthesis of liver catalase in rats treated with allylisopropylacetylcarbamide. III. Occurrence of a possible precursor to catalase. *The Journal of Biochemistry*. 1981;89(4):999–1004. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133325.
30. Sugita Y, Tobe T, Sakamoto T, Higashi T. Immature precursor catalase in subcellular fractions of rat liver. *The Journal of Biochemistry*. 1982;92(2):509–515. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133958.
31. Eising R, Süselbeck B. Turnover of catalase heme and apoprotein moieties in cotyledons of sunflower seedlings. *Plant Physiology*. 1991;97(4):1422–1429. DOI: 10.1104/pp.97.4.1422.
32. Baureder M, Barane E, Hederstedt L. *In vitro* assembly of catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(41):28411–28420. DOI: 10.1074/jbc.M114.596148.
33. Yamamoto K, Völkl A, Hashimoto T, Fahimi HD. Catalase in guinea pig hepatocytes is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes. *European Journal of Cell Biology*. 1988;46(1):129–135.
34. Freitas MO, Francisco T, Rodrigues TA, Alencastre IS, Pinto MP, Grou CP, et al. PEX5 protein binds monomeric catalase blocking its tetramerization and releases it upon binding the N-terminal domain of PEX14. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(47):40509–40519. DOI: 10.1074/jbc.M111.287201.
35. Wanders RJA, Kos M, Roest B, Meijer AJ, Schrakamp G, Heymans HSA, et al. Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123(3):1054–1061. DOI: 10.1016/s0006-291x(84)80240-5.
36. Ueda M, Kinoshita H, Maeda S-I, Zou W, Tanaka A. Structure-function study of the amino-terminal stretch of the catalase subunit molecule in oligomerization, heme binding, and activity expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;61(5–6):488–494. DOI: 10.1007/s00253-003-1251-5.
37. Middelkoop E, Wiemer EAC, Schoenmaker DET, Strijland A, Tager JM. Topology of catalase assembly in human skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 1993;1220(1):15–20. DOI: 10.1016/0167-4889(93)90091-3.
38. Kawada Y, Khan M, Sharma AK, Ratnayake DB, Dobashi K, Asayama K, et al. Inhibition of peroxisomal functions due to oxidative imbalance induced by mistargeting of catalase to cytoplasm is restored by vitamin E treatment in skin fibroblasts from Zellweger syndrome-like patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004;83(4):297–305. DOI: 10.1016/j.ymgme.2004.07.012.
39. Prakash K, Prajapati S, Ahmad A, Jain SK, Bhakuni V. Unique oligomeric intermediates of bovine liver catalase. *Protein Science*. 2002;11(1):46–57. DOI: 10.1110/ps.20102.
40. Castaldo SA, da Silva AP, Matos A, Inácio Â, Bicho M, Medeiros R, et al. The role of CYBA (p22phox) and catalase genetic polymorphisms and their possible epistatic interaction in cervical cancer. *Tumor Biology: Tumor Markers, Tumor Targeting and Translational Cancer Research*. 2015;36(2):909–914. DOI: 10.1007/s13277-014-2714-2.
41. Song Su, Kai He, Jing Li, Jiali Wu, Mengyu Zhang, Chunhong Feng, et al. Genetic polymorphisms in antioxidant enzyme genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese population: a case-control study. *Tumor Biology: Tumor Markers, Tumor Targeting and Translational Cancer Research*. 2015;36(6):4627–4632. DOI: 10.1007/s13277-015-3110-2.
42. Forsberg L, Lyrenäs L, Morgenstern R, de Faire U. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001;30(5):500–505. DOI: 10.1016/s0891-5849(00)00487-1.
43. Ahn J, Nowell S, McCann SE, Yu J, Carter L, Lang NP, et al. Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006;15(6):1217–1222. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0104.
44. Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1992;12(6):2525–2533. DOI: 10.1128/mcb.12.6.2525-2533.1992.
45. Weigel AL, Handa JT, Hjelmeland LM. Microarray analysis of H₂O₂-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002;33(10):1419–1432. DOI: 10.1016/s0891-5849(02)01082-1.
46. Okuno Y, Matsuda M, Miyata Y, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M, et al. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endocrine Journal*. 2010;57(4):303–309. DOI: 10.1507/Endocrj.K09e-113.
47. Weiwei Yang, Jia Zhang, Haiya Wang, Weili Shen, Pingjin Gao, Manpreet Singh, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ regulates angiotensin II-induced catalase downregulation in adventitial fibroblasts of rats. *FEBS Letters*. 2011;585(5):761–766. DOI: 10.1016/J.Febslet.2011.01.040.
48. Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins MEC. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Molecular Endocrinology*. 2002;16(12):2793–2801. DOI: 10.1210/me.2002-0020.
49. Okuno Y, Matsuda M, Kobayashi H, Morita K, Suzuki E, Fukuhara A, et al. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR γ -responsive region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;366(3):698–704. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.12.001.
50. Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, et al. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor γ activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology*. 2001;142(3):1269–1277. DOI: 10.1210/endo.142.3.8037.
51. Xiaoyuan Quan, Seung-Oe Lim, Guhung Jung. Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG island in the Oct-1 promoter. *FEBS Letters*. 2011;585(21):3436–3441. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.09.035.

52. Gang Liu, Xinbin Chen. The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(47):7195–7204. DOI: 10.1038/sj.onc.1205862.
53. Kang MY, Kim H-B, Piao C, Lee KH, Hyun JW, Chang I-Y, et al. The critical role of catalase in prooxidant and antioxidant function of p53. *Cell Death & Differentiation*. 2013;20(1):117–129. DOI: 10.1038/cdd.2012.102.
54. Lai C-C, Peng M, Huang L, Huang W-H, Chiu TH. Chronic exposure of neonatal cardiac myocytes to hydrogen peroxide enhances the expression of catalase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1996;28(5):1157–1163. DOI: 10.1006/jmcc.1996.0106.
55. Haque R, Chun E, Howell JC, Sengupta T, Chen D, Kim H. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e42542. DOI: 10.1371/journal.pone.0042542.
56. Meilhac O, Zhou M, Santanam N, Parthasarathy S. Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *Journal of Lipid Research*. 2000;41(8):1205–1213.
57. Kremer ML. Decomposition of hydrogen peroxide by haemin. Dependence of the reaction velocity on pH. *Transactions of the Faraday Society*. 1965;61:1453–1458. DOI: 10.1039/TF9656101453.
58. Du P, Loew GH. Theoretical study of model compound I complexes of horseradish peroxidase and catalase. *Biophysical Journal*. 1995;68(1):69–80. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80160-8.
59. Krych J, Gebicki JL, Gebicka L. Flavonoid-induced conversion of catalase to its inactive form – compound II. *Free Radical Research*. 2014;48(11):1334–1341. DOI: 10.3109/10715762.2014.953139.
60. Fita I, Rossmann MG. The active center of catalase. *Journal of Molecular Biology*. 1985;185(1):21–37. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90180-9.
61. Карбышев МС, Абдуллаев ШП, составители. Биохимия оксидативного стресса. Шестопалов АВ, редактор. Москва: Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова; 2018. 60 с.
62. Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, et al. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*. 2007;68(12):1605–1611. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.04.005.
63. Tondo ML, Petrocelli S, Ottado J, Orellano EG. The monofunctional catalase katE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. *PLoS One*. 2010;5(5):e10803. DOI: 10.1371/journal.pone.0010803.
64. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews*. 1970;50(3):319–375. DOI: 10.1152/Physrev.1970.50.3.319.
65. Klotz MG, Loewen PC. The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Molecular Biology and Evolution*. 2003;20(7):1098–1112. DOI: 10.1093/molbev/msg129.
66. Абросимова ТН, Андреева ИВ, Виноградов АА. Активность каталазы при экспериментальном циррозе печени. *Вісник Луцького національного університету імені Тараса Шевченка. Медико-біологічні науки*. 2008;20:5–7.
67. Ichise N, Hirota K, Ichihashi D, Nodasaka Y, Morita N, Okuyama H, et al. H₂O₂ tolerance of *Vibrio rumoiensis* S-1^T is attributable to the cellular catalase activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008;106(1):39–45. DOI: 10.1263/jbb.106.39.
68. Андреева ИВ. Структурные изменения в печени при портальной гипертензии разной этиологии и их влияние на активность каталазы сыворотки крови. В: Германов ВТ, редактор. *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики*. Випуск 12. Київ: [б. в.]; 2005. с. 302–307.
69. Капитонов ВМ, Остапченко ДА. «Окислительный стресс» и его коррекция у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2010;6(4):70–75.
70. Friel JK, Martin SM, Langdon M, Herzberg GR, Buettner GR. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatric Research*. 2002;51(5):612–618. DOI: 10.1203/00006450-200205000-00012.
71. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*. 1989;73(1):334–339. DOI: 10.1182/blood.V73.1.334.334.
72. Ye-Shih Ho, Ye Xiong, Wanchao Ma, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(31):32804–32812. DOI: 10.1074/jbc.M404800200.
73. Masuoka N, Sugiyama H, Ishibashi N, Da-Hong Wang, Masuoka T, Kodama H, et al. Characterization of acatalasemic erythrocytes treated with low and high dose hydrogen peroxide: hemolysis and aggregation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(31):21728–21734. DOI: 10.1074/jbc.M513818200.
74. Sigfrid LA, Cunningham JM, Beechey N, Lortz S, Tiedge M, Lenzen S, et al. Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2003;31(3):509–518. DOI: 10.1677/jme.0.0310509.
75. Góth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *The Lancet*. 2000;356(9244):1820–1821. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03238-4.
76. Góth L, Rass P, Páay A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*. 2004;8(3):141–149. DOI: 10.1007/BF03260057.
77. Zimatkin SM, Liopo AV, Deitrich RA. Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1998;22(8):1623–1627. DOI: 10.1111/J.1530-0277.1998.Tb03958.X.
78. Zimatkin SM, Deitrich RA. Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology*. 1997;2(4):387–400. DOI: 10.1080/13556219772444.
79. Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain – a review. *Alcohol*. 1996;13(2):147–151. DOI: 10.1016/0741-8329(95)02026-8.
80. Павлова ОН, Гуленко ОН, Каримова РГ, Девяткин АА, Тороповский АН. Исследование динамики активности каталазы в сыворотке крови крыс при механическом воздействии на гематофтальмический барьер. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2020;5(часть 1):153–158. DOI: 10.23670/IRJ.2020.95.5.028.
81. Sugadev R, Ponnuswamy MN, Sekar K. Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;2(1):67–77.
82. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308(5730):1909–1911. DOI: 10.1126/science.1106653.

References

1. Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalase: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1999;72(1):19–66. DOI: 10.1016/S0079-6107(98)00058-3.
2. Switala J, Loewen PC. Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;401(2):145–154. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00049-8.
3. Mahaseth T, Kuzminov A. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: from catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. 2017;773:274–281. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.08.006.
4. Góth L. A katalázkutatás kétszáz éve, 1818–2018. *Orvosi Hetilap*. 2018;159(24):959–964. DOI: 10.1556/650.2018.31096.
5. Loew O. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*. 1900;11(279):701–702. DOI: 10.1126/science.11.279.701.
6. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007;32(1):44–50. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.11.003.
7. Zámocký M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008;10(9):1527–1548. DOI: 10.1089/ars.2008.2046.
8. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research*. 1986;14(13):5321–5335. DOI: 10.1093/nar/14.13.5321.
9. Zhengwen Jiang, Akey JM, Jinxiu Shi, Momiao Xiong, Ying Wang, Yayun Shen, et al. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Human Genetics*. 2001;109(1):95–98. DOI: 10.1007/s004390100553.
10. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61(2):192–208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
11. Polovinkina EO, Sinitsyna YuV. *Okislitel'nyi stress i osobennosti vozdeistviya slabykh stressorov fizicheskoi prirody na perekisnyi gomeostaz rastitel'noi kletki* [Oxidative stress and the peculiarities of the impact of weak stressors of physical nature on the peroxide homeostasis of a plant cell]. Nizhny Novgorod: Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 2010. 62 p. Russian.
12. Lledias F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(17):10630–10637. DOI: 10.1074/jbc.273.17.10630.
13. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(2):219–236.
14. Miroschnichenko OS. Biogenesis, physiological role, and properties of catalase. *Biopolimery i kletka*. 1992;8(6):3–25. Russian. DOI: 10.7124/bc.00033C.
15. Loewen PC, Switala J, Triggs-Raine BL. Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985;243(1):144–149. DOI: 10.1016/0003-9861(85)90782-9.
16. Xia Li, May JM. Catalase-dependent measurement of H₂O₂ in intact mitochondria. *Mitochondrion*. 2002;1(5):447–453. DOI: 10.1016/S1567-7249(02)00010-7.
17. Dogar I, Dixon S, Gill R, Young A, Mallay S, Oldford C, et al. C57BL/6J mice upregulate catalase to maintain the hydrogen peroxide buffering capacity of liver mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020;146:59–69. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.409.
18. Komatsu T, Yamazaki H, Nakajima M, Yokoi T. Identification of catalase in human livers as a factor that enhances phenytoin dihydroxy metabolite formation by human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*. 2002;63(12):2081–2090. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01024-9.
19. Men'shchikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK, Bondar' IA, Krugovoykh NF, Trufakin VA. *Okislitel'nyi stress. Prooksidanty i antioksidanty* [Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants]. Moscow: Slovo; 2006. 556 p. Russian.
20. Håkansson KO, Brugna M, Tasse L. The three-dimensional structure of catalase from *Enterococcus faecalis*. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2004;60(8):1374–1380. DOI: 10.1107/S0907444904012004.
21. Ko T-P, Safo MK, Musayev FN, Di Salvo ML, Wang C, Wu S-H, et al. Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2000;56(2):241–245. DOI: 10.1107/S0907444999015930.
22. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(14):4343–4347. DOI: 10.1073/pnas.81.14.4343.
23. Safo MK, Musayev FN, Wu S-H, Abraham DJ, Ko T-P. Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2001;57(1):1–7. DOI: 10.1107/S0907444900013767.
24. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 2000;296(1):295–309. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3458.
25. Noinaj N, Gumbart JC, Buchanan SK. The β -barrel assembly machinery in motion. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(4):197–204. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.191.
26. Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell*. 2010;1(10):888–897. DOI: 10.1007/s13238-010-0113-z.
27. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH: kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(20):13908–13914. DOI: 10.1074/jbc.274.20.13908.
28. Nicholls P, Fita I, Loewen PC. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*. 2000;51:51–106. DOI: 10.1016/S0898-8838(00)51001-0.
29. Sugita Y, Higashi T. Biosynthesis of liver catalase in rats treated with allylisopropylacetylcarbamide. III. Occurrence of a possible precursor to catalase. *The Journal of Biochemistry*. 1981;89(4):999–1004. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133325.
30. Sugita Y, Tobe T, Sakamoto T, Higashi T. Immature precursor catalase in subcellular fractions of rat liver. *The Journal of Biochemistry*. 1982;92(2):509–515. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133958.
31. Eising R, Süselbeck B. Turnover of catalase heme and apoprotein moieties in cotyledons of sunflower seedlings. *Plant Physiology*. 1991;97(4):1422–1429. DOI: 10.1104/pp.97.4.1422.
32. Baureder M, Barane E, Hederstedt L. *In vitro* assembly of catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(41):28411–28420. DOI: 10.1074/jbc.M114.596148.
33. Yamamoto K, Völkl A, Hashimoto T, Fahimi HD. Catalase in guinea pig hepatocytes is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes. *European Journal of Cell Biology*. 1988;46(1):129–135.
34. Freitas MO, Francisco T, Rodrigues TA, Alencastre IS, Pinto MP, Grou CP, et al. PEX5 protein binds monomeric catalase blocking its tetramerization and releases it upon binding the N-terminal domain of PEX14. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(47):40509–40519. DOI: 10.1074/jbc.M111.287201.

35. Wanders RJA, Kos M, Roest B, Meijer AJ, Schrakamp G, Heymans HSA, et al. Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123(3):1054–1061. DOI: 10.1016/s0006-291x(84)80240-5.
36. Ueda M, Kinoshita H, Maeda S-I, Zou W, Tanaka A. Structure-function study of the amino-terminal stretch of the catalase subunit molecule in oligomerization, heme binding, and activity expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;61(5–6):488–494. DOI: 10.1007/s00253-003-1251-5.
37. Middelkoop E, Wiemer EAC, Schoenmaker DET, Strijland A, Tager JM. Topology of catalase assembly in human skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 1993;1220(1):15–20. DOI: 10.1016/0167-4889(93)90091-3.
38. Kawada Y, Khan M, Sharma AK, Ratnayake DB, Dobashi K, Asayama K, et al. Inhibition of peroxisomal functions due to oxidative imbalance induced by mistargeting of catalase to cytoplasm is restored by vitamin E treatment in skin fibroblasts from Zellweger syndrome-like patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004;83(4):297–305. DOI: 10.1016/j.ymgme.2004.07.012.
39. Prakash K, Prajapati S, Ahmad A, Jain SK, Bhakuni V. Unique oligomeric intermediates of bovine liver catalase. *Protein Science*. 2002;11(1):46–57. DOI: 10.1110/ps.20102.
40. Castaldo SA, da Silva AP, Matos A, Inácio Â, Bicho M, Medeiros R, et al. The role of CYBA (p22phox) and catalase genetic polymorphisms and their possible epistatic interaction in cervical cancer. *Tumor Biology: Tumor Markers, Tumor Targeting and Translational Cancer Research*. 2015;36(2):909–914. DOI: 10.1007/s13277-014-2714-2.
41. Song Su, Kai He, Jing Li, Jiali Wu, Mengyu Zhang, Chunhong Feng, et al. Genetic polymorphisms in antioxidant enzyme genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese population: a case-control study. *Tumor Biology: Tumor Markers, Tumor Targeting and Translational Cancer Research*. 2015;36(6):4627–4632. DOI: 10.1007/s13277-015-3110-2.
42. Forsberg L, Lyrenäs L, Morgenstern R, de Faire U. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001;30(5):500–505. DOI: 10.1016/s0891-5849(00)00487-1.
43. Ahn J, Nowell S, McCann SE, Yu J, Carter L, Lang NP, et al. Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006;15(6):1217–1222. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0104.
44. Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1992;12(6):2525–2533. DOI: 10.1128/mcb.12.6.2525-2533.1992.
45. Weigel AL, Handa JT, Hjelmeland LM. Microarray analysis of H₂O₂-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002;33(10):1419–1432. DOI: 10.1016/s0891-5849(02)01082-1.
46. Okuno Y, Matsuda M, Miyata Y, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M, et al. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endocrine Journal*. 2010;57(4):303–309. DOI: 10.1507/Endocrj.K09e-113.
47. Weiwei Yang, Jia Zhang, Haiya Wang, Weili Shen, Pingjin Gao, Manpreet Singh, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ regulates angiotensin II-induced catalase downregulation in adventitial fibroblasts of rats. *FEBS Letters*. 2011;585(5):761–766. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.01.040.
48. Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins MEC. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Molecular Endocrinology*. 2002;16(12):2793–2801. DOI: 10.1210/me.2002-0020.
49. Okuno Y, Matsuda M, Kobayashi H, Morita K, Suzuki E, Fukuhara A, et al. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR γ -responsive region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;366(3):698–704. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.12.001.
50. Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, et al. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor γ activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology*. 2001;142(3):1269–1277. DOI: 10.1210/endo.142.3.8037.
51. Xiaoyuan Quan, Seung-Oe Lim, Guhung Jung. Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG island in the Oct-1 promoter. *FEBS Letters*. 2011;585(21):3436–3441. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.09.035.
52. Gang Liu, Xinbin Chen. The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(47):7195–7204. DOI: 10.1038/sj.onc.1205862.
53. Kang MY, Kim H-B, Piao C, Lee KH, Hyun JW, Chang I-Y, et al. The critical role of catalase in prooxidant and antioxidant function of p53. *Cell Death & Differentiation*. 2013;20(1):117–129. DOI: 10.1038/cdd.2012.102.
54. Lai C-C, Peng M, Huang L, Huang W-H, Chiu TH. Chronic exposure of neonatal cardiac myocytes to hydrogen peroxide enhances the expression of catalase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1996;28(5):1157–1163. DOI: 10.1006/jmcc.1996.0106.
55. Haque R, Chun E, Howell JC, Sengupta T, Chen D, Kim H. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e42542. DOI: 10.1371/journal.pone.0042542.
56. Meilhac O, Zhou M, Santanam N, Parthasarathy S. Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *Journal of Lipid Research*. 2000;41(8):1205–1213.
57. Kremer ML. Decomposition of hydrogen peroxide by haemin. Dependence of the reaction velocity on pH. *Transactions of the Faraday Society*. 1965;61:1453–1458. DOI: 10.1039/TF9656101453.
58. Du P, Loew GH. Theoretical study of model compound I complexes of horseradish peroxidase and catalase. *Biophysical Journal*. 1995;68(1):69–80. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80160-8.
59. Krych J, Gebicki JL, Gebicka L. Flavonoid-induced conversion of catalase to its inactive form – compound II. *Free Radical Research*. 2014;48(11):1334–1341. DOI: 10.3109/10715762.2014.953139.
60. Fita I, Rossmann MG. The active center of catalase. *Journal of Molecular Biology*. 1985;185(1):21–37. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90180-9.
61. Karbyshev MS, Abdullaev ShP, compilers. *Biokhimiya oksidativnogo stressa* [Biochemistry of oxidative stress]. Shestopalov AV, editor. Moscow: Pirogov Russian National Research Medical University; 2018. 60 p. Russian.
62. Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixera F, et al. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*. 2007;68(12):1605–1611. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.04.005.
63. Tondo ML, Petrocelli S, Ottado J, Orellano EG. The monofunctional catalase katE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. *PLoS One*. 2010;5(5):e10803. DOI: 10.1371/journal.pone.0010803.
64. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews*. 1970;50(3):319–375. DOI: 10.1152/Physrev.1970.50.3.319.

65. Klotz MG, Loewen PC. The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Molecular Biology and Evolution*. 2003;20(7):1098–1112. DOI: 10.1093/molbev/msg129.
66. Abrosimova TN, Andreeva IV, Vinogradov AA. [Catalase activity in experimental liver cirrhosis]. *Visnyk Lugans'kogo natsional'nogo universytetu imeni Tarasa Shevchenka. Medyko-biologichni nauky*. 2008;20:5–7. Russian.
67. Ichise N, Hirota K, Ichihashi D, Nodasaka Y, Morita N, Okuyama H, et al. H₂O₂ tolerance of *Vibrio rumoiensis* S-1^T is attributable to the cellular catalase activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008;106(1):39–45. DOI: 10.1263/jbb.106.39.
68. Andreeva IV. [Structural changes in the liver in portal hypertension of different etiologies and their effect on the activity of serum catalase]. In: Germanov VT, editor. *Aktual'ni problemy akusherstva i ginekologii', klinichnoi' imunologii' ta medychnoi' genetiki. Vypusk 12* [Current issues of obstetrics and gynecology, clinical immunology and medical genetics. Issue 12]. Kyiv: [s. n.]; 2005. p. 302–307. Russian.
69. Kapitonov VM, Ostapchenko DA. Oxidative stress and its correction in patients with severe concomitant injury. *Obshchaya reanimatologiya*. 2010;6(4):70–75. Russian.
70. Friel JK, Martin SM, Langdon M, Herzberg GR, Buettner GR. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatric Research*. 2002;51(5):612–618. DOI: 10.1203/00006450-200205000-00012.
71. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*. 1989;73(1):334–339. DOI: 10.1182/blood.V73.1.334.334.
72. Ye-Shih Ho, Ye Xiong, Wanchao Ma, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(31):32804–32812. DOI: 10.1074/jbc.M404800200.
73. Masuoka N, Sugiyama H, Ishibashi N, Da-Hong Wang, Masuoka T, Kodama H, et al. Characterization of acatalasemic erythrocytes treated with low and high dose hydrogen peroxide: hemolysis and aggregation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(31):21728–21734. DOI: 10.1074/jbc.M513818200.
74. Sigfrid LA, Cunningham JM, Beechey N, Lortz S, Tiedge M, Lenzen S, et al. Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2003;31(3):509–518. DOI: 10.1677/jme.0.0310509.
75. Góth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *The Lancet*. 2000;356(9244):1820–1821. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03238-4.
76. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*. 2004;8(3):141–149. DOI: 10.1007/BF03260057.
77. Zimatkin SM, Liopo AV, Deitrich RA. Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1998;22(8):1623–1627. DOI: 10.1111/J.1530-0277.1998.Tb03958.X.
78. Zimatkin SM, Deitrich RA. Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology*. 1997;2(4):387–400. DOI: 10.1080/13556219772444.
79. Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain – a review. *Alcohol*. 1996;13(2):147–151. DOI: 10.1016/0741-8329(95)02026-8.
80. Pavlova ON, Gulenko ON, Karimova RG, Devyatkin AA, Toropovsky AN. Study of dynamics of catalase activity in rat blood serum under mechanical influence on blood-aqueous barrier. *International Research Journal*. 2020;5(part 1):153–158. Russian. DOI: 10.23670/IRJ.2020.95.5.028.
81. Sugadev R, Ponnuswamy MN, Sekar K. Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;2(1):67–77.
82. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308(5730):1909–1911. DOI: 10.1126/science.1106653.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 591.041

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕНСОРНОГО НЕЙРОНА И ОБОРОНИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

А. В. СИДОРОВ¹⁾, В. Н. ШАДЕНКО^{1), 2)}

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

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

Возрастание содержания глюкозы в гемолимфе (с 0,12 (0,05; 0,18) до 4,10 (3,18; 6,08) ммоль/л) приводит к модификации оборонительного поведения моллюсков, проявляющейся в увеличении втянутости тела животного в раковину и возрастании доли слабых защитных реакций в ответ на тактильную стимуляцию щупальца моллюска. Колебаний в длине щупалец и длительности латентного периода протракции выявлено не было. В условиях экспериментальной гипергликемии (нахождение препарата изолированной ЦНС в 10 ммоль/л растворе D-глюкозы в течение 2 ч) изменяются базовые электрические характеристики FMRF-амидергического нейрона

Образец цитирования:

Сидоров АВ, Шаденко ВН. Электрические характеристики сенсорного нейрона и оборонительные реакции моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях пролонгированной гипергликемии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022; 1:23–38.

For citation:

Sidorov AV, Shadenko VN. Electrical properties of the sensory neuron and defense reactions of mollusc *Lymnaea stagnalis* at conditions of prolonged hyperglycemia. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:23–38. Russian.

Авторы:

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

Виктория Николаевна Шаденко – соискатель кафедры физиологии человека и животных биологического факультета¹⁾, научный сотрудник лаборатории клинико-эпидемиологических исследований²⁾. Научный руководитель – А. В. Сидоров.

Authors:

Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

sidorov@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0002-1711-7868>

Victoria N. Shadenko, competitor at the department of human and animal physiology, faculty of biology^a, and researcher at the laboratory of clinical and epidemiological research^b.

vika-st-18@list.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0037-6131>

RPaD1, вовлеченного в детекцию сенсорных стимулов и кардиорегуляцию у *Lymnaea*. Речь идет о деполяризации его мембраны, сопровождаемой увеличением частоты генерации потенциала действия при неизменности вольт-амперной характеристики и мембранного сопротивления (емкости и постоянной времени) по сравнению с контролем. Отмечено возрастание длительности фаз деполяризации и реполяризации, а также амплитуды следовой гиперполяризации при неизменности других фаз спайка RPaD1. На основании выявленных особенностей формы потенциала действия при гипергликемии предполагается, что указанные изменения могут быть вызваны активацией Na^+ -глюкозного котранспортера и АТФ-чувствительных K^+ -каналов мембраны RPaD1. Действие глюкозы следует рассматривать в качестве метаболического сигнала, в том числе и в отношении непищевых нейронов мозга моллюсков.

Ключевые слова: оборонительное поведение; электрическая активность нейронов; потенциал действия; глюкоза; FMRF-амид; метаболические сигналы.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2020» (задание 3.10.2).

ELECTRICAL PROPERTIES OF THE SENSORY NEURON AND DEFENSE REACTIONS OF MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* AT CONDITIONS OF PROLONGED HYPERGLYCEMIA

A. V. SIDOROV^a, V. N. SHADENKO^{a, b}

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

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

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

Hemolymph glucose level rise (from 0.12 (0.05; 0.18) to 4.10 (3.18; 6.08) mmol/L) modify the defensive behaviour of molluscs. This results in increase of the degree of animal's body retracted into the shell and in reinforcement of weak defense reactions in response to tentacles' tactile stimulation. No fluctuations in the tentacles length and the duration of the latent period of protraction were found. At experimental hyperglycemia (incubation of the isolated CNS preparation in 10 mmol/L D-glucose solution for 2 h), the basic electrical characteristics of FMRFamide-containing neuron RPaD1, involved in sensory stimuli detection and heart beat regulation in *Lymnaea*, were changed. Membrane depolarisation, accompanied by firing rate increase were observed, while current-voltage curve characteristics, as well as membrane resistance, capacity and time constant remains unchanged in comparison with control. An increase in rising and falling phases duration, undershoot amplitude were noted, while other parameters of the RPaD1 spike remained unchanged. Based on the revealed features of the action potential shape at hyperglycemia, it is assumed that these changes can be caused by the activation of the Na^+ -glucose co-transporter and ATP-sensitive K^+ -channels of the RPaD1 membrane. The action of glucose should be considered as a metabolic signal also in relation to non-feeding neurons in the mollusc brain.

Keywords: defense behaviour; neuronal electrical activity; action potential; glucose; FMRFamide; metabolic signals.

Acknowledgements. This work supported by state program for scientific research «Convergence-2020» (task 3.10.2).

Введение

Различные нутриенты и метаболиты в значительной степени определяют особенности текущего поведения животных. Среди всего разнообразия таких веществ особенно выделяется глюкоза, чувствительность к уровню которой в интерстиции характерна для многих клеток организма, в том числе нервных [1; 2]. Согласно глюкостатической гипотезе, введенной в обиход в середине XX в. [3], именно реакции глюкозочувствительных клеток мозга, сосредоточенных в области гипоталамуса (если речь идет о млекопитающих), на повышение содержания глюкозы в крови определяют формирование итогового ответа организма, связанного прежде всего с корректировкой пищевого поведения. Чувствительность нейронов к уровню глюкозы во внутренних жидкостях организма (кровь, гемолимфа) отмечена как для позвоночных [4; 5], так и беспозвоночных [6] организмов, т. е. представляет собой общее звено универсального механизма поддержания глюкозного гомеостаза. Более того, нервные клетки беспозвоночных, чувствительные к уровню глюкозы, как правило, относятся к пептидсодержащим нейронам, ответственным за продукцию в том числе инсулиноподобных пептидов [7], например, у моллюсков (*Lymnaea*) или регулирующих содержание инсулина и глюкагона у насекомых (*Drosophila*) [8].

Ранее было установлено, что электрическая активность крупных пептидсодержащих нейронов (VD1 и RPaD2) кардиореспираторной сети ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* выражено изменяется уже в первые минуты после многократного возрастания уровня глюкозы в интерстиции [9]. В сочетании с фактом увеличения частоты сердечных сокращений моллюска в условиях гипергликемии [10] и с учетом того, что работа сердца является основополагающей для формирования гидроскелета животного [11], определяя характер движения тела моллюсков, это позволяет предположить, что некоторые моторные формы поведения также претерпят изменение в таких условиях. Для прудовика характерно пассивно-оборонительное поведение, связанное с втягиванием частей тела (щупальца, губы) или прикрытием всего тела раковиной, вплоть до полного его втягивания внутрь [12], в случае действия слабых или сильных тактильных раздражителей соответственно. Благодаря идентификации в ЦНС *L. stagnalis* клеток, участвующих в обработке и передаче различной сенсорной информации [13], в частности расположенного в правом париетальном ганглии пептидергического нейрона RPaD1, открывается дополнительная возможность оценить влияние пролонгированного действия высоких концентраций глюкозы на электрические характеристики мембраны нервных клеток и параметры генерируемых ими сигналов (потенциалов действия), что раньше сделано не было. Именно устоявшиеся изменения электрических свойств нейронов являются начальным звеном в цепи событий, приводящих как к текущей модификации поведения, так и к последующему закреплению и сохранению сформированного ответа, т. е. к научению и памяти, а модуляторное действие глюкозы на эти процессы не вызывает сомнений [14; 15]. Сказанное выше и предопределило проведение данного исследования.

Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis*, собранных в осенний период в мелких мелиоративных каналах на территории Минской области. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. Смену воды проводили еженедельно. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*). Опыты выполнены на животных одинакового размерного класса с высотой раковины от 3,5 до 4,5 см.

Исследование поведения. При анализе оборонительного поведения моллюсков помещали в чашки Петри, наполненные отстоявшейся водопроводной водой (контрольная группа) или 100 ммоль/л раствором глюкозы, приготовленным на основе отстоявшейся водопроводной воды (опытная группа), по 3 особи в каждую чашку. Отмечали характер реакции животного в ответ на тактильное раздражение щупальца волоском Фрея (максимальная сила воздействия – 10^{-2} Н). Выделяли следующие типы ответов (по мере увеличения выраженности оборонительной реакции): 1 – игнорирование стимула; 2 – ретракция щупальца; 3 – надвигание раковины на передний конец тела; 4 – полное прикрытие тела раковиной. Тестирование проводили на протяжении 2 ч с 15-минутными интервалами между тактильными стимулами. Длину щупалец и участка тела, не прикрытого раковиной, регистрировали с помощью измерителя и линейки, не касаясь тела моллюска, при верхнем равномерном освещении. Латентный период протракции определяли как время, прошедшее с момента помещения моллюска в новые условия (из аквариума в чашку Петри) до начала его выдвижения из раковины и последующей локомоции.

Создание гипергликемии и контроль содержания глюкозы в гемолимфе. Животные опытной группы предварительно в течение 2 ч содержались в аквариумах объемом 10 л, наполненных 100 ммоль/л водным раствором D-глюкозы («ч. д. а.»), а животные контрольной группы аналогичное время находились в «чистой» отстоявшейся водопроводной воде, что способствовало многократному возрастанию содержания глюкозы в гемолимфе [16]. Дополнительный контроль за уровнем глюкозы во внутренней среде проводили по окончании экспериментов по изучению поведения. Для этого сильной тактильной стимуляцией ноги моллюска вызывали реакцию полного втягивания тела, сопровождающуюся выбросом гемолимфы (в среднем объемом около 1 мл). Полученную пробу использовали для определения концентрации глюкозы глюкозооксидазным методом (набор реагентов компании «Анализ X» (Беларусь)). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 520 нм (длина оптического пути – 1 см) при 20°C посредством спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия). Объем материала для анализа – 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежеприготовленного 1 ммоль/л раствора глюкозы.

Электрофизиологические исследования. Эксперименты были выполнены на препаратах изолированной ЦНС. Нейроны RPaD1 идентифицировали по расположению в пределах ЦНС, размеру и окраске сомы. Для размягчения периневральной оболочки и облегченного проникновения микроэлектродов в нейроны препараты предварительно обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV (Sigma, США)) в концентрации 1 мг/мл, приготовленным на нормальном физиологическом растворе для *L. stagnalis*, в течение 5 мин при температуре 20°C . Электрическую активность нейронов регистрировали

после промывки обработанного препарата свежим физиологическим раствором в течение 30 мин. Препараты ЦНС контрольной группы помещали в нормальный физиологический раствор (концентрация указана в миллимолях на литр): NaCl – 44,0; KCl – 1,7; CaCl₂ – 4,0; MgCl₂ · 6H₂O – 1,5; HEPES – 10,0 (pH 7,50 ± 0,03). Препараты ЦНС опытной группы не менее 2 ч инкубировали в нормальном физиологическом растворе, концентрация глюкозы в котором составляла 10 ммоль/л. Внутриклеточную регистрацию электрических параметров нейронов осуществляли с помощью Ag/AgCl-электродов и микроэлектродного усилителя МС-01М (ООО «Линтех», Беларусь). Микропипетки заполняли 2,5 моль/л раствором KCl (сопротивление микроэлектрода – 10–20 МОм). В качестве индифферентного электрода использовали хлорированную серебряную проволоку. Частотные характеристики спонтанной импульсной активности определяли для четырех последовательных 30-секундных участков нейрограммы общей длительностью 2 мин, записанных с шагом квантования 5 мс. Параметры потенциала действия (см. рис. 1 и его описание) для четырех произвольно выбранных спайков оценивали по 30-секундным отрезкам нейрограммы, выполненным с шагом квантования 0,5 мс и обработанным с использованием специальных возможностей программы электронного осциллографа *InputWin* [17]. В случае если нейрон находился в молчащем состоянии (спайковая активность отсутствует), генерацию потенциалов действия вызывали пропусканием через мембрану клетки положительного тока (+0,5 нА).

Для построения кривой вольт-амперной характеристики мембраны, отражающей зависимость сопротивления клетки от мембранного потенциала, последовательно подавали импульсы гиперполяризующего и деполяризующего тока в диапазоне от –2 до +2 нА (с шагом 0,5 нА) длительностью 3 с, одновременно фиксируя значение мембранного потенциала нейрона RPaD1. Полученные данные представляли в графической форме.

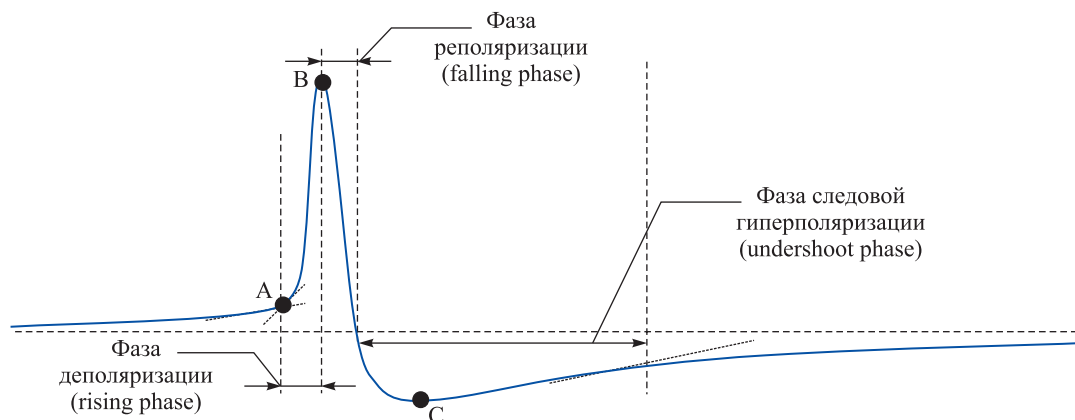


Рис. 1. Оцениваемые в работе амплитудно-временные характеристики потенциала действия (спайка) в нейроне RPaD1 ЦНС *L. stagnalis*. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы временных фаз спайка (указаны в поле рисунка). Горизонтальная пунктирная линия отмечает значение потенциала покоя. Амплитуда порога отсчитывалась от уровня потенциала покоя до регенеративного возрастания натриевой проводимости (точка А), амплитуда потенциала действия – до положительного пикового значения спайка (точка В), амплитуда следовой гиперполяризации – до отрицательного пикового значения спайка (точка С). За положительную фазу потенциала действия принят участок от точки А до момента пересечения кривой записи с установленным значением мембранного потенциала (его общая площадь (*S*) ограничена вышеназванными линиями, а средняя площадь (*S/t*) рассчитывается с учетом длительности фазы, обе выражаются в условных машинных единицах (м. е.)), за отрицательную фазу – участок, соответствующий следовой гиперполяризации

Fig. 1. The amplitude-time characteristics of the action potential (spike) in the RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* studied in the present work. Vertical dotted lines separate the boundaries of the spike time phases (indicated in the figure field). Horizontal dotted line marks the value of the resting potential. The threshold amplitude was measured from the resting potential level to a regenerative increase in sodium conductivity (point A), the action potential amplitude – to a positive peak value of spike (point B), undershoot amplitude – to a negative peak value of spike (point C). The positive phase of the action potential was taken from point A to the moment of intersection of the recording curve with the set value of the membrane potential (its total area (*S*) is limited by the above lines, and the average area (*S/t*) is calculated taking into account the phase duration, marked in conditional machine units (m. u.)), for the negative phase – the area corresponding to the undershoot

Постоянную времени мембраны определяли по характеру изменения мембранного потенциала, вызванного приложением гиперполяризующего толчка тока ($-0,5$ нА), как время, когда изменение потенциала клетки достигнет $\frac{1}{e}$ ($\sim 63,2$ %) от максимально наблюдаемого, а значение мембранной емкости вычисляли по формуле

$$\tau_m = R_m \cdot C_m,$$

где τ_m – постоянная времени; R_m – сопротивление; C_m – емкость мембраны.

При этом сопротивление мембраны определяли исходя из входного сопротивления клетки при гиперполяризующем толчке тока ($-0,5$ нА) за вычетом сопротивления микроэлектрода, пренебрегая сопротивлением аксоплазмы и внеклеточной среды.

Статистическая обработка. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали с помощью *W*-теста Шапиро – Уилка (Shapiro – Wilk *W*-test). В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей использовали параметрические методы оценки: *t*-критерий Стьюдента (Student's *t*-test) для независимых пар и дисперсионный анализ для повторных измерений (repeated measures ANOVA). Если нормальность распределения показателей не была подтверждена для всех без исключения групп данных, применяли непараметрические методы, в частности *U*-критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney *U*-test) (*z*) для попарного сравнения независимых выборок. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего (нормальное распределение) или медиана (нижний квартиль; верхний квартиль) (непараметрический характер распределения). Уравнения регрессии и значения аппроксимации получены с использованием статистических возможностей программы *Microsoft Excel 2010*. Число наблюдений (*n*) указано для каждого массива данных отдельно. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*p*), равном или меньшем 0,05.

Результаты и их обсуждение

Оборонительное поведение. Инкубация животных в высококонцентрированном растворе глюкозы приводит к модификации характеристик пассивно-оборонительного поведения моллюсков (рис. 2). В частности, речь идет о статистически достоверном увеличении втянутости тела животного в раковину (см. рис. 2, б), в то время как изменений в длине щупалец (см. рис. 2, а) и длительности латентного периода протракции (см. рис. 2, в) выявлено не было.

Проведенный корреляционный анализ (рис. 3) показал, что между уровнем глюкозы в гемолимфе и показателями пассивно-оборонительного поведения как в контроле, так и в условиях экспериментальной гипергликемии практически не существует статистически значимой взаимосвязи. На это указывают небольшие (0,30 и менее) значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s), а также крайне низкие (0,10 и менее) значения величин достоверности аппроксимации для уравнений, используемых для описания такой зависимости. Единственным исключением являются данные контрольной группы в отношении размеров участка тела, не прикрытого раковиной, когда достоверность аппроксимации для выявленной полиномиальной зависимости составила 0,60 (см. рис. 3, б). При этом в условиях гипергликемии отмечается формирование статистически достоверной взаимосвязи между этим показателем и уровнем глюкозы в гемолимфе (см. рис. 3, д), однако значение достоверности аппроксимации для полученного уравнения регрессии невелико (0,20).

Также установлено, что увеличение содержания глюкозы во внутренней среде приводит к возрастанию доли слабых защитных реакций (ретракция щупальца) в ответ на тактильную стимуляцию покровов моллюска (рис. 4, а) прежде всего за счет снижения числа сильных оборонительных реакций, связанных с полным прикрытием тела животного раковиной и игнорированием стимула. При этом формирование различий между контрольной и опытной группами приходится на 2-й час экспериментальной сессии (ср. рис. 4, б и в).

Проведенный по окончании изучения оборонительного поведения контроль содержания глюкозы в гемолимфе выявил наличие статистически достоверных различий ($z = 6,30$; $p < 0,0001$, *U*-критерий Манна – Уитни) между контрольной (0,12 (0,05; 0,18) ммоль/л, $n = 28$) и опытной (4,10 (3,18; 6,08) ммоль/л, $n = 26$) группами моллюсков, что дополнительно подтверждает развитие гипергликемии у соответствующей группы в использованной экспериментальной модели.

Электрические свойства мембраны и параметры потенциала действия RPaD1. В отношении оцениваемых электрических характеристик мембраны нейрона RPaD1 (сопротивление, емкость, постоянная времени) статистически достоверных различий между контрольной и опытной (гипергликемия) группами выявлено не было (см. таблицу).

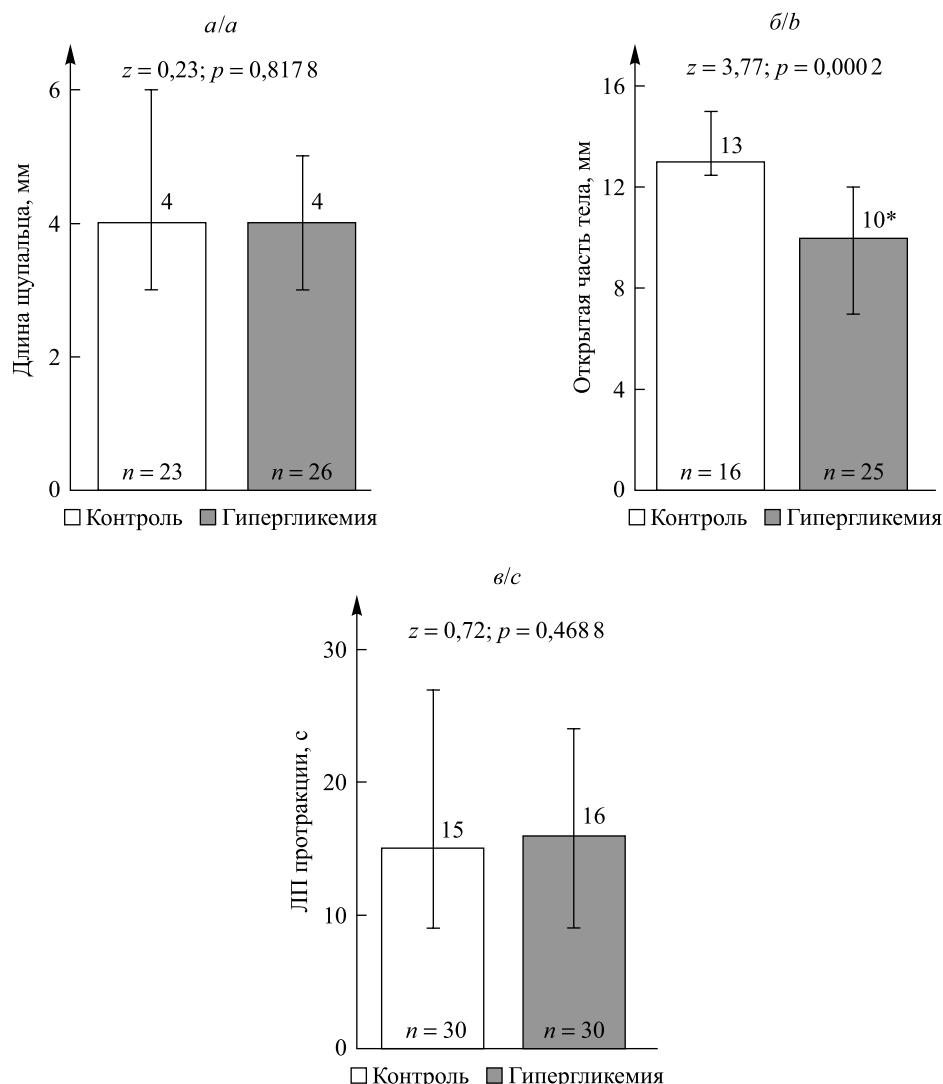


Рис. 2. Показатели пассивно-оборонительного поведения *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:

a – длина щупальца; *б* – длина участка тела, не прикрытого раковиной; *в* – длительность латентного периода (ЛП) протракции.

Представлено значение показателя (числа над столбиками – медиана, планки погрешностей – нижний, верхний квартили), число животных в серии (*n*).

Для каждой группы сравнения указаны значения *U*-критерия Манна – Уитни (*z*) и уровня значимости (*p*).

Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском

Fig. 2. Defensive behaviour of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:

a – tentacle length; *b* – the length of the body part uncovered by the shell;

c – duration of the latent period (LP) of protraction. Experimental meaning (numbers above the columns – median, error bars – lower, upper quartiles), the number of animals

in the experimental groups (*n*) are presented. For each comparison group, Mann – Whitney *U*-test (*z*) and significance level (*p*) are indicated. Significant changes are additionally marked by asterisk

Электрические характеристики мембраны нейрона RPaD1

Electrical properties of RPaD1 neuronal membrane

Оцениваемый показатель	Контроль (<i>n</i> = 9)	Гипергликемия (<i>n</i> = 9)	Статистические различия (<i>t</i> -критерий; уровень значимости)
Сопротивление (R_m), МОм	29,9 ± 6,6	27,3 ± 5,2	$t = 0,30$; $p = 0,7676$
Емкость (C_m), нФ	8,6 ± 2,5	7,6 ± 1,2	$t = 0,38$; $p = 0,7110$
Постоянная времени (τ_m), мс	227,0 ± 54,5	214,0 ± 48,0	$t = 0,18$; $p = 0,8628$

Примечание. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего.

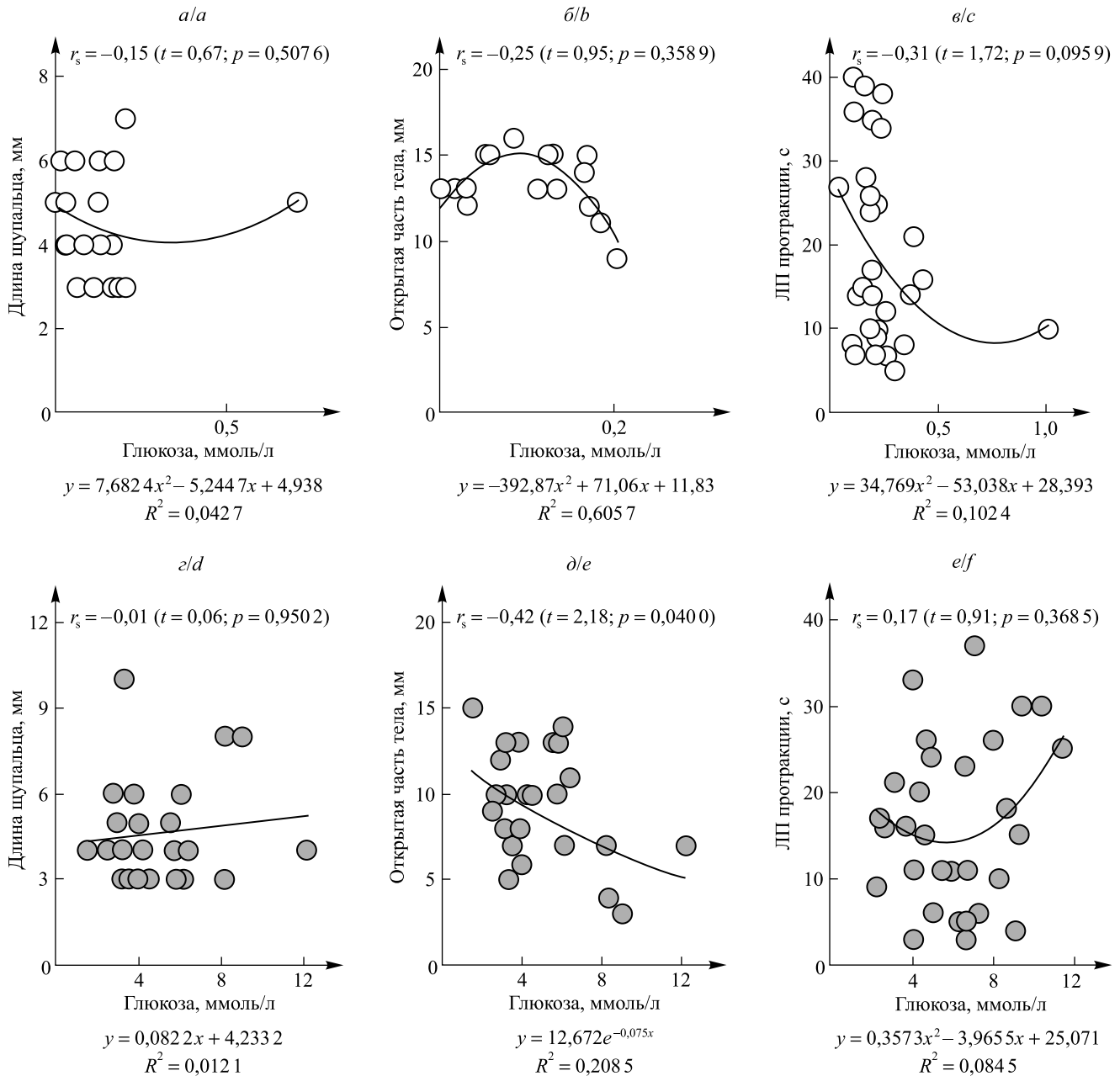


Рис. 3. Взаимосвязь между показателями пассивно-оборонительного поведения и уровнем глюкозы в гемолимфе *L. stagnalis* в контроле (а – в) и в условиях экспериментальной гипергликемии (г – е):
 а, г – длина щупальца; б, д – длина участка тела, не прикрытого раковиной;
 в, е – длительность латентного периода (ЛП) протракции.

Представлены значения для проб гемолимфы отдельно по каждому моллюску.

Светлые круги – контрольная группа, темные круги – опытная группа (гипергликемия).

Для каждого показателя представлено значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) с указанием значения его t -критерия Стьюдента (t) и уровня значимости (p) (вверху диаграммы), а также уравнение регрессии (y) с максимальной достоверностью аппроксимации (R^2) (внизу диаграммы)

Fig. 3. The relationship between the defensive behaviour parameters of *L. stagnalis* and its hemolymph glucose level in control (a – c) and under conditions of experimental hyperglycemia (d – f):

a, d – tentacle length; b, e – the length of the body part uncovered by the shell;

c, f – duration of the latent period (LP) of protraction. The values for hemolymph samples

are presented separately for each mollusc. Light circles – control group, dark circles – experimental group (hyperglycemia).

For each parameter, the Spearman's rank correlation coefficient (r_s) is shown, supplemented by Student's t -test value (t) and significance level (p) (top of the diagram), as well as by the regression equation (y) with the maximum approximation confidence (R^2) (bottom of the diagram)

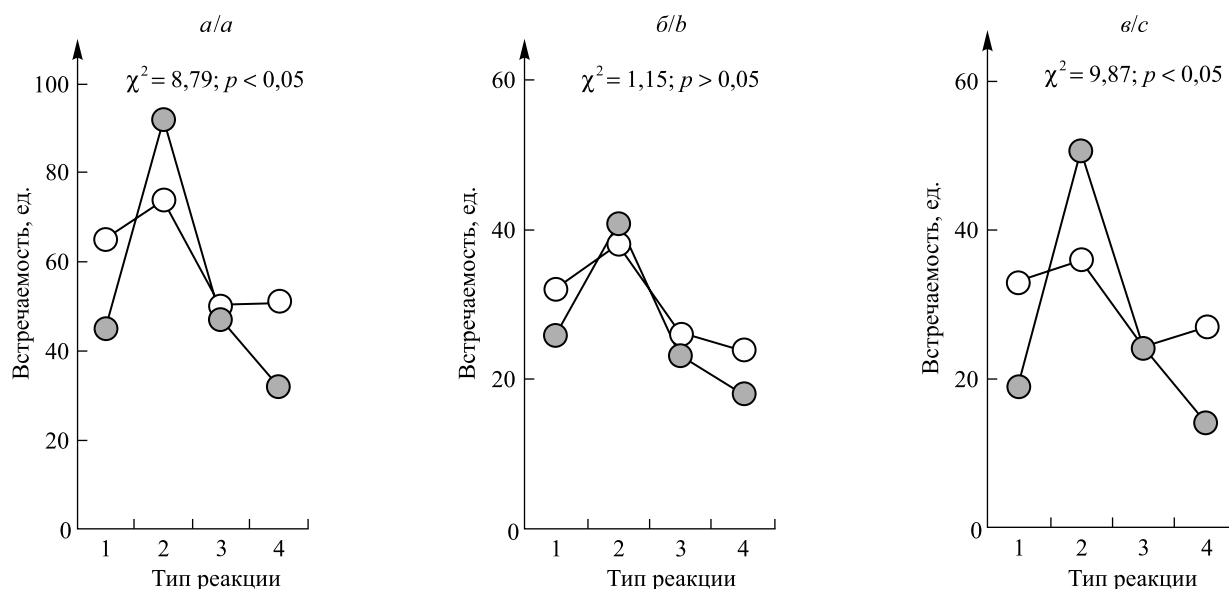


Рис. 4. Оборонительные реакции *L. stagnalis* в ответ на тактильную стимуляцию щупальца волоском Фрея (максимальная сила воздействия – 10^{-2} Н) в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии: а – за 2 ч наблюдения; б – в течение 1-го часа наблюдения; в – в течение 2-го часа наблюдения. Типы реакции: 1 – игнорирование стимула; 2 – ретракция щупальца; 3 – надвигание раковины на передний конец тела; 4 – полное прикрытие тела раковинной. Светлые круги – контрольная группа, темные круги – опытная группа (гипергликемия). Представлено значение критерия χ^2 и уровня значимости (p). Для статистически достоверных различий $p < 0,05$

Fig. 4. Defensive reactions of *L. stagnalis* in response to tactile stimulation of the tentacle by Frey's hair (maximum strength impact – 10^{-2} N) in control and under conditions of experimental hyperglycemia: a – for 2 h of observation; b – during the 1st hour of observation; c – during the 2nd hour of observation.

Reaction types: 1 – ignoring the stimulus; 2 – retraction of the tentacle; 3 – pushing the shell onto the anterior end of the body; 4 – complete covering of the body by a shell. Light circles – control group, dark circles – experimental group (hyperglycemia). The χ^2 test value and significance level (p) are presented. For statistically significant differences, $p < 0.05$

В отношении мембранного потенциала нейрона RPaD1 было отмечено статистически достоверное (в 1,24 раза) уменьшение его величины в опытной группе по сравнению с контролем (рис. 5, а), т. е. деполяризация мембраны. Лишь в двух из девяти клеток контрольной группы выявлено наличие спонтанной ритмики (генерация спайков), в то время как в опытной группе только один из девяти нейронов изначально находился в молчащем состоянии. Даже в случае искусственной стимуляции молчащих нейронов RPaD1 контрольной группы полученные значения для частоты генерации потенциала действия были статистически достоверно (в 1,75 раза) меньше по сравнению с таковыми, естественно наблюдаемыми в условиях гипергликемии (рис. 5, б). В отношении вольт-амперной характеристики мембраны статистически достоверных различий, согласно данным дисперсионного анализа для повторных измерений (repeated measures ANOVA), отмечено не было ($F = 1,04$; $p = 0,41$), в том числе отдельно для положительных (выходящих) и отрицательных (входящих) токов (рис. 5, в).

Ряд временных и амплитудных характеристик спайка RPaD1 также претерпевали изменения в ходе эксперимента (рис. 6, 7). Следует отметить увеличение скорости медленной деполяризации мембраны в условиях гипергликемии (см. рис. 6, б и в, область А), а также выраженности следовой гиперполяризации (см. рис. 6, б и в, область В), наблюдаемое вне зависимости от характера спайковой активности (вызванная или спонтанная), ее частоты, типа (формы) спайка. В ходе более детального анализа выявлены крайне незначительное (в 1,19 раза) возрастание длительности фазы деполяризации (см. рис. 7, а) и гораздо более существенное (в 1,61 раза) увеличение длительности фазы реполяризации (см. рис. 7, б) потенциала действия в нейронах в условиях экспериментальной гипергликемии по сравнению с контролем. В то же время статистически достоверных различий в длительности фазы следовой гиперполяризации не обнаружено (см. рис. 7, в). В отношении амплитуды фаз спайка единственное статистически достоверное изменение (в 1,33 раза) отмечено для следовой гиперполяризации (см. рис. 7, е), тогда как амплитуды потенциала действия (см. рис. 7, г) и порога его генерации (см. рис. 7, д) не претерпевают значимых колебаний в условиях экспериментальной гипергликемии по сравнению с контролем.

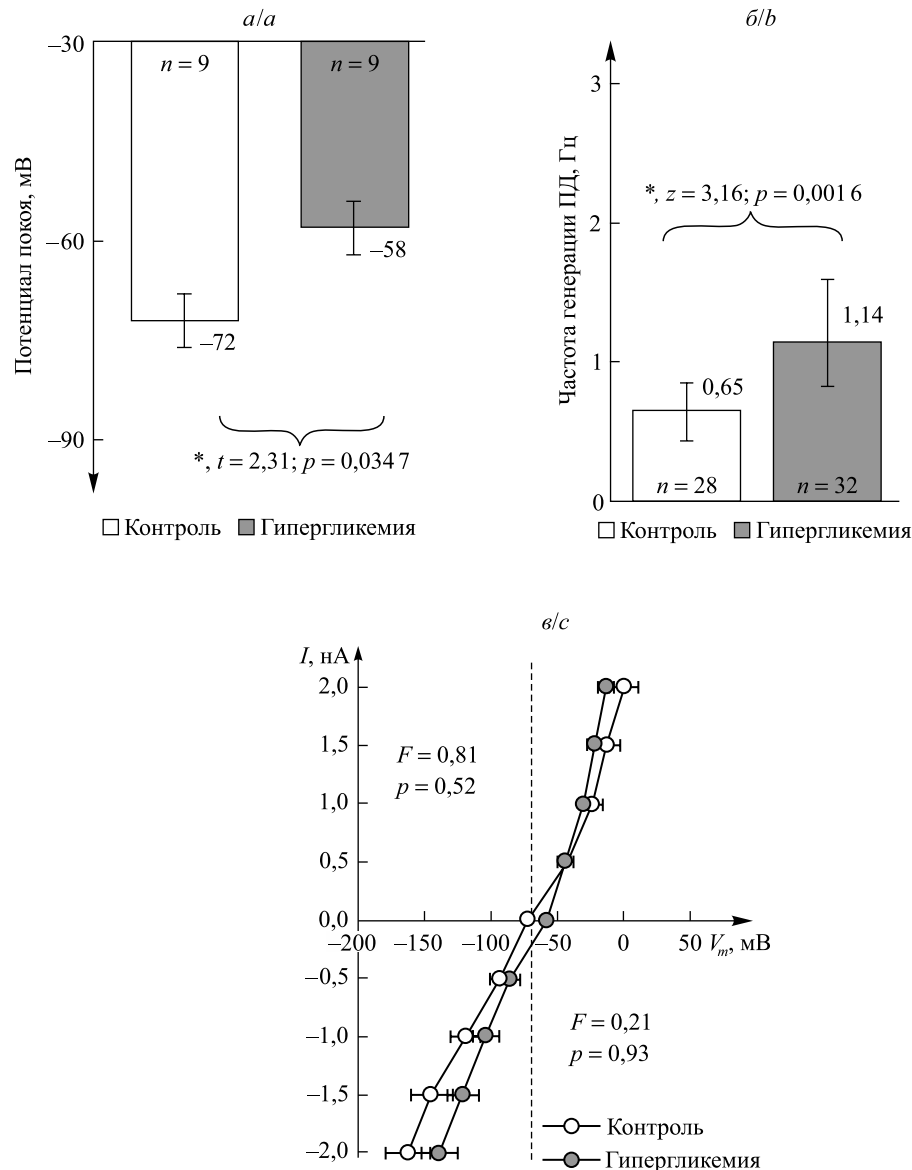


Рис. 5. Электрические характеристики нейрона RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:

a – потенциал покоя; *б* – частота генерации потенциала действия (ПД);

в – вольт-амперная характеристика мембраны. Представлено значение показателя (числа над столбиками – среднее (для части *a*) или медиана (для части *б*), планки погрешностей – ошибка среднего (для части *a*) или нижний, верхний квартили (для части *б*)), число проанализированных нейронов (для части *a*) или участков нейронаграммы (для части *б*) (*n*).

Для каждой группы сравнения указаны значения *t*-критерия Стьюдента (*t*) (для части *a*) или *U*-критерия Манна – Уитни (*z*) (для части *б*) и уровня значимости (*p*).

Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском.

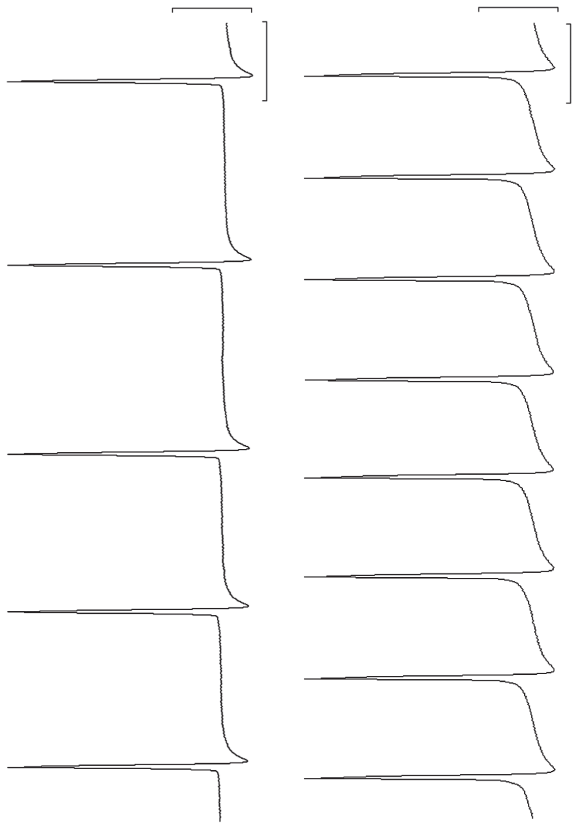
Для части *в* указаны значения *F*-критерия Фридмана (*F*) и уровня значимости (*p*) в случае дисперсионного анализа для повторных измерений отдельно для положительных (левый верхний угол диаграммы) и отрицательных (правый нижний угол диаграммы) токов. Вертикальная пунктирная линия представлена для наглядности изменений вольт-амперной характеристики

Fig. 5. Electrical properties of RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:

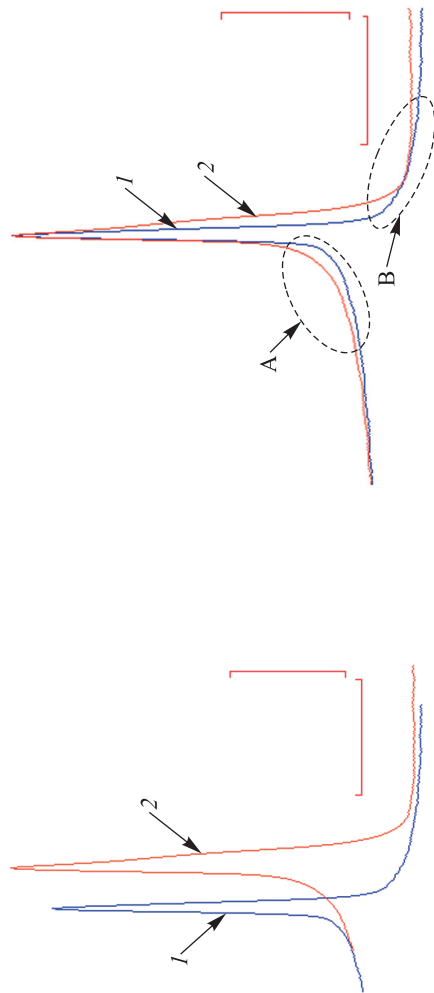
a – membrane potential; *b* – firing rate; *c* – current-voltage curve. Experimental meaning (numbers above the columns – mean (for part *a*) or median (for part *b*), error bars – standard error of the mean (for part *a*) or lower, upper quartiles (for part *b*)), the number of neurons under the study (for part *a*) or amount of 30 s record sections (for part *b*) (*n*) are presented. For each comparison group,

Student's *t*-test (*t*) (for part *a*) or Mann – Whitney *U*-test (*z*) (for part *b*) and significance level (*p*) are indicated. Significant changes are additionally marked by asterisk. For part *c*, Friedman's *F*-test (*F*) and significance level (*p*) for repeated measures ANOVA are indicated separately for positive (upper left corner of the chart) and negative (lower right corner of the chart) currents. The vertical dotted line is shown for the convenience of perception of current-voltage curve changes

a/a



δ/b



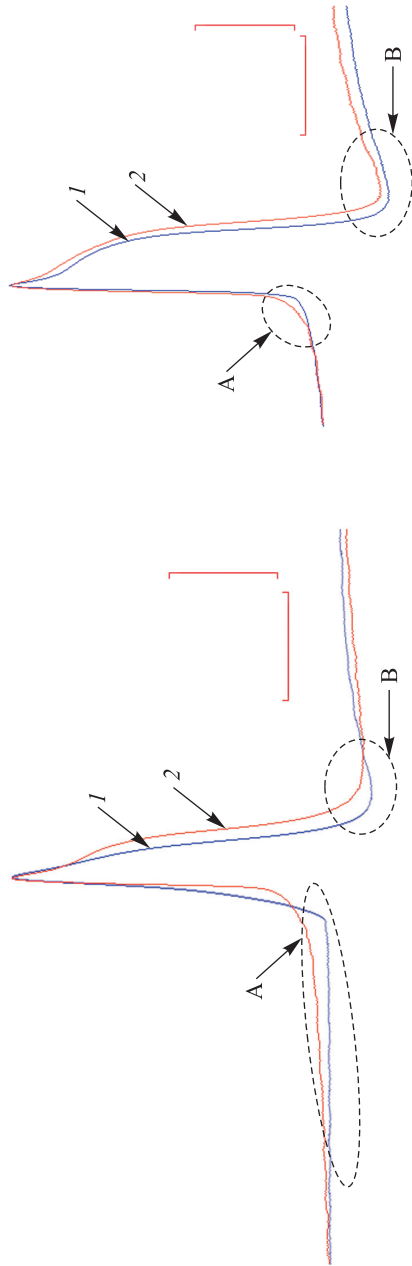


Рис. 6. Спонтанная электрическая активность нейрона RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* (a) и форма его спайков (б, в) в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии.

Часть а содержит записи от разных нейронов RPaD1. Верхняя линия записи – контроль, нижняя – гипергликемия. Калибровка: по времени – 0,5 с, по амплитуде – 30 мВ.

Часть б представляет изображение наложенных друг на друга потенциалов

действия нейрона RPaD1 разных препаратов ЦНС (слева – наложение со смещением вправо для иллюстрации изменений амплитудных характеристик спайка, справа – наложение с совмещением пикового значения и уровня потенциала покоя, сопровождаемое выравниванием амплитуд потенциалов действия средствами графического редактора (по высоте рисунка), отражающее изменение временных характеристик действия

Участки записи, отражающие изменения медленной деполаризации и следовой гиперполяризации мембраны, акцентированы пунктирной линией (области А и В соответственно). Спайк синего цвета (1) – контроль (вызванные потенциалы, частота – 0,80 Гц), спайк красного цвета (2) – гипергликемия (спонтанные потенциалы, частота – 0,27 Гц). Калибровка: по времени – 50 мс, по амплитуде – 25 мВ.

Часть в имеет те же обозначения, что и часть б. Слева – контроль (вызванные потенциалы, частота – 0,77 Гц), гипергликемия (спонтанные потенциалы, частота – 1,63 Гц). Справа – контроль (спонтанные потенциалы, частота – 2,93 Гц), гипергликемия (спонтанные потенциалы, частота – 3,17 Гц). Наложение спайков такое же, как для части б, справа. Калибровка: по времени – 50 мс, по амплитуде – 30 мВ

Fig. 6. Spontaneous electrical activity of RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* (a) and its spikes shapes (b, c) in control and under conditions of experimental hyperglycemia.

Part a contains recordings from different RPaD1 neurons. Top trace – control, bottom trace – hyperglycemia. Calibration: time – 0.5 s, amplitude – 30 mV.

Part b represents overlapping images of action potentials of the RPaD1 neurons

from different CNS preparations (left – overlapping with right shift, illustrating spike amplitude changes, right – overlapping with peak and rest potential values superposition, accompanied by action potential amplitudes equalisation by means of a graphics editor (along the height of the figure), illustrating spike time-course changes).

Parts of the record reflecting changes in slow depolarisation and undershoot are accented

by dotted lines (areas A and B, respectively). Blue spike (1) – control (evoked potentials, 0.80 Hz), red spike (2) – hyperglycemia (spontaneous potentials, 0.27 Hz). Calibration: time – 50 ms, amplitude – 25 mV.

Part c has the same as for part b. Left – control (evoked potentials, 0.77 Hz),

hyperglycemia (spontaneous potentials, 1.63 Hz). Right – control (spontaneous potentials, 2.93 Hz),

hyperglycemia (spontaneous potentials, 3.17 Hz). Overlapping images – the same as for b (right part).

Calibration: time – 50 ms, amplitude – 30 mV

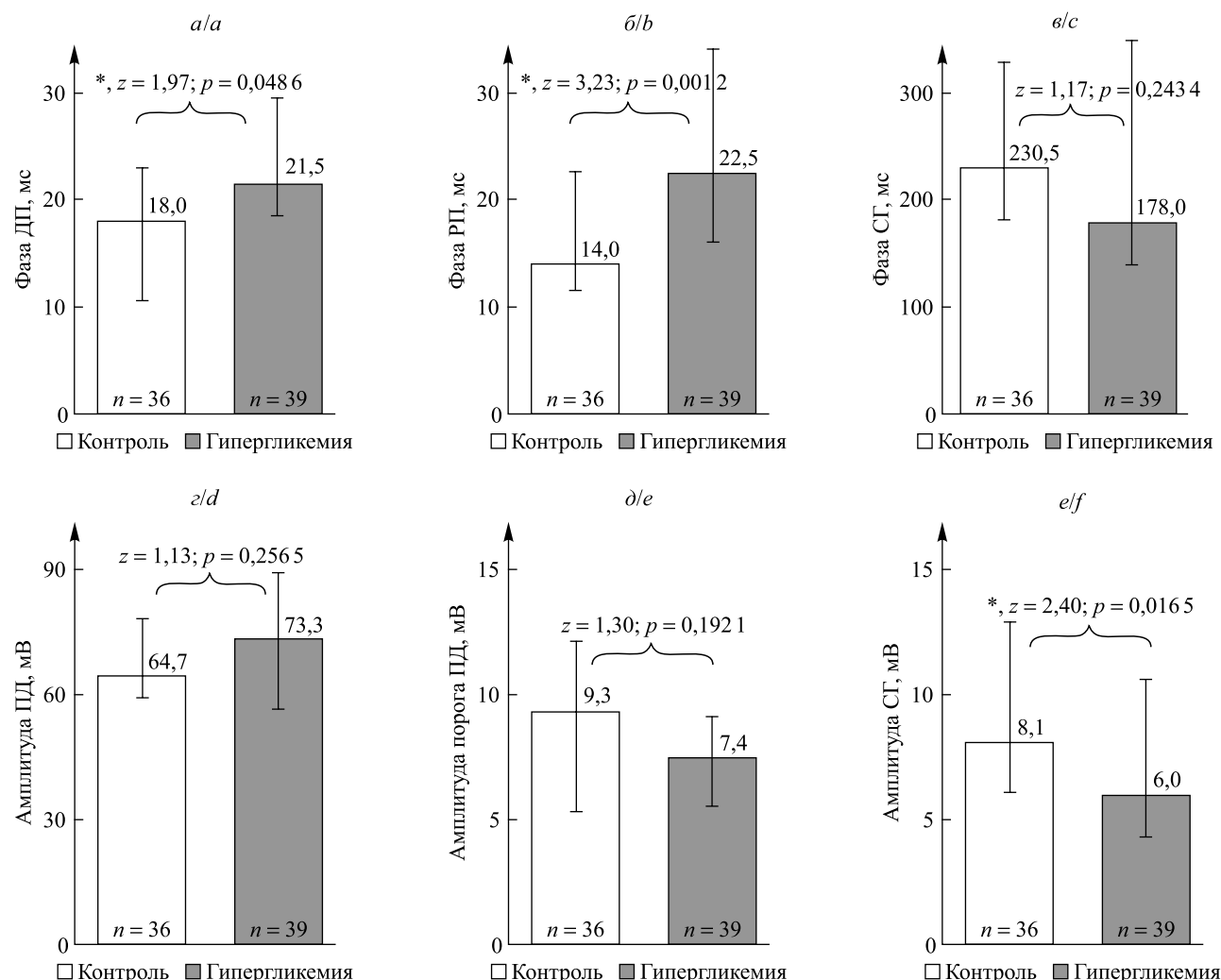


Рис. 7. Амплитудно-временные характеристики спайка в нейроне RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:

а – длительность фазы деполяризации (ДП); б – длительность фазы реполяризации (РП); в – длительность фазы следовой гиперполяризации (СГ); г – амплитуда потенциала действия (ПД); д – амплитуда порога потенциала действия (ПД); е – амплитуда следовой гиперполяризации (СГ).
Описание фаз спайка см. на рис. 1. Представлено значение показателя (числа над столбиками – медиана, планки погрешностей – нижний, верхний квартили), число проанализированных спайков (n).
Для каждой группы сравнения указаны значения U -критерия Манна – Уитни (z) и уровни значимости (p).
Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском

Fig. 7. Amplitude-time characteristics of the spike in RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:

а – rising phase (depolarisation, DP) duration; б – falling phase (repolarisation, RP) duration; в – undershoot (US) phase duration; г – action potential (AP) amplitude; д – threshold amplitude; е – undershoot amplitude. See fig. 1 for details of spike phases description.
Experimental meaning (numbers above the columns – median, error bars – lower, upper quartiles), the number of spikes under the study (n) are presented. For each comparison group, Mann – Whitney U -test (z) and significance level (p) are indicated. Significant changes are additionally marked by asterisk

Как следствие, такие интегральные показатели спайка, как общая и средняя площадь его фаз, претерпевали статистически выраженные изменения лишь в отношении негативной фазы, т. е. фактически следовой гиперполяризации (рис. 8). Речь идет о снижении в 1,57 и 1,24 раза общей и средней площади этой фазы соответственно для нейронов опытной группы. Характеристики положительной фазы потенциала действия не претерпевали статистически значимых изменений по сравнению с контролем.

Обсуждение результатов. Модификация оборонительного поведения, наблюдаемая в условиях экспериментальной гипергликемии, носит разнонаправленный характер: с одной стороны, происходит усиление выраженности оборонительной доминанты (большая степень прикрытия тела животного раковинной), а с другой – смещение реакции на тактильную стимуляцию в сторону слабых оборонительных ответов, правда, и за счет уменьшения числа ответов, связанных с игнорированием стимула, а целый ряд

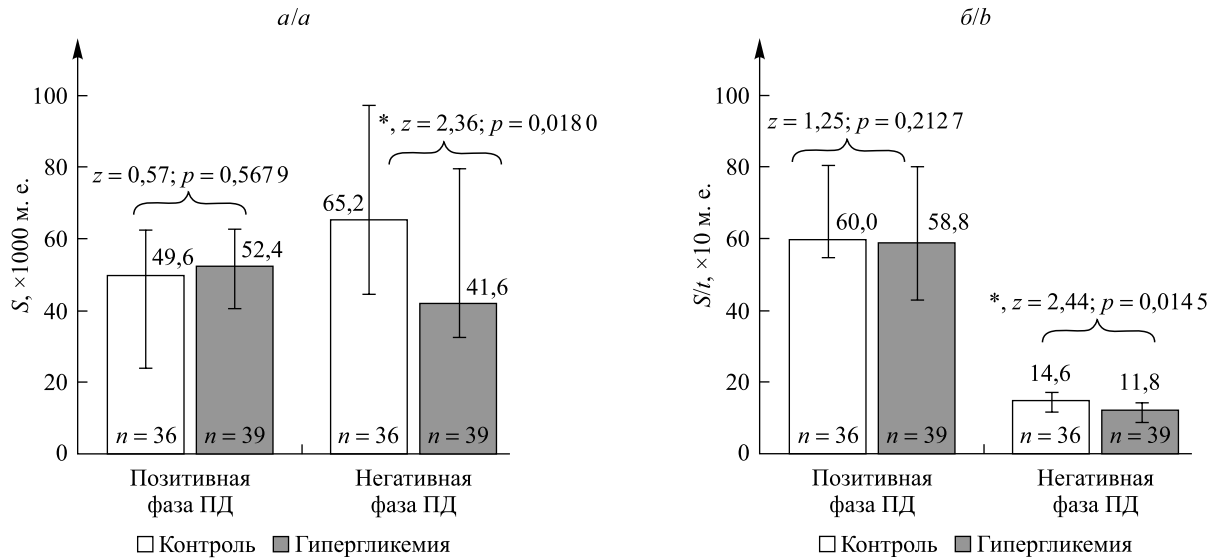


Рис. 8. Интегральные параметры спайка в нейроне RPaD1 в ЦНС *L. stagnalis* в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии:

а – общая площадь (S) фазы спайка; б – средняя площадь (S/t) фазы спайка.

Описание фаз спайка см. на рис. 1. Представлено значение показателя (числа над столбиками – медиана, планки погрешностей – нижний, верхний квартили), число проанализированных спайков (n).

Для каждой группы сравнения указаны значения U-критерия Манна – Уитни (z) и уровня значимости (p).

Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском

Fig. 8. Integral parameters of a spike in RPaD1 neuron in the CNS of *L. stagnalis* in control and under conditions of experimental hyperglycemia:

a – total area (S) of the spike phase; b – average area (S/t) of the spike phase.

See fig. 1 for details of spike phases description. Experimental meaning (numbers above the columns – median, error bars – lower, upper quartiles), the number of spikes under the study (n) are presented.

For each comparison group, z (Mann – Whitney U-test) and significance level (p) are indicated.

Significant changes are additionally marked by asterisk

показателей не претерпевают статистически значимых изменений. Такое положение дел может быть обусловлено тем, что действие глюкозы ограничено определенным диапазоном концентраций. В частности, при изучении оборонительных реакций наземного моллюска *Helix lucorum*, связанных с отдергиванием его ноги, установлено, что повышение уровня глюкозы в гемолимфе облегчает развитие подобного ответа [18]. В то же время внутриволостная инъекция растворов глюкозы (0,5 мл), также облегчающая развитие такой реакции, была эффективна в случае использования концентрации 5,0 ммоль/л, но не 2,5 или 10,0 ммоль/л. В своих дальнейших работах [19] эти же авторы показали, что введение животным аналогов гастрин- и холецистокининподобных пептидов воспроизводит эффекты повышения уровня глюкозы в гемолимфе. Это дополнительно подчеркивает роль нейроэндокринных пептидсодержащих клеток, которыми достаточно богат мозг моллюсков, в том числе *Lymnaea* [20], в формировании поведенческого ответа при гипергликемии. Состояние, связанное с частичным прикрытием тела раковины, а также сохранность реакций на тактильные стимулы при гипергликемии однозначно свидетельствуют об эффективной работе сердца моллюска, создающего надлежащее давление гемолимфы, которое обеспечивает функционирование гидроскелета (в противном случае животное было бы не в состоянии осуществлять движения тела). Увеличение уровня глюкозы в гемолимфе *L. stagnalis* ассоциируется с возрастанием частоты сердечных сокращений [10].

Содержащий FMRF-амид нейрон RPaD1 [21] вовлечен в обработку и передачу различной сенсорной информации [13], а также регуляцию биения сердца и развития оборонительных реакций, связанных с втягиванием тела животного (*withdrawal*) в раковину [20]. По всей видимости, выделение FMRF-амида является одной из реакций нейрона RPaD1 на возрастание уровня глюкозы в гемолимфе. В пользу этого говорят наблюдаемые факты деполяризации и значительного усиления частоты импульсации этой клетки в условиях экспериментальной гипергликемии. Схожие реакции отмечены и в отношении других пептидсодержащих нейронов ЦНС *Lymnaea*, в частности светло-зеленых клеток церебральных ганглиев, усиление электрической активности которых наблюдается при нарастании содержания глюкозы (максимум при ее уровне 5,0 ммоль/л) и сопровождается выбросом инсулиноподобных пептидов [7], реализующих свое действие в отношении других нейронных сетей. В этом случае выделяемый RPaD1 FMRF-амид, обладающий кардиостимулирующим действием, способен к активации истинных кардиорегуляторов

нейронов, преимущественно расположенных [22] в правом париетальном или соседнем с ним висцеральном ганглии (отростки RPaD1 не найдены в области сердца моллюска [11]), в том числе и по механизму объемной передачи сигнала, не будучи ограничен узким пространством синаптической щели.

Среди возможных механизмов такой глюкозоиндуцированной активации RPaD1 следует отметить следующие. Во-первых, речь может идти о снятии тормозных синаптических влияний, в результате которых эта клетка обычно находится в молчащем состоянии [23]. Однако полученные нами данные в отношении неизменности сопротивления (емкости и постоянной времени) мембраны в условиях гипергликемии говорят о сохранности способности этой клетки к нейронной интеграции (временной суммации) на не отличающемся от контроля уровне. При этом изменения формы спайка свидетельствуют о модификации свойств собственно мембраны RPaD1. Отмеченное фактическое «расширение» спайка может быть следствием более высокой частоты генерации потенциала действия при гипергликемии (частотная зависимость длительности спайка хорошо известна) [24; 25]. Однако выраженность эффекта при гипергликемии даже в случае более низких частот импульсации клетки, по сравнению с контролем (см. рис. 6, б), говорит в пользу частотно-независимой составляющей. В связи с этим стоит отметить, что повышение уровня глюкозы сопровождается активацией Na^+ -глюкозного котранспортера в пептидсодержащих нейронах *Lymnaea* [7], как следствие, речь идет об усилении входящих, деполяризующих мембрану клетки потоков натрия (возрастание скорости медленной деполяризации отчетливо прослеживается при гипергликемии) (см. рис. 6). Замедление реполяризации, в том числе и уменьшение амплитуды следовой гиперполяризации, очевидно, является следствием модификации K^+ -проводимости мембраны. Известно, что поступление глюкозы в нейроны усиливает в них продукцию АТФ [26], а возрастание ее уровня в цитоплазме может приводить к закрытию АТФ-зависимых K^+ -каналов, представленных в нервных клетках как позвоночных [27], так и беспозвоночных [28], уменьшая потоки калия через мембрану. Такой механизм хорошо объясняет снижение уровня мембранного потенциала (деполяризация) и повышение возбудимости нейрона, наблюдаемые при гипергликемии (см. рис. 5, а), однако факт отсутствия сенсора напряжения в структуре АТФ-зависимых K^+ -каналов предполагает их потенциал-независимость, а следовательно, и неучастие в развитии потенциала действия, хотя имеются сведения [29] о двойном (уровень внутриклеточного АТФ и значение мембранного потенциала) управлении (*gating*) этими каналами. В то же время ингибирующее действие АТФ [30] и глюкозозависимых полипептидов (инкретины) [31] в отношении потенциалчувствительных калиевых каналов ряда специализированных клеток позвоночных хорошо известно. Можно предположить, что подобный механизм(-ы) может быть реализован в отношении нейронов прудовика, обуславливая наблюдаемый эффект возрастания длительности фазы реполяризации потенциала действия, однако такое предположение нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

Таким образом, глюкоза выступает в качестве метаболического сигнала, пролонгированное действие которого выражено модифицирует электрические свойства пептидсодержащих (FMRF-амидсодержащих) клеток ЦНС моллюска *L. stagnalis*, предопределяя модификацию оборонительных ответов животного в новых условиях.

Библиографические ссылки

1. Steinbusch L, Labouèbe G, Thorens B. Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015;26(9):455–466. DOI: 10.1016/j.tem.2015.06.005.
2. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM. Central regulation of glucose homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(2):741–764. DOI: 10.1002/cphy.c160015.
3. Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine*. 1953;249(1):13–16. DOI: 10.1056/NEJM195307022490104.
4. Karnani M, Burdakov D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(1):R47–R55. DOI: 10.1152/ajpregu.00527.2010.
5. Routh VH. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors*. 2010;10(10):9002–9025. DOI: 10.3390/s101009002.
6. Dus M, Lai JS-Y, Gunapala KM, Min S, Tayler TD, Hergarden AC, et al. Nutrient sensor in the brain directs the action of the brain-gut axis in *Drosophila*. *Neuron*. 2015;87(1):139–151. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.032.
7. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/BF00372957.
8. Oh Y, Lai JS-Y, Mills HJ, Erdjument-Bromage H, Giammarinaro B, Saadipour K, et al. A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. *Nature*. 2019;574(7779):559–564. DOI: 10.1038/s41586-019-1675-4.
9. Sidorov AV, Shadenko VN. Electrical activity of identified neurons in the central nervous system of a mollusk *Lymnaea stagnalis* under acute hyperglycemia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2021;57(6):1257–1266. DOI: 10.1134/S0022093021060065.

10. Сидоров АВ, Шаденко ВН, Казакевич ВБ. Реакции идентифицированных кардиорегуляторных нейронов ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях гипергликемии и при действии инсулина. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:49–58. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-49-58.
11. Сафонова ТА, Журавлев ВЛ, Ноздрачев АД. *Кардиореспираторная система моллюсков: структура, функции, механизмы регуляции*. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского университета; 2008. 244 с.
12. Сидоров АВ. *Функциональная активность нервных центров беспозвоночных*. Минск: БГУ; 2011. 247 с.
13. Zaitseva OV, Shuvalova NE. Morphological properties of neuron RPD1 in *Lymnaea stagnalis* and its involvement in processing of polymodal sensory information. *Neurophysiology*. 1988;20(6):571–578. DOI: 10.1007/BF02150261.
14. Koekkoek LL, Mul JD, la Fleur SE. Glucose-sensing in the reward system. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11:716. DOI: 10.3389/fnins.2017.00716.
15. Mita K, Okuta A, Okada R, Hatakeyama D, Otsuka E, Yamagishi M, et al. What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? *Neurobiology of Learning and Memory*. 2014;107:1–12. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.10.013.
16. Шаденко ВН, Сидоров АВ. Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска *Lymnaea stagnalis* при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:79–84. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.
17. Солтанов ВВ, Бурко ВЕ. Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных. *Новости медико-биологических наук*. 2005;1:91–95.
18. Шевелкин АВ, Шумова ЕА. Роль глюкозы в облегчении оборонительных реакций во время приема пищи у виноградных улиток *Helix lucorum*. *Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова*. 1993;43(3):577–584.
19. Shevelkin AV. Facilitation of defense reactions during the consumption of food in snails: the participation of glucose and gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 1994;24(1):115–124. DOI: 10.1007/BF02355661.
20. Benjamin PR, Kemenes I. Peptidergic systems in the pond snail *Lymnaea*: from genes to hormones and behavior. In: Saleuddin S, Lange AB, Orchard I, editors. *Advances in invertebrate (neuro)endocrinology: a collection of reviews in the post-genomic era. Volume 1. Phyla other than Arthropoda*. New York: Apple Academic Press; 2020. p. 213–254. DOI: 10.1201/9781003029854-7.
21. Bright K, Kellett E, Saunders SE, Brierley M, Burke JF, Benjamin PR. Mutually exclusive expression of alternatively spliced FMRFamide transcripts in identified neuronal systems of the snail *Lymnaea*. *Journal of Neuroscience*. 1993;13(6):2719–2729. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.13-06-02719.1993.
22. Buckett KJ, Peters M, Dockray GJ, Van Minnen J, Benjamin PR. Regulation of heartbeat in *Lymnaea* by motoneurons containing FMRFamide-like peptides. *Journal of Neurophysiology*. 1990;63(6):1426–1435. DOI: 10.1152/jn.1990.63.6.1426.
23. Benjamin PR, Winlow W. The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurons in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1981;70(3):293–307. DOI: 10.1016/0300-9629(81)90182-1.
24. Winlow W. The plastic nature of action potentials. In: Bulloch A, editor. *The cellular basis of neuronal plasticity: physiology, morphology and biochemistry of molluscan neurons*. Manchester: Manchester University Press; 1989. p. 3–27 (Studies in neuroscience; No. 7).
25. Edstrom JP, Lukowiak KD. Frequency-dependent action potential prolongation in *Aplysia* pleural sensory neurones. *Neuroscience*. 1985;16(2):451–460. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90017-x.
26. López-Gamero AJ, Martínez F, Salazar K, Cifuentes M, Nualart F. Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(2):769–796. DOI: 10.1007/s12035-018-1099-4.
27. Chin-Wei Huang, Chao-Ching Huang, Juei-Tang Cheng, Jing-Jane Tsai, Sheng-Nan Wu. Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Neuroscience Research*. 2007;85(7):1468–1477. DOI: 10.1002/jnr.21284.
28. Inoue I, Tsutsui I, Brown ER. K^+ accumulation and K^+ conductance inactivation during action potential trains in giant axons of the squid *Sepioteuthis*. *The Journal of Physiology*. 1997;500(2):355–366. DOI: 10.1113/jphysiol.1997.sp022026.
29. Xiang-Dong Tang, Zhen-Qing Tong. An adenosine triphosphate (ATP)-sensitive K^+ channel of rat neocortical neurons is bi-gated by intracellular ATP and voltage: a novel channel gating mechanism? *Neuroscience Letters*. 1995;193(2):93–96. DOI: 10.1016/0304-3940(95)11675-m.
30. Rui Ye, Jun Liu, Zhiying Jia, Hongyang Wang, YongAn Wang, Wei Sun, et al. Adenosine triphosphate (ATP) inhibits voltage-sensitive potassium currents in isolated Hensen's cells and nifedipine protects against noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Medical Science Monitor*. 2016;22:2006–2012. DOI: 10.12659/msm.898150.
31. Su-Jin Kim, Woo Sung Choi, John Song Mou Han, Warnock G, Fedida D, McIntosh CHS. A novel mechanism for the suppression of a voltage-gated potassium channel by glucose-dependent insulinotropic polypeptide: protein kinase A-dependent endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(31):28692–28700. DOI: 10.1074/jbc.M504913200.

References

1. Steinbusch L, Labouëbe G, Thorens B. Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015;26(9):455–466. DOI: 10.1016/j.tem.2015.06.005.
2. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM. Central regulation of glucose homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(2):741–764. DOI: 10.1002/cphy.c160015.
3. Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine*. 1953;249(1):13–16. DOI: 10.1056/NEJM195307022490104.
4. Karnani M, Burdakov D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(1):R47–R55. DOI: 10.1152/ajpregu.00527.2010.
5. Routh VH. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors*. 2010;10(10):9002–9025. DOI: 10.3390/s101009002.
6. Dus M, Lai JS-Y, Gunapala KM, Min S, Tayler TD, Hergarden AC, et al. Nutrient sensor in the brain directs the action of the brain-gut axis in *Drosophila*. *Neuron*. 2015;87(1):139–151. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.032.

7. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/BF00372957.
8. Oh Y, Lai JS-Y, Mills HJ, Erdjument-Bromage H, Giammarinaro B, Saadipour K, et al. A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. *Nature*. 2019;574(7779):559–564. DOI: 10.1038/s41586-019-1675-4.
9. Sidorov AV, Shadenko VN. Electrical activity of identified neurons in the central nervous system of a mollusk *Lymnaea stagnalis* under acute hyperglycemia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2021;57(6):1257–1266. DOI: 10.1134/S0022093021060065.
10. Sidorov AV, Shadenko VN, Kazakevich VB. Responses of identified cardioregulatory neurons within CNS of mollusc *Lymnaea stagnalis* at hyperglycemia and insulin action. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;3:49–58. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-49-58.
11. Safonova TA, Zhuravlev VL, Nozdrachev AD. *Kardiorespiratornaya sistema mollyuskov: struktura, funktsii, mekhanizmy regulatsii* [Cardiorespiratory system of molluscs: structure, functions, regulatory mechanisms]. Saint Petersburg: Izdatel'stvo Sankt-Petersburgskogo universiteta; 2008. 244 p. Russian.
12. Sidorov AV. *Funktsional'naya aktivnost' nervnykh tsentrov bespozvonochnykh* [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk: Belarusian State University; 2011. 247 p. Russian.
13. Zaitseva OV, Shuvalova NE. Morphological properties of neuron RPD1 in *Lymnaea stagnalis* and its involvement in processing of polymodal sensory information. *Neurophysiology*. 1988;20(6):571–578. DOI: 10.1007/BF02150261.
14. Koekkoek LL, Mul JD, la Fleur SE. Glucose-sensing in the reward system. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11:716. DOI: 10.3389/fnins.2017.00716.
15. Mita K, Okuta A, Okada R, Hatakeyama D, Otsuka E, Yamagishi M, et al. What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? *Neurobiology of Learning and Memory*. 2014;107:1–12. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.10.013.
16. Shadenko VN, Sidorov AV. Induction of experimental hyperglycemia in mollusc *Lymnaea stagnalis* after animal's incubation in high-concentrated glucose solution. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:79–84. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.
17. Soltanov VV, Burko VE. [Computer programs for electrophysiological data-processing]. *News of Biomedical Sciences*. 2005;1:91–95. Russian.
18. Shevelkin AV, Shumova EA. [The role of glucose in facilitating defensive reactions during feeding in the edible snail *Helix lucorum*]. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti imeni I. P. Pavlova*. 1993;43(3):577–584. Russian.
19. Shevelkin AV. Facilitation of defense reactions during the consumption of food in snails: the participation of glucose and gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 1994;24(1):115–124. DOI: 10.1007/BF02355661.
20. Benjamin PR, Kemenes I. Peptidergic systems in the pond snail *Lymnaea*: from genes to hormones and behavior. In: Saleuddin S, Lange AB, Orchard I, editors. *Advances in invertebrate (neuro)endocrinology: a collection of reviews in the post-genomic era. Volume 1. Phyla other than Arthropoda*. New York: Apple Academic Press; 2020. p. 213–254. DOI: 10.1201/9781003029854-7.
21. Bright K, Kellett E, Saunders SE, Brierley M, Burke JF, Benjamin PR. Mutually exclusive expression of alternatively spliced FMRFamide transcripts in identified neuronal systems of the snail *Lymnaea*. *Journal of Neuroscience*. 1993;13(6):2719–2729. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.13-06-02719.1993.
22. Buckett KJ, Peters M, Dockray GJ, Van Minnen J, Benjamin PR. Regulation of heartbeat in *Lymnaea* by motoneurons containing FMRFamide-like peptides. *Journal of Neurophysiology*. 1990;63(6):1426–1435. DOI: 10.1152/jn.1990.63.6.1426.
23. Benjamin PR, Winlow W. The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurons in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1981;70(3):293–307. DOI: 10.1016/0300-9629(81)90182-1.
24. Winlow W. The plastic nature of action potentials. In: Bulloch A, editor. *The cellular basis of neuronal plasticity: physiology, morphology and biochemistry of molluscan neurons*. Manchester: Manchester University Press; 1989. p. 3–27 (Studies in neuroscience; No. 7).
25. Edstrom JP, Lukowiak KD. Frequency-dependent action potential prolongation in *Aplysia* pleural sensory neurones. *Neuroscience*. 1985;16(2):451–460. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90017-x.
26. López-Gamero AJ, Martínez F, Salazar K, Cifuentes M, Nualart F. Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(2):769–796. DOI: 10.1007/s12035-018-1099-4.
27. Chin-Wei Huang, Chao-Ching Huang, Juei-Tang Cheng, Jing-Jane Tsai, Sheng-Nan Wu. Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Neuroscience Research*. 2007;85(7):1468–1477. DOI: 10.1002/jnr.21284.
28. Inoue I, Tsutsui I, Brown ER. K^+ accumulation and K^+ conductance inactivation during action potential trains in giant axons of the squid *Sepioteuthis*. *The Journal of Physiology*. 1997;500(2):355–366. DOI: 10.1113/jphysiol.1997.sp022026.
29. Xiang-Dong Tang, Zhen-Qing Tong. An adenosine triphosphate (ATP)-sensitive K^+ channel of rat neocortical neurons is gated by intracellular ATP and voltage: a novel channel gating mechanism? *Neuroscience Letters*. 1995;193(2):93–96. DOI: 10.1016/0304-3940(95)11675-m.
30. Rui Ye, Jun Liu, Zhiying Jia, Hongyang Wang, YongAn Wang, Wei Sun, et al. Adenosine triphosphate (ATP) inhibits voltage-sensitive potassium currents in isolated Hensen's cells and nifedipine protects against noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Medical Science Monitor*. 2016;22:2006–2012. DOI: 10.12659/msm.898150.
31. Su-Jin Kim, Woo Sung Choi, John Song Mou Han, Warnock G, Fedida D, McIntosh CHS. A novel mechanism for the suppression of a voltage-gated potassium channel by glucose-dependent insulinotropic polypeptide: protein kinase A-dependent endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(31):28692–28700. DOI: 10.1074/jbc.M504913200.

УДК 577.15:581.13:581.19

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ НИКЕЛЯ(II) В ПОЧВЕ НА ОБЩУЮ АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ И СОСТОЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*

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

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

Проведен сравнительный анализ некоторых биохимических характеристик нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в почве с повышенной концентрацией ионов никеля(II). Трансгенные растения несли в своем геноме бактериальный ген *acdS*, который кодирует фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазу (АЦК-деаминазу). Обработка почвы ионами никеля приводила к индукции экспрессии гена *acdS* и повышению активности АЦК-деаминазы в трансгенных растениях. Также продемонстрировано, что в условиях абиотического стресса в исследуемых растениях возрастала общая антиоксидантная активность, увеличивалось содержание аскорбиновой кислоты, глутатиона, аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Ключевые слова: антиоксидантная система; аскорбат-глутатионовый цикл; ген *acdS*; *Nicotiana tabacum*.

Образец цитирования:

Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Изучение влияния ионов никеля(II) в почве на общую антиоксидантную активность и состояние компонентов аскорбат-глутатионного цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:39–47.

For citation:

Pristupa KV, Kukulienskaya TA, Khramtsova EA. The influence of nickel(II) ions in soil on total antioxidant activity and components of the ascorbat-glutathione cycle in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:39–47. Russian.

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

kristina.pristupa@mail.ru

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

Tatsiana A. Kukulienskaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology. tak14@tut.by

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

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

elena_khramtsova@inbox.ru

THE INFLUENCE OF NICKEL(II) IONS IN SOIL ON TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY AND COMPONENTS OF THE ASCORBATE-GLUTATHIONE CYCLE IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM*

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

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

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

We conducted a comparative analysis of some biochemical parameters in non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, cultivated in soil with an increased concentration of nickel(II) ions. Transgenic plants had in their genome a bacterial *acdS*-gene encoding the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC-deaminase) enzyme. The introduction of elevated concentrations of nickel ions into the soil promotes induction of the *acdS*-gene expression and an increase in ACC-deaminase activity in transgenic plants. It was shown that the total antioxidant activity and the content of ascorbic acid, glutathione peroxidase, glutathione reductase increased in plants under abiotic stress.

Keywords: antioxidant system; ascorbate-glutathione cycle; *acdS*-gene; *Nicotiana tabacum*.

Введение

Повышение устойчивости сельскохозяйственных и декоративных растений к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды является одной из важнейших задач, которые стоят перед учеными разных стран в настоящее время. Данное направление актуально в связи с усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества, экосистемы и ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством. Растения, произрастающие в неблагоприятных условиях, подвергаются абиотическому стрессу, что может быть обусловлено такими факторами, как загрязнение почв тяжелыми металлами, засоление, нарушение водного режима и др. [1; 2].

Следует отметить, что ионы никеля(II), входящие в состав Ni-зависимых ферментов (например, уреазы), в небольших количествах необходимы для нормального функционирования растений. Однако в высоких концентрациях они оказывают негативное воздействие на жизнедеятельность растительного организма. Во-первых, ионы никеля способны образовывать высокоспецифичные связи с функциональными группами и нарушать структуру молекул, во-вторых, они обуславливают нарушение ионного гомеостаза и изменение барьерных свойств мембран, а в-третьих, вызывают повреждение ядра, нарушают синтез РНК [3]. Кроме того, избыточное количество ионов никеля приводит к возрастанию продукции активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках и, как следствие, повышению интенсивности свободнорадикальных окислительных процессов. АФК подавляют активность ряда ферментов, вызывают деградацию клеточных биополимеров, нарушают проницаемость биологических мембран, останавливают клеточный цикл и способствуют развитию апоптоза. В ответ на усиление генерации АФК, как правило, активируются ферментативные компоненты антиоксидантной защитной системы и увеличивается содержание низкомолекулярных антиоксидантов, повышается интенсивность перекисного окисления липидов [4; 5].

Известно, что развитие абиотического стресса сопровождается образованием в растениях избыточного количества этилена – фитогормона, который участвует в регуляции прорастания семян, роста корней и стеблей, образования цветков, созревания плодов. Однако его чрезмерное накопление приводит к изменению параметров роста и развития растений.

Одним из современных способов снижения избыточного количества этилена в растениях является создание трансгенных форм, которые несут в своем геноме бактериальный ген *acdS*, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеамиразу (АЦК-деамиразу). Данный фермент катализирует разложение предшественника этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) – до аммиака и α -кетобутирата, которые не оказывают негативного влияния на растения [6; 7].

Функционирование антиоксидантной системы в значительной степени повышает устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Во многих странах мира проводится изучение антиоксидантной активности растений под влиянием стрессовых воздействий, создаются трансгенные растения, которые отличаются сверхэкспрессией генов, кодирующих компоненты аскорбат-глутатионного цикла [8]. Механизм функционирования последнего заключается в восстановлении пероксида водорода до воды с участием аскорбиновой кислоты и аскорбатпероксидазы [9].

Данные об изменении состояния и эффективности антистрессового действия аскорбат-глутатионовой системы получены также для ряда растений, инокулированных бактериями, которые имеют ген *acdS*

в своем геноме [10]. Однако изучение общей антиоксидантной активности и компонентов аскорбат-глутатионового цикла трансгенных растений, несущих данный ген, в условиях загрязнения почвы ионами никеля не проводилось.

Целью настоящей работы является изучение влияния ионов никеля, внесенных в почву, на общую антиоксидантную активность, а также активность ряда ферментов и содержание неферментативных антиоксидантов аскорбат-глутатионового цикла в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих ген *acdS* бактерий *Pseudomonas putida* B-37.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *N. tabacum*, несущие ген *acdS* бактерий *P. putida* B-37. Предметом исследования являлись общая антиоксидантная активность данных растений, активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла (аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы) и содержание низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, глутатиона) в растениях *N. tabacum*.

Исследуемые растения были разделены на две серии:

- контрольную (без обработки почвы);
- опытную (однократная обработка почвы NiCl_2 в концентрации 20 мкг на 1 кг почвы).

Каждая серия включала в себя 10 трансгенных растений линий 4-12 и 10-38, а также 10 нетрансгенных растений *N. tabacum*.

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А. А. Мельниковой и соавторами [11]. Линии трансгенных растений *N. tabacum* 4-12 и 10-38 были получены с использованием векторной конструкции pBI121*acdS*, несущей ген *acdS* бактерий *P. putida* B-37, который находится под контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Генетическая конструкция введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Полученный агробактериальный штамм использован для трансформации каллусов *N. tabacum*.

Линии растений 4-12 и 10-38 были получены с разных трансформированных клонов, поэтому различались между собой на уровне ДНК по локусу внедрения и, соответственно, проявлению функций целевого гена, его взаимодействию с другими генами, а также влиянию на растения.

Растения линии 10-38 имели более высокие ($p \leq 0,05$) ростовые характеристики стебля ($(44,50 \pm 0,13)$ см) по сравнению с растениями линии 4-12 ($(40,00 \pm 0,09)$ см). Также растения линии 10-38 отличались большими ($p \leq 0,05$) длиной корня ($(1,90 \pm 0,12)$ см) и биомассой ($(23,20 \pm 0,06)$ г), чем растения линии 4-12 ($(1,5 \pm 0,1)$ см и $(20,40 \pm 0,03)$ г соответственно).

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

Растительный материал (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 моль/л калий-фосфатном буфере (pH 7,8), затем доводили объем до 10 мл. Полученные гомогенаты трижды по 15 с подвергали ультразвуковому воздействию при частоте 11 кГц с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП «Академприбор», Россия), после чего центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 об/мин. Все процедуры производили на холоде (4°C).

Гомогенаты обрабатывались ультразвуком в целях разрушения клеточных мембран и высвобождения содержимого клеток с дальнейшим осаждением их обломков путем центрифугирования для определения общей антиоксидантной активности полученных экстрактов, а также активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла, содержания низкомолекулярных антиоксидантов и белка в растениях.

Общую антиоксидантную активность растительных экстрактов оценивали по степени ингибирования окисления парафенилендиамина пероксидом водорода с применением спектрофотометрического метода при длине волны 530 нм [12]. Содержание аскорбиновой кислоты в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически с использованием метода Даса, который основан на способности фосфомолибдата восстанавливаться данной кислотой до молибдата синего цвета. Измерение проводили при длине волны 660 нм [13]. Содержание восстановленного глутатиона в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Элмана при длине волны 412 нм [14]. Активность аскорбатпероксидазы в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу Вермы – Дубея при длине волны 290 нм [15]. Активность глутатионпероксидазы в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически по количеству окисленного глутатиона, накопленного в среде инкубации, при длине волны 260 нм [16]. Активность глутатионредуктазы

в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по количеству НАДФН, образующегося при восстановлении окисленного глутатиона в среде инкубации, при длине волны 340 нм [17]. *Содержание белка* в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм [18].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью лицензионного пакета программ *Statistica 6.0*. Данные представлены как средняя арифметическая величина $\pm$ среднестатистическая ошибка. Оценку достоверности различий средних арифметических величин проводили на основании коэффициента Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при двустороннем уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Развитие стресса у растений сопровождается активацией свободнорадикальных окислительных процессов в клетке [4]. Первоначально нами была определена общая антиоксидантная активность (выражается степенью инактивации антиоксидантами растений окисления парафенилендиамина пероксидом водорода) всех нетрансгенных и трансгенных растений, выращенных в различных условиях (табл. 1).

Таблица 1

Общая антиоксидантная активность нетрансгенных и трансгенных растений *N. tabacum*, %

Table 1

Total antioxidant activity of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, %

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	60,0 $\pm$ 1,5	56,0 $\pm$ 1,4	54,0 $\pm$ 1,4
Обработка почвы Ni ²⁺	75,0 $\pm$ 1,9*	63,0 $\pm$ 1,5* ^a	62,0 $\pm$ 1,5* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, исходная общая антиоксидантная активность нетрансгенных растений в 1,1 раза выше, чем у трансгенных форм. Установлено, что при внесении в почву Ni²⁺ общая антиоксидантная активность исследуемых растений увеличивается: у нетрансгенных форм – в 1,25 раза, у трансгенных растений линии 4-12 – в 1,13 раза, а у трансгенных растений линии 10-38 – в 1,15 раза по сравнению с контрольной серией.

Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный ген *acdS*, образуется меньшее количество АФК, следовательно, они характеризуются более низкой интенсивностью свободнорадикальных окислительных процессов, чем нетрансгенные. Возможно, в трансгенных растениях в меньшей степени происходит активация элементов антиоксидантной защиты, что и обуславливает более низкую общую антиоксидантную активность трансгенных форм по сравнению с нетрансгенными.

На следующем этапе работы было определено содержание аскорбиновой кислоты (в миллиграммах на 1 г растительного материала) во всех сериях (табл. 2).

Таблица 2

Содержание аскорбиновой кислоты в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мг/г

Table 2

The content of ascorbic acid in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, mg/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,730 $\pm$ 0,015	0,810 $\pm$ 0,016 ^a	0,780 $\pm$ 0,015
Обработка почвы Ni ²⁺	1,180 $\pm$ 0,023*	1,390 $\pm$ 0,025* ^a	1,470 $\pm$ 0,028* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Согласно представленным в табл. 2 данным при обработке почвы ионами никеля(II) содержание аскорбиновой кислоты в растениях повышается: в нетрансгенных формах – в 1,6 раза, в трансгенных растениях линии 4-12 – в 1,7 раза, в трансгенных растениях линии 10-38 – в 1,9 раза. Очевидно, что в случае присутствия Ni^{2+} в почве содержание аскорбиновой кислоты в трансгенных формах достоверно выше, чем в нетрансгенных, тогда как в образцах, выращенных в нормальных условиях, уровень витамина С достоверно не различается.

Также нами было определено содержание глутатиона (в миллимолях на 1 г растительного материала) во всех сериях растений (табл. 3).

Таблица 3

Содержание глутатиона в нетрансгенных
и трансгенных растениях *N. tabacum*, ммоль/г

Table 3

The content of glutathione in non-transgenic
and transgenic plants *N. tabacum*, mmol/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	3,46 ± 0,15	3,43 ± 0,16	3,39 ± 0,15
Обработка почвы Ni^{2+}	4,79 ± 0,19*	5,34 ± 0,24*	5,37 ± 0,25*

*Различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni^{2+}) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 3, содержание глутатиона в растениях при абиотическом стрессе, вызванном присутствием $NiCl_2$ в почве, также возрастало: в нетрансгенных растениях оно увеличилось в 1,4 раза, а в трансгенных растениях обеих серий – в 1,6 раза по сравнению с содержанием глутатиона в растениях, выращенных без внесения $NiCl_2$ в почву.

На следующем этапе работы была определена активность основных ферментов аскорбат-глутатионнового цикла. В частности, нами изучено влияние ионов никеля(II) в почве на активность аскорбатпероксидазы (табл. 4), глутатионпероксидазы (табл. 5) и глутатионредуктазы (табл. 6) в исследуемых растениях.

Таблица 4

Активность аскорбатпероксидазы в нетрансгенных
и трансгенных растениях *N. tabacum*, отн. ед./мин на 1 мг белка

Table 4

Ascorbate peroxidase activity of non-transgenic
and transgenic plants *N. tabacum*, rel. un./min per 1 mg protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,031 ± 0,002	0,029 ± 0,003	0,030 ± 0,002
Обработка почвы Ni^{2+}	0,126 ± 0,006*	0,086 ± 0,005 ^a	0,085 ± 0,004 ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni^{2+}) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Приведенные в табл. 4 данные свидетельствуют об увеличении активности аскорбатпероксидазы во всех образцах при выращивании их в почве с $NiCl_2$. Однако в трансгенных растениях активность данного фермента повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных, при обработке почвы Ni^{2+} . Показано, что в нетрансгенных растениях активность аскорбатпероксидазы после внесения в почву ионов никеля(II) возросла в 4,1 раза по сравнению с ее активностью в растениях, выращенных без внесения данного металла в почву. В трансгенных растениях линии 4-12 активность фермента при обработке почвы Ni^{2+} увеличилась в 3,0 раза, а в трансгенных растениях линии 10-38 – в 2,8 раза относительно таковой в трансгенных растениях, выращенных в условиях отсутствия абиотического стресса.

По данным, представленным в табл. 5, можно судить о влиянии ионов никеля(II) в почве на активность глутатионпероксидазы (выражается в микромолях на литр окисленного глутатиона в минуту на 1 мг белка) в трансгенных и нетрансгенных растениях *N. tabacum*.

Таблица 5

Активность глутатионпероксидазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль · л⁻¹ · мин⁻¹ на 1 мг белка

Table 5

Glutathione peroxidase activity of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol · L⁻¹ · min⁻¹ per 1 mg protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,027 ± 0,002	0,028 ± 0,002	0,027 ± 0,002
Обработка почвы Ni ²⁺	0,065 ± 0,003*	0,042 ± 0,002* ^a	0,043 ± 0,002* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Согласно данным табл. 5 активность глутатионпероксидазы в нетрансгенных растениях после внесения в почву ионов никеля(II) увеличилась в 2,4 раза по сравнению с ее активностью в контрольных образцах, выращенных в нормальных условиях. Активность фермента в трансгенных растениях линий 4-12 и 10-38, выращенных в присутствии NiCl₂ в почве, была в 1,5 и 1,6 раза выше контроля соответственно.

Данные, представленные в табл. 6, характеризуют влияние присутствующих в почве ионов никеля(II) на активность глутатионредуктазы (выражается в микромольях на литр НАДФН в минуту на 1 мг белка) в исследуемых растениях.

Таблица 6

Активность глутатионредуктазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль · л⁻¹ · мин⁻¹ на 1 мг белка

Table 6

Glutathione reductase activity of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol · L⁻¹ · min⁻¹ per 1 mg protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,045 ± 0,003	0,044 ± 0,002	0,045 ± 0,003
Обработка почвы Ni ²⁺	0,113 ± 0,006*	0,074 ± 0,004* ^a	0,072 ± 0,004* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 6, при внесении в почву Ni²⁺ активность глутатионредуктазы в растениях увеличивается, однако в трансгенных образцах повышение активности фермента происходит в меньшей степени. В нетрансгенных растениях активность глутатионредуктазы при обработке почвы ионами никеля(II) выросла в 2,5 раза по сравнению с таковой в контрольных образцах, выращенных в условиях отсутствия абиотического стресса. В трансгенных растениях линии 4-12 при обработке почвы Ni²⁺ активность фермента повысилась в 1,7 раза, а в трансгенных растениях линии 10-38 – в 1,6 раза относительно его активности в трансгенных растениях, выращенных в нормальных условиях.

На основании полученных результатов показано, что трансгенные и нетрансгенные формы растений отвечают на абиотическое стрессовое воздействие увеличением содержания низкомолекулярных антиоксидантов, в частности аскорбата и глутатиона. Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный ген *acdS*, в меньшем количестве образуется пероксид водорода, который является одним из субстратов для аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы. Следовательно, данные формы растений имеют более низкую интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов по сравнению с нетрансгенными.

Полученные нами результаты об активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла согласуются с тем, что трансгенные растения *N. tabacum* в условиях загрязнения почвы Ni²⁺ характеризовались более низкой активностью ферментативных антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы) и интенсивностью процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными формами [19].

Нами установлено, что внесение в почву ионов никеля(II) приводило к повышению общей антиоксидантной активности исследуемых растений, как и в случае присутствия в почве ряда других тяжелых металлов (меди, хрома и свинца) [20].

Так, ранее нами было показано, что при внесении в почву солей Cu^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} трансгенные растения *N. tabacum* отличались более высоким содержанием низкомолекулярных компонентов (глутатиона, аскорбиновой кислоты) и более низкой активностью ферментов аскорбат-глутатионного цикла (аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы) по сравнению с нетрансгенными формами [21].

В литературе имеются данные, что трансгенные растения табака, характеризующиеся сверхэкспрессией супероксиддисмутазы, демонстрировали увеличение активности ферментов аскорбат-глутатионного цикла. Эти растения отличались повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, только если другие антиоксиданты (в частности, глутатион и аскорбат) также присутствовали в клетке в высоких концентрациях [8].

Следует отметить, что полученные данные согласуются с тем, что у ряда растений, инокулированных бактериями, которые несли ген *acdS* в своем геноме, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая активность ферментов аскорбат-глутатионного цикла. Так, например, растения кукурузы, инокулированные бактериями *P. putida*, в условиях засухи отличались более низкой активностью аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы по сравнению с неинокулированными растениями [10]. Растения картофеля, инокулированные бактериями *Bacillus* sp., содержащими фермент АЦК-деаминазу, при выращивании в условиях воздействия на почву тяжелых металлов имели более низкую активность аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы, чем неинокулированные растения картофеля, выращенные на загрязненной тяжелыми металлами почве [22].

Заключение

Таким образом, трансгенные растения, несущие в своем геноме бактериальный ген *acdS* и способные синтезировать АЦК-деаминазу, в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов никеля в почве. Необходимо отметить, что трансгенные растения *N. tabacum*, которые выращивались на загрязненной почве, имели лучшие ростовые характеристики (большую длину стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы [11].

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении общей антиоксидантной активности, повышении содержания глутатиона, аскорбиновой кислоты, возрастании активности ферментов аскорбат-глутатионного цикла в условиях абиотического стресса, вызванного обработкой почвы Ni^{2+} .

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

Библиографические ссылки

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.
2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(1):11–17. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2.
3. Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
4. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.
5. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008;51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.
6. Hontzeas N, Hontzeas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.
7. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
8. Young-Pyo Lee, Sun-Hyung Kim, Jae-Wook Bang, Haeng-Soon Lee, Sang-Soo Kwak, Suk-Yoon Kwon. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5):591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.
9. Вязов ЕВ, Козел НВ, Доманский ВП, Шалыго НВ. Активность аскорбат-глутатионного цикла в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях светодиодного освещения. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2014;1:78–83.
10. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.

11. Мельникова АА, Храмова ЕА, Королева ЕС, Руткевич ДА, Кукулянская ТА. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;1:45–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.
12. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC – fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):48–54. DOI: 10.1021/jf0305231.
13. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.
14. Sahoo S, Awasthi JP, Sunkar R, Panda SK. Determining glutathione levels in plants. In: Sunkar R, editor. *Plant stress tolerance. Methods and Protocols*. 2nd edition. New York: Humana Press; 2017. p. 273–277 (Methods in molecular biology; volume 1631). DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_16.
15. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
16. Starlin T, Gopalakrishnan VK. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn. – an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(supplement 4):68–71.
17. Kiran BR, Prasad MNV. Defense manifestations of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in *Ricinus communis* L. exposed to lead in hydroponics. *The EuroBiotech Journal*. 2019;3(3):117–127. DOI: 10.2478/ebtj-2019-0014.
18. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.
19. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Петрова СМ, Партач ДА, Халицкая АА. Изучение ряда показателей антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях загрязнения почвы ионами никеля(II). В: Тихомиров ВН, Поликсенова ВД, Карпук ВВ, Гельтман ДВ, Аначков Г, Сенников АН, редакторы. *Актуальные проблемы изучения и сохранения фито- и микобиоты. Материалы IV Международной научно-практической конференции, приуроченной к 100-летию кафедры ботаники БГУ; 31 мая 2021 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2021. с. 172–176.
20. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмова ЕА. Анализ содержания фенольных антиоксидантов и аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2020;1:20–26. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-20-26.
21. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмова ЕА. Изучение состояния компонентов аскорбат-глутатионного цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:11–18. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-11-18.
22. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2013;32(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

References

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.
2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(1):11–17. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2.
3. Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
4. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.
5. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008;51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.
6. Hontzeas N, Hontzeas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.
7. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
8. Young-Pyo Lee, Sun-Hyung Kim, Jae-Wook Bang, Haeng-Soon Lee, Sang-Soo Kwak, Suk-Yoon Kwon. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5):591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.
9. Viazau YV, Kozel NV, Domanskii VP, Shalygo NV. Activity of ascorbate-glutathione cycle in cucumber plants (*Cucumis sativus*) under led lighting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2014;1:78–83. Russian.
10. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.
11. Melnikava AA, Khramtsova AA, Karaleva KS, Rutkevich DA, Kukulianskaya TA. Expression analysis of *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:45–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.
12. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC – fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):48–54. DOI: 10.1021/jf0305231.
13. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.
14. Sahoo S, Awasthi JP, Sunkar R, Panda SK. Determining glutathione levels in plants. In: Sunkar R, editor. *Plant stress tolerance. Methods and Protocols*. 2nd edition. New York: Humana Press; 2017. p. 273–277 (Methods in molecular biology; volume 1631). DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_16.

15. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
16. Starlin T, Gopalakrishnan VK. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn. – an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(supplement 4):68–71.
17. Kiran BR, Prasad MNV. Defense manifestations of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in *Ricinus communis* L. exposed to lead in hydroponics. *The EuroBiotech Journal*. 2019;3(3):117–127. DOI: 10.2478/ebtj-2019-0014.
18. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.
19. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Petrova SM, Partach DA, Khalitskaya AA. Study of number indicators antioxidant system in transgenic *Nicotiana tabacum* plants under soil contamination with nickenl(II) ions. In: Tikhomirov VN, Poliksenova VD, Karpuk VV, Gel'tman DV, Anachkov G, Sennikov AN, editors. *Aktual'nye problemy izucheniya i sokhraneniya fito- i mikrobioty. Materialy IV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, priurochennoi k 100-letiyu kafedry botaniki BGU; 31 maya 2021 g.; Minsk, Belarus'* [Actual problems of studying and preserving phyto- and mycobiota. Materials of the 4th International scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the department of botany of the Belarusian State University; 2021 May 31; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2021. p. 172–176. Russian.
20. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. Analysis of the low-molecular weight antioxidants of transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:20–26. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-20-26.
21. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. Study of the ascorbate-glutathione cycle in transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:11–18. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-11-18.
22. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2013;32(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

Получена 19.11.2021 / исправлена 21.12.2022 / принята 21.12.2022.
Received 19.11.2021 / revised 21.12.2022 / accepted 21.12.2022.

ОРГАНО- И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ АНТИРАДИКАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА И СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ РОДА *TAXUS* spp.

С. Н. ФИЛИПОВА¹⁾, А. О. ЛОГВИНА¹⁾, Е. В. СПИРИДОВИЧ²⁾

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

²⁾Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2В, 220012, г. Минск, Беларусь

Проведен анализ антирадикальной активности, общего содержания растворимых фенольных соединений и уровня накопления флавоноидов в надземных и подземных органах и тканях представителей рода *Taxus* spp. (*T. baccata* L. cv. *Semperaurea*, *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. и *T. wallichiana* Zucc.), интродуцированных в Республике Беларусь. Выявлена зависимость величины антирадикальной активности и содержания анализируемых групп вторичных метаболитов от органной и тканевой локализации в растении. Установлено, что максимальная антирадикальная активность, а также наиболее высокий уровень накопления суммы растворимых фенольных соединений и флавоноидов наблюдаются в экстрактах вторичной покровной ткани (перидермы) корня интактных растений всех исследуемых видов *Taxus* spp. Так, антирадикальная активность экстрактов данного типа ткани *T. wallichiana* Zucc. составляла $(28,7 \pm 1,0)$ мг эквивалента аскорбиновой кислоты на 1 г сухой массы, *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. – $(26,1 \pm 0,8)$ мг эквивалента аскорбиновой кислоты на 1 г сухой массы, а *T. baccata* L. cv. *Semperaurea* – $(22,4 \pm 0,7)$ мг эквивалента аскорбиновой кислоты на 1 г сухой массы, что на 78–81 % превышало активность экстрактов корки ствола и на 42–64 % – активность экстрактов хвои. Содержание суммы фенольных соединений в экстрактах перидермы корней исследуемых растений варьировало от $(129,9 \pm 2,9)$ до $(154,2 \pm 4,3)$ мг эквивалента галловой кислоты на 1 г сухой массы и было максимальным у *T. wallichiana* Zucc. Наиболее высокий уровень накопления флавоноидов среди анализируемых экстрактов указанного типа ткани обнаружен у *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. $(13,0 \pm 0,4)$ мг эквивалента кверцетина на 1 г сухой массы).

Ключевые слова: *Taxus*; тис; фенольные соединения; флавоноиды; антирадикальная активность; метод DPPH; метод Фолина – Чокальтеу.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б20Р-236).

Образец цитирования:

Филиппова СН, Логвина АО, Спиридович ЕВ. Органо- и тканеспецифические особенности проявления антирадикального потенциала и содержания фенольных соединений в растениях рода *Taxus* spp. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:48–58.

For citation:

Filipava SN, Lohvina HO, Spiridovich EV. Organ- and tissue-specific variation in antiradical potential and phenolic compounds content in plants of the genus *Taxus* spp. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:48–58. Russian.

Авторы:

Светлана Николаевна Филиппова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

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

Елена Владимировна Спиридович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией прикладной биохимии отдела биохимии и биотехнологии растений.

Authors:

Sviatlana N. Filipava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

svetlan_rom@mail.ru

Hanna O. Lohvina, PhD (biology); associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

hanna.lohvina@gmail.com

Elena V. Spiridovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory of applied biochemistry, department of plant biochemistry and bioengineering.

a.spirydovich@gmail.com

ORGAN- AND TISSUE-SPECIFIC VARIATION IN ANTIRADICAL POTENTIAL AND PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN PLANTS OF THE GENUS *TAXUS* spp.

S. N. FILIPAVA^a, H. O. LOHVINA^a, E. V. SPIRIDOVICH^b

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

^bCentral Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus,
2B Surhanava Street, Minsk 220012, Belarus

Corresponding author: S. N. Filipava (svetlan_rom@mail.ru)

The paper presents the results of an investigation of the antiradical activity, total phenolic and flavonoid contents in aboveground and underground organs and tissues of *Taxus* spp. plants (*T. baccata* L. cv. Semperaurea, *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. and *T. wallichiana* Zucc.) introduced in the Republic of Belarus. The analysis indicates the dependence of antiradical activity value and the level of phenolic compounds on the organ- and tissue-specific localisation. Root periderm (secondary dermal tissue) extracts of all *Taxus* spp. species studied showed the best antiradical activity with the highest total phenolic and flavonoid contents. Thus, the extracts from the root periderm of *T. wallichiana* Zucc., *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. and *T. baccata* L. cv. Semperaurea had antiradical activity of (28.7 ± 1.0) , (26.1 ± 0.8) and (22.4 ± 0.7) mg ascorbic acid equivalent per 1 g dry weight, respectively, which was 78–81 % higher than the antioxidant activity of the trunk-bark extracts and 42–64 % higher than the activity of the needle extracts. The total phenolic content of the root periderm extracts of all investigated plants varied from (129.9 ± 2.9) to (154.2 ± 4.3) mg gallic acid equivalent per 1 g dry weight, and was found to be highest in the *T. wallichiana* Zucc. extract. The greatest flavonoid content was observed with extracts of the root periderm of *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. $((13.0 \pm 0.4)$ mg quercetin equivalent per 1 g dry weight).

Keywords: *Taxus*; yew; phenolic compounds; flavonoids; antiradical activity; DPPH method; Folin – Ciocalteu method.

Acknowledgements. The work was performed with financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project No. B20R-236).

Введение

Тис (*Taxus* spp.) – род вечнозеленых хвойных кустарников или деревьев высотой от 1 до 28 м с диаметром ствола до 1,5 м. Представители данного рода характеризуются медленным ростом и большой продолжительностью жизни (от 1500 до 4000 лет) [1]. Они широко распространены и естественно произрастают во влажных лесах умеренной зоны по всему миру, особенно вдоль побережий Тихого и Атлантического океанов, в регионе Великих озер Северной Америки, в Западной, Северной и Южной Европе, Алжире, юго-восточной части России, Восточном Китае, Непале, Бирме, Лаосе, Таиланде, Вьетнаме, Иране, на островах Суматра и Целебес [2]. Один из наиболее известных представителей данного рода – тис ягодный (*T. baccata* L.) – распространен спорадически почти по всей Северной и Западной Европе (от Скандинавии до Средиземноморья), на Кавказе, части территории Малой Азии и Северной Африки. В Альпах он произрастает на высоте до 1100–1400 м, в Пиренеях и Карпатах – до 1600, на Кавказе – до 1500, в Малой Азии – до 2300 м [1; 3; 4]. В Беларуси представители данного рода в естественных условиях произрастания не распространены и выращиваются только в культуре, к примеру, в Центральном ботаническом саду Национальной академии наук Беларуси (ЦБС НАН Беларуси).

Растения семейства Тахасеае рода *Taxus* spp., в том числе тис ягодный, – крайне ценное сырье для фармакологической промышленности. Это обусловлено присутствием в них дитерпеноида паклитаксела (Таксол®), который на сегодняшний день является одним из самых известных антинеопластических агентов [5]. При этом фитохимический состав представителей данного рода очень многообразен. Например, в древесине, коре и хвое, кроме ценных терпеноидов (паклитаксел и др.), содержатся стероиды (ситостерин, кампестерин), цианогенные соединения (таксифиллин), лигнаны (неолигнаны и терпенолигнаны), флавоноиды (в частности, димерный флавоноид аментофлавонол II типа и др.), дубильные вещества, витамины, высшие жирные кислоты и высшие алифатические спирты и иные классы соединений [6], в семенах присутствуют терпеновые алкалоиды (до 0,92 %) [7]. Такой широкий спектр фармакологически активных метаболитов закономерно обуславливает и потенциально высокое разнообразие биологических активностей у препаратов на основе растительного сырья *Taxus* spp. Так, например, в литературных источниках упоминается про их иммуномодулирующую, антимикробную, антимикотическую и анальгезирующую активности, а также жаропонижающее и противосудорожное действие [8]. В последние годы значительное внимание уделяется исследованию антиоксидантных свойств экстрактов, полученных из сырья представителей семейства Тахасеае [9].

Благодаря способности к снижению скорости генерации свободных радикалов и ингибированию перекисного окисления липидов биологических мембран, которое ведет к патологическим изменениям функции клеток, антиоксиданты играют важнейшую роль в механизмах протекторного действия в отношении клеток животных и растений [10]. Свободные радикалы постоянно образуются в аэробных организмах в результате нормальных физиологических процессов. Тем не менее их избыточное накопление может приводить к развитию различных патофизиологических состояний, включая сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера, диабет и т. д. [11]. Защита от окислительного стресса и хронических повреждений достигается благодаря функционированию ферментативных антиоксидантных систем и комплекса низкомолекулярных антиоксидантов. Как упоминалось выше, в растениях *Taxus* spp. синтезируется высокое количество соединений фенольной природы, в частности флавоноидов (антоцианы, катехины, флаваноны и т. п.), терпеноидов и др., которые являются сильными низкомолекулярными антиоксидантами [9; 11].

Важно отметить, что состав и количественное содержание ценных вторичных метаболитов в растениях *Taxus* spp. могут значительно варьировать у разных видов одного рода, а также в зависимости от условий и ареала произрастания [12; 13]. Например, известно, что у популяций растений *T. wallichiana* Zucc., которые растут в наиболее высоких горных регионах Гималаев, наблюдается повышенное содержание фармакологически ценных таксоидов по сравнению с их содержанием в растениях, произрастающих более низко [14]. Также уровень накопления определенных биологически активных соединений в растениях может значительно варьировать в зависимости от тканевой либо органной локализации [15].

До настоящего времени основное внимание исследователей уделялось преимущественно биохимическому анализу надземных органов [8; 16; 19] вида *T. baccata* L. [8; 17–19]. В связи с этим представлялось весьма актуальным проанализировать антирадикальную активность экстрактов и содержание фенольных соединений в различных тканях надземных и подземных органов растений *Taxus* spp. (*T. baccata* L. cv. *Semperaurea*, *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. и *T. wallichiana* Zucc.), интродуцированных на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. В исследовании использовали три вида растений рода *Taxus* spp., выращиваемых в коллекциях ЦБС НАН Беларуси, – *T. baccata* L. cv. *Semperaurea* (тис ягодный сорта Золотистый), *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. (тис остроконечный) и *T. wallichiana* Zucc. (тис Валлиха). Внешний вид данных растений представлен на рис. 1.

Биологический материал собирали с июня по август. Собранные гербарные образцы депонированы в гербарии ЦБС НАН Беларуси (MSKH). Для проведения сравнительного анализа органо- и тканеспецифического накопления фенольных соединений и антирадикальной активности использовались следующие образцы:

- 1) перидерма корня (вторичная покровная ткань (красновато-коричневая наружная часть коры корня));
- 2) центральный цилиндр корня;
- 3) корка ствола (ритидом (коричневая наружная отслаивающаяся пластинчатая часть коры));
- 4) хвоя (листья тиса);
- 5) ювенильные побеги (молодые побеги текущего года, включающие стебель и лист с недревесневшими ветками).

Следует отметить, что для анализа использовали корни 2–3-го года жизни диаметром 0,3–0,7 см, расположенные близко к поверхности почвы. Хвою (листья тиса) собирали со старых одревесневших побегов прошлых лет.

Приготовление спиртовых экстрактов. В работе получали водно-спиртовые экстракты различных частей растений тиса. Для этого образцы растительных тканей высушивали при 60 °С в сухожаровом шкафу с обдувом в течение 24 ч. Сухой растительный материал измельчали. Точную навеску высушенного растительного сырья (0,3 г) переносили в круглодонную колбу объемом 100 мл и добавляли к ней 30 мл 70 % этанола и центры кипения, после чего колбу взвешивали. Экстрагирование проводили в течение 120 мин при нагревании на водяной бане с обратным холодильником. Далее колбу с экстрактом охлаждали при комнатной температуре, взвешивали, при необходимости потерю в весе восполняли 70 % этанолом. Затем экстракт фильтровали через бумажный фильтр в стеклянные флаконы объемом 30 мл, плотно закрывали и хранили при 4 °С.

Анализ антирадикальной активности. Для определения антирадикальной активности экстрактов использовали спектрофотометрический метод, основанный на взаимодействии антиоксидантов со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (метод DPPH) [20], с небольшими модификациями [21]. Антирадикальную активность проб выражали в миллиграммах эквивалента аскорбиновой кислоты на грамм сухой массы (далее – мг АК/г сух. м.).



Рис. 1. Внешний вид растений *T. baccata* L. cv. Semperaurea (а), *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. (б) и *T. wallichiana* Zucc. (в)

Fig. 1. Visual appearance of *T. baccata* L. cv. Semperaurea (а), *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. (б) and *T. wallichiana* Zucc. (с)

Определение общего содержания фенольных соединений. В ходе количественного анализа фенолов в растительных объектах использовали метод Фолина – Чокальтеу [22]. Содержание суммы фенольных соединений в пробах определяли в пересчете на галловую кислоту [23] и выражали в миллиграммах эквивалента галловой кислоты на грамм сухой массы (далее – мг ГК/г сух. м.).

Определение содержания флавоноидов. Расчет суммарного количества флавоноидов проводили с помощью спектрофотометрического метода, основанного на реакции комплексообразования биофлавоноидов с хлоридом алюминия [24]. Содержание флавоноидов в пробах выражали в миллиграммах эквивалента кверцетина на грамм сухой массы (далее – мг Кв/г сух. м.).

Статистическая обработка данных. В работе представлены результаты трех опытов (биологические образцы каждого из вариантов собирались трижды, каждый из образцов подвергался экстракции в 3-кратной повторности). Эксперименты выполнялись в 4-кратной повторности. Обработку данных производили с помощью пакета статистического анализа программы *Microsoft Excel*. Основными статистическими характеристиками служили средняя арифметическая величина, среднее квадратическое отклонение, ошибка средней величины. Различия между средними показателями оценивались как достоверные при уровне значимости $p \leq 0,05$ (ANOVA-тест). Оценку линейной связи между двумя количественными переменными осуществляли с помощью коэффициента Пирсона (r_{xy}). Гипотезу о наличии достоверной положительной корреляции между анализируемым числом пар значений переменных (n) считали подтвержденной при $p < 0,05$. На диаграммах представлены средние значения $\pm$ ошибка средней величины.

Результаты и их обсуждение

Органы и ткани растений тиса, благодаря различному фитохимическому составу, могут характеризоваться разной способностью к проявлению антиоксидантной активности. Поэтому на первом этапе исследований представлялось актуальным провести сравнительный анализ одной из основных характеристик антиоксидантных свойств растительного сырья – антирадикальной активности экстрактов перидермы и центрального цилиндра корня, корки ствола, хвои и ювенильных побегов трех видов растений (*T. baccata* L. cv. Semperaurea, *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. и *T. wallichiana* Zucc.).

Антирадикальная активность экстрактов различных частей intactных растений *Taxus* spp. представлена на рис. 2. В результате проведенных экспериментов было показано, что максимальная антирадикальная активность наблюдалась в экстрактах перидермы корней всех исследуемых видов тиса и варьировала от $(28,7 \pm 1,0)$ мг АК/г сух. м. у *T. wallichiana* Zucc. до $(22,4 \pm 0,7)$ мг АК/г сух. м. у *T. baccata* L. cv. *Semperaurea*. Минимальный радикалингибирующий потенциал $(0,7–1,9)$ мг АК/г сух. м.) выявлен в случае вытяжек из тканей центрального цилиндра корней анализируемых растений. В частности, антирадикальная активность данных экстрактов была на 93–97 % меньше по сравнению с исследуемым типом активности экстрактов перидермы корня.

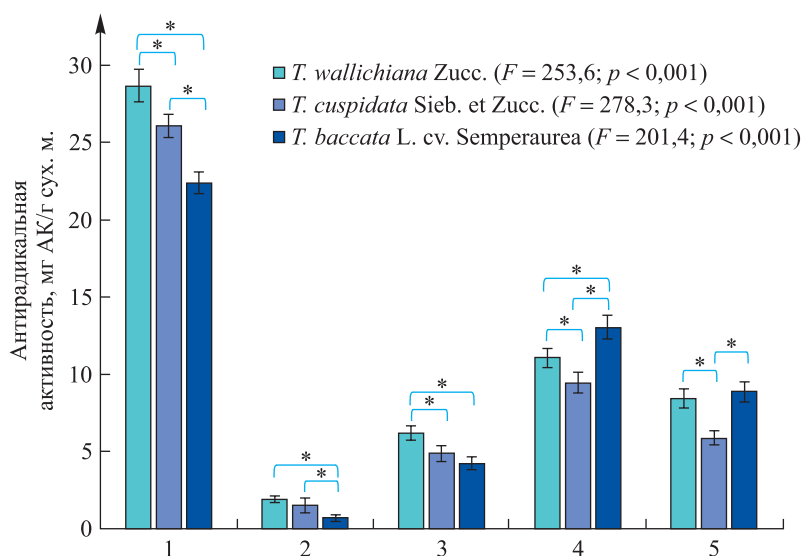


Рис. 2. Антирадикальная активность экстрактов различных частей *Taxus* spp.:
1 – перидерма корня, 2 – центральный цилиндр корня, 3 – корка ствола, 4 – хвоя, 5 – ювенильные побеги;
* – статистически значимо, $p < 0,05$ (межвидовые отличия отдельно для каждой части растения).
Для каждого вида тиса указаны значения F -критерия и уровня значимости p
(однофакторный дисперсионный анализ) (сравнение различных частей растений)

Fig. 2. Antiradical activity of the extracts from different parts of *Taxus* spp.:
1 – root periderm, 2 – root's central cylinder, 3 – trunk bark, 4 – needles, 5 – juvenile shoots;
* – statistically significant, $p < 0.05$ (interspecific differences separately for each part of the plant).
For each yew species, the value of F -statistic and the p -value are indicated
(one-way ANOVA) (comparison of different parts of plants)

При сравнительном анализе антирадикальной активности экстрактов хлорофиллсодержащих органов (хвои и ювенильных побегов) было отмечено, что наиболее высокий показатель исследуемой активности наблюдался в образцах, полученных из хвои *T. baccata* L. cv. *Semperaurea* ($(13,1 \pm 0,8)$ мг АК/г сух. м.), а наиболее низкий – в экстрактах ювенильных побегов *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. ($(5,9 \pm 0,5)$ мг АК/г сух. м.).

Антирадикальная активность образцов, полученных из корки ствола всех исследуемых видов тиса ($4,2–6,2$ мг АК/г сух. м.), была существенно менее выраженной по сравнению с данным типом активности образцов, полученных из перидермы корня (на 78–81 % ниже) и хвои (на 44–68 % ниже). В целом, как видно из рис. 2, значения радикалингибирующей активности экстрактов анализируемых органов и тканей у трех изучаемых видов тиса варьировали в сопоставимых пределах.

Антиоксидантная активность присуща многим группам вторичных метаболитов. Однако наиболее ярко она выражена у фенольных соединений [25]. Поэтому на втором этапе исследований был проведен сравнительный анализ содержания суммы растворимых фенолов и флавоноидов в перидерме и центральном цилиндре корня, корке ствола, хвое и ювенильных побегах трех видов растений рода *Taxus* spp.

Исходя из полученных данных, для изучаемых видов тиса наблюдалась общая закономерность в локализации накопления фенолов (рис. 3). Было установлено, что максимальное их содержание у всех исследуемых видов растений обнаруживалось в перидерме корня. Так, в экстрактах перидермы *T. wallichiana* Zucc. этот показатель составлял $(154,2 \pm 4,3)$ мг ГК/г сух. м., *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. – $(140,8 \pm 3,8)$ мг ГК/г сух. м., а *T. baccata* L. cv. *Semperaurea* – $(129,9 \pm 2,9)$ мг ГК/г сух. м., в то время как в корке ствола уровень накопления фенольных соединений был на 71–82 % ниже по сравнению с содержанием данного класса метаболитов в перидерме корня.

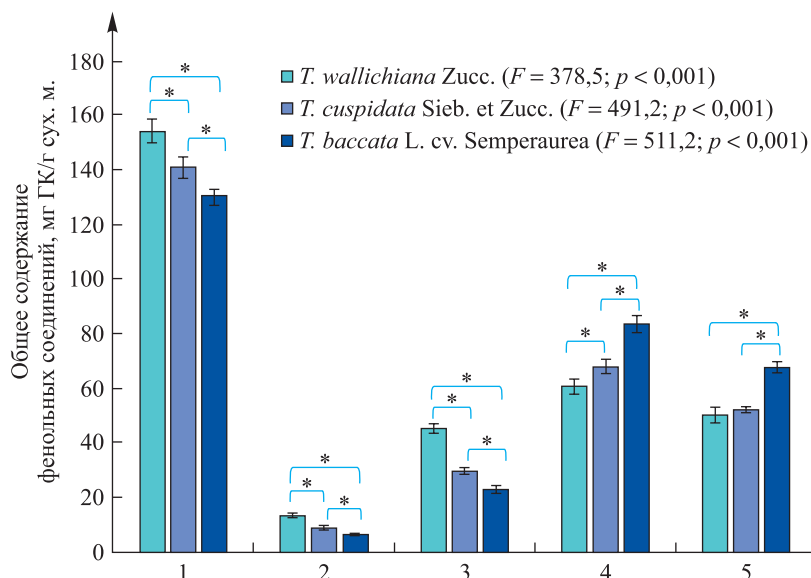


Рис. 3. Общее содержание фенольных соединений в различных частях *Taxus* spp.:
1 – перидерма корня, 2 – центральный цилиндр корня, 3 – корка ствола, 4 – хвоя, 5 – ювенильные побеги;
* – статистически значимо, $p < 0,05$ (межвидовые отличия отдельно для каждой части растения).
Для каждого вида тиса указаны значения F -критерия и уровня значимости p
(однофакторный дисперсионный анализ) (сравнение различных частей растений)

Fig. 3. Total phenolic content in different parts of *Taxus* spp.:
1 – root periderm, 2 – root's central cylinder, 3 – trunk-bark, 4 – needles, 5 – juvenile shoots;
* – statistically significant, $p < 0.05$ (interspecific differences separately for each part of the plant).
For each yew species, the value of F -statistic and the p -value are indicated
(one-way ANOVA) (comparison of different parts of plants)

Экстракты центрального цилиндра корней всех исследуемых видов тиса характеризовались наименьшим содержанием фенольных соединений по сравнению с остальными экстрактами изучаемых органов и тканей. В данном случае этот показатель варьировал в диапазоне от $(6,3 \pm 0,5)$ мг ГК/г сух. м. у *T. baccata* L. cv. Semperaurea до $(13,4 \pm 1,0)$ мг ГК/г сух. м. у *T. wallichiana* Zucc., что было на 95 и 91 % меньше, чем в перидерме корня указанных видов тиса. Кроме того, стоит отметить, что в перидерме и центральном цилиндре корня, а также в корке ствола максимальное содержание фенолов выявлено в экстрактах *T. wallichiana* Zucc., а минимальное – в экстрактах *T. baccata* L. cv. Semperaurea.

Анализ содержания суммы растворимых фенольных соединений в ювенильных побегах тиса показал, что оно изменялось от $(50,0 \pm 2,7)$ и $(52,4 \pm 1,3)$ мг ГК/г сух. м. у *T. wallichiana* Zucc. и *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. соответственно до $(67,8 \pm 2,0)$ мг ГК/г сух. м. у *T. baccata* L. cv. Semperaurea. В хвое уровень накопления данных метаболитов был несколько выше, чем в ювенильных побегах. Так, суммарное содержание фенолов в экстрактах хвои составляло $(60,7 \pm 2,7)$, $(67,9 \pm 2,7)$ и $(83,5 \pm 3,7)$ мг ГК/г сух. м. у *T. wallichiana* Zucc., *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. и *T. baccata* L. cv. Semperaurea соответственно. Следует отметить, что при сравнительном анализе накопления фенолов у трех изучаемых видов тиса в хлорофиллсодержащих органах (хвоя и ювенильных побегах) более высокое содержание исследуемого класса вторичных метаболитов выявлено у *T. baccata* L. cv. Semperaurea, а в перидерме, центральном цилиндре корня и корке ствола – у *T. wallichiana* Zucc.

Сравнительный анализ содержания суммы флавоноидов в различных частях интактных растений *Taxus* spp. показал, что максимальный их уровень, как и в случае антирадикальной активности экстрактов и общего накопления фенольных соединений, обнаруживался в перидерме корня всех изучаемых видов (рис. 4). При этом наиболее высокое содержание флавоноидов $(13,0 \pm 0,4)$ мг Кв/г сух. м. было выявлено в перидерме корня *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. В экстрактах данного типа ткани *T. wallichiana* Zucc. уровень накопления флавоноидов составлял $(11,2 \pm 0,2)$ мг Кв/г сух. м., а *T. baccata* L. cv. Semperaurea – $(8,4 \pm 0,3)$ мг Кв/г сух. м.

Помимо этого, довольно высокое содержание $(6,1–7,7)$ мг Кв/г сух. м. исследуемого класса метаболитов выявлено в хвое растений тиса. Причем разница в накоплении флавоноидов между перидермой корня и хвоей у *T. wallichiana* Zucc. и *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. была существенно более значительной (41–46 %), чем у *T. baccata* L. cv. Semperaurea (15 %). По сравнению с содержанием изучаемых соединений в хвое их уровень в ювенильных побегах был ниже на 57–73 % и составлял 2,1–2,6 мг Кв/г сух. м. Важно отметить, что, как и в случае суммы фенольных соединений, содержание флавоноидов в корке

ствола исследуемых растений *Taxus* spp. также было существенно ниже по сравнению с их содержанием в перидерме корня: различия составляли 60; 70 и 73 % для *T. wallichiana* Zucc., *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. и *T. baccata* L. cv. *Semperaurea* соответственно. Наименьшим уровнем накопления флавоноидов отличался центральный цилиндр корня. Так, например, содержание исследуемых соединений в данной части растений тиса было на 95 % ниже (для всех видов), чем в перидерме корня.

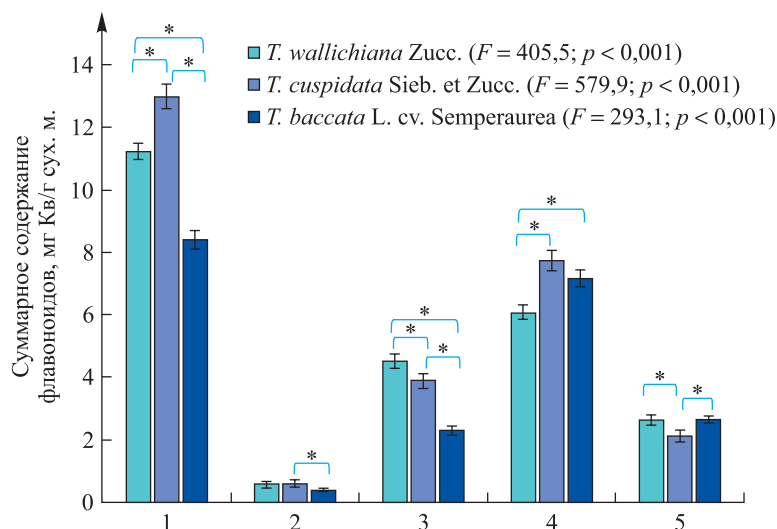


Рис. 4. Суммарное содержание флавоноидов в различных частях *Taxus* spp.:
1 – перидерма корня, 2 – центральный цилиндр корня, 3 – корка ствола, 4 – хвоя, 5 – ювенильные побеги;
* – статистически значимо, $p < 0,05$ (межвидовые отличия отдельно для каждой части растения).

Для каждого вида тиса указаны значения F -критерия и уровни значимости p (однофакторный дисперсионный анализ) (сравнение различных частей растений)

Fig. 4. Flavonoid content in different parts of *Taxus* spp.:

1 – root periderm, 2 – root's central cylinder, 3 – trunk bark, 4 – needles, 5 – juvenile shoots;

* – statistically significant, $p < 0.05$ (interspecific differences separately for each part of the plant).

For each yew species, the value of F -statistic and the p -value are indicated (one-way ANOVA) (comparison of different parts of plants)

Далее нами был проведен статистический корреляционный анализ для установления связи между исследуемыми наборами данных (антирадикальная активность, содержание фенольных соединений и флавоноидов). Результаты корреляционного анализа при оценке характера взаимосвязи между общим содержанием фенольных соединений и накоплением флавоноидов в органах и тканях растений различных видов *Taxus* spp. представлены в табл. 1. Проведенный корреляционный анализ показал сильную положительную связь между общим содержанием фенолов и уровнем флавоноидов ($p < 0,05$).

Таблица 1

Данные корреляционного анализа взаимосвязи
между общим содержанием фенольных соединений
и накоплением флавоноидов в органах и тканях растений *Taxus* spp.

Table 1

Data of correlation analysis of the relationship between total phenolic content
and flavonoid content in the organs and tissues of *Taxus* spp. plants

Объекты	r_{xy}	n	p
<i>T. wallichiana</i> Zucc.	0,961	5	<0,05
<i>T. cuspidata</i> Sieb. et Zucc.	0,943	5	<0,05
<i>T. baccata</i> L. cv. <i>Semperaurea</i>	0,926	5	<0,05

Кроме того, была оценена взаимосвязь антирадикальной активности экстрактов с общим содержанием фенольных соединений и флавоноидов (табл. 2, 3). В данном случае также выявлена линейная корреляция между антирадикальными свойствами экстрактов и содержанием фенольных соединений, антирадикальной активностью и суммой флавоноидов у всех исследуемых видов тиса. Таким образом,

наблюдаемое сходство в закономерностях проявлений антирадикальной активности экстрактов, уровнях суммы фенольных соединений и содержании флавоноидов в различных органах и тканях у трех исследуемых видов тиса подтверждают данные проведенного корреляционного анализа. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которыми также была выявлена положительная корреляционная связь между антирадикальной активностью и содержанием суммы флавоноидов в экстрактах хвои *T. baccata* L. [8; 19].

Таблица 2

Данные корреляционного анализа взаимосвязи
между общим содержанием фенольных соединений в органах
и тканях растений *Taxus* spp. и антирадикальной активностью их экстрактов

Table 2

Data of correlation analysis of the relationship
between total phenolic content in the organs and tissues
of *Taxus* spp. plants and antiradical activity of their extracts

Объекты	r_{xy}	n	p
<i>T. wallichiana</i> Zucc.	0,996	5	<0,05
<i>T. cuspidata</i> Sieb. et Zucc.	0,981	5	<0,05
<i>T. baccata</i> L. cv. Semperaurea	0,989	5	<0,05

Таблица 3

Данные корреляционного анализа взаимосвязи
между содержанием флавоноидов в органах и тканях
растений *Taxus* spp. и антирадикальной активностью их экстрактов

Table 3

Data of correlation analysis of the relationship
between flavonoid content in the organs and tissues
of *Taxus* spp. plants and antiradical activity of their extracts

Объекты	r_{xy}	n	p
<i>T. wallichiana</i> Zucc.	0,953	5	<0,05
<i>T. cuspidata</i> Sieb. et Zucc.	0,951	5	<0,05
<i>T. baccata</i> L. cv. Semperaurea	0,946	5	<0,05

Как известно, флавоноиды являются важнейшими уникальными неферментными антиоксидантами, способными прямо или косвенно ослаблять либо предупреждать клеточные повреждения, вызываемые свободными радикалами [26]. Этот факт, а также результаты проведенных нами экспериментов позволяют предположить, что флавоноиды и вещества фенольной природы в целом играют первостепенную роль в антиоксидантной защите клеток растений тиса, несмотря на то, что, кроме широкого спектра фенольных соединений, в древесине, коре и хвое тиса содержатся биологически активные терпеноиды, стероиды, цианогенные соединения, лигнаны, дубильные вещества и другие соединения [6].

Стимуляция биосинтеза антиоксидантных соединений в клетках растений наблюдается при воздействии различных стрессовых факторов, таких как избыточная интенсивность освещения для предотвращения фотооксидативного повреждения, пониженная температура, УФ-облучение, влияние патогенов, засоление и ранения [27]. Например, при воздействии патогенов растения производят вещества, подавляющие их размножение и рост (терпеноиды, смолы, дубильные вещества и алкалоиды). Согласно литературным данным, большинство из этих соединений могут накапливаться в вакуолях и клеточных стенках покровных тканей [28]. Так, в исследованиях отдельных авторов показано, что в перидерме корня *Taxus × media* Rehd. сорта Брауни концентрация противоопухолевого вещества (таксола) была в 1,5 раза выше, чем в хвое растения [29].

На основании данных литературы, а также результатов проведенных нами исследований можно предположить, что именно у периферической части корневой системы растений *Taxus* spp. может реализовываться наиболее мощная программа защиты от различных стрессовых факторов окружающей среды. В частности, высокое содержание фенольных соединений в перидерме корней у исследованных представителей рода *Taxus* spp. может объясняться важнейшей ролью данной ткани в защите растений от проникновения почвенных патогенных микроорганизмов.

Заклучение

Таким образом, для *T. baccata* L. cv. *Semperaurea*, *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. и *T. wallichiana* Zucc., интродуцированных в Республике Беларусь, отмечены органо- и тканеспецифические особенности проявления антирадикальной активности и содержания суммы фенольных соединений и флавоноидов в зависимости от локализации в растении. В результате проведенного биохимического анализа экстрактов надземных и подземных органов и тканей растений *Taxus* spp. установлено, что наиболее высокие уровни антирадикальной активности, содержания суммы растворимых фенольных соединений и флавоноидов были характерны для перидермы корней. Так, антирадикальная активность в перидерме корней *T. wallichiana* Zucc. составляла ($28,7 \pm 1,0$) мг АК/г сух. м., *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. – ($26,1 \pm 0,8$) мг АК/г сух. м., а *T. baccata* L. cv. *Semperaurea* – ($22,4 \pm 0,7$) мг АК/г сух. м., что на 78–81 % выше активности экстрактов корки ствола и на 42–64 % выше активности экстрактов хвои. В экстрактах перидермы корня содержание суммы фенольных соединений варьировало в пределах от ($129,9 \pm 2,9$) мг ГК/г сух. м. у *T. baccata* L. cv. *Semperaurea* до ($154,2 \pm 4,3$) мг ГК/г сух. м. у *T. wallichiana* Zucc. Максимальное накопление флавоноидов обнаружено в перидерме корня *T. cuspidata* Sieb. et Zucc. ($13,0 \pm 0,4$) мг Кв/г сух. м.). Самая слабая способность к нейтрализации свободных радикалов и наиболее низкое содержание фенольных соединений и флавоноидов были характерны для экстрактов центрального цилиндра корня.

Полученные данные могут служить основой для прогнозирования биологических активностей экстрактов тканей и органов различных представителей растений семейства Тахасеае, произрастающих в других регионах мира, а также при разработке биотехнологических подходов к получению фармакологически ценных метаболитов, оценке потенциала объектов *in vitro*, способствуя рациональному использованию природного растительного сырья интактных растений *Taxus* spp.

Библиографические ссылки

1. Белосельская ЗГ, Васильев ЯЯ, Ванин СИ, Воинов ГВ, Забелин ИА, Лапин ПИ и др., составители. *Деревья и кустарники СССР: дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Том I. Голосеменные*. Соколов СЯ, Шишкин БК, редакторы. Москва: Издательство Академии наук СССР; 1949. 462 с.
2. DeLong JM, Prange RK. *Taxus* spp.: botany, horticulture, and source of anti-cancer compounds. In: Janick J, editor. *Horticultural Reviews. Volume 32*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2006. p. 299–327.
3. Поляков АК, Суслова ЕП. *Хвойные на юго-востоке Украины*. Донецк: Норд-пресс; 2004. 197 с.
4. Patel RN. Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis. *Annual Review of Microbiology*. 1998;52:361–395. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.361.
5. Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, et al. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(1):227–231. DOI: 10.1073/pnas.0406361102.
6. Shirmohammadli Y, Hosseinihashemi SK, Jalaligoldeh A, Efhamisisi D, Mousavinezhad SH. Chemical composition of *Taxus baccata* L. leaves and male cones water: methanol extracts. *Celal Bayar University Journal of Science*. 2020;16(3):251–255. DOI: 10.18466/cbayarfb.689482.
7. Baloglu E, Kingston DGI. The taxane diterpenoids. *Journal of Natural Products*. 1999;62(10):1448–1472. DOI: 10.1021/np990176i.
8. Bekhouche M, Benyammi R, Khelifi Slaoui M, Khelifi L, Morsli A. Free radical scavenging activity and detailed flavonoid profiling of algerian yew (*Taxus baccata* L.) by LC-ESI-MS/MS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2021;12(5):2613–2619. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.12(5).2613-19.
9. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97:55–74. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
10. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;9829176. DOI: 10.1155/2020/9829176.
11. Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19(31):5319–5341. DOI: 10.2174/092986712803833335.
12. Wheeler NC, Jech K, Masters S, Brobst SW, Alvarado AB, Hoover AJ, et al. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. *Journal of Natural Products*. 1992;55(4):432–440. DOI: 10.1021/np50082a005.
13. Chunna Yu, Xijun Luo, Xiaori Zhan, Juan Hao, Lei Zhang, Yao-Bin L Song, et al. Comparative metabolomics reveals the metabolic variations between two endangered *Taxus* species (*T. fuana* and *T. yunnanensis*) in the Himalayas. *BMC Plant Biology*. 2018;18:197. DOI: 10.1186/s12870-018-1412-4.
14. Mukherjee S, Ghosh B, Jha TB, Jha S. Variation in content of taxol and related taxanes in Eastern Himalayan populations of *Taxus wallichiana*. *Planta Medica*. 2002;68(8):757–759. DOI: 10.1055/s-2002-33808.
15. Vidensek N, Lim P, Campbell A, Carlson C. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *Journal of Natural Products*. 1990;53(6):1609–1610. DOI: 10.1021/np50072a039.
16. Ahmad M, Yaseen M, Bhat A, Ganai BA, Zargar MA, Ganie SA, et al. *Taxus wallichiana* as a potential *in vitro* antioxidant with good lethal effect on pathogenic bacterial strains. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 2015;3(3):209–221.
17. Prakash V, Rana S, Sagar A. Analysis of antibacterial and antioxidant activity of *Taxus baccata* Linn. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2018;6(5 part A):40–44.

18. Tabaszewska M, Antoniewska A, Rutkowska J, Skoczylas Ł, Słupski J, Skoczeń-Słupska R. Bioactive components, volatile profile and *in vitro* antioxidative properties of *Taxus baccata* L. red arils. *Molecules*. 2021;26(15):4474. DOI: 10.3390/molecules26154474.
19. Milutinović MG, Stanković MS, Cvetković DM, Topuzović MD, Mihailović VB, Marković SD. Antioxidant and anticancer properties of leaves and seed cones from European yew (*Taxus baccata* L.). *Archives of Biological Sciences*. 2015;67(2):525–534. DOI: 10.2298/ABS141006015M.
20. Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze R, Ruser A, Hansen U-P. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*. 2007;7(10):2080–2095. DOI: 10.3390/s7102080.
21. Lohvina H, Sándor M, Wink M. Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic composition by HPLC-ESI-MS. *Diversity*. 2022;14(1):7. DOI: 10.3390/d14010007.
22. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1977;28(1):49–55.
23. Parthasarathy S, Azizi JB, Ramanathan S, Ismail S, Sasidharan S, Said MIM, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae family) leaves. *Molecules*. 2009;14(10):3964–3974. DOI: 10.3390/molecules14103964.
24. Гаврилин МВ, Попова ОИ, Губанова ЕА. Фенольные соединения надземной части шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), культивируемого в Ставропольском крае. *Химия растительного сырья*. 2010;4:99–104.
25. Stagos D. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. *Antioxidants*. 2020;9(1):19. DOI: 10.3390/antiox9010019.
26. Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000;63(7):1035–1042. DOI: 10.1021/np9904509.
27. Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*. 2002;155(3):349–361. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x.
28. Sz wajkowska-Michalek L, Przybylska-Balcerek A, Rogoziński T, Stuper-Szablewska K. Phenolic compounds in trees and shrubs of Central Europe. *Applied Sciences*. 2020;10(19):6907. DOI: 10.3390/app10196907.
29. Wickremesinhe ERM, Artea RN. Roots of hydroponically grown *Taxus* plants as a source of taxol and related taxanes. *Plant Science*. 1994;101(2):125–135. DOI: 10.1016/0168-9452(94)90248-8.

References

1. Belosel'skaya ZG, Vasil'ev YaYa, Vanin SI, Voinov GV, Zabelin IA, Lapin PI, et al., compilers. *Derev'ya i kustarniki SSSR: dikorastushchie, kul'tiviruemye i perspektivnye dlya introduksii. Tom 1. Golosemennye* [Trees and shrubs of the USSR: growing wild, cultivated and promising for introduction. Volume 1. Gymnosperms]. Sokolov SYa, Shishkin BK, editors. Moscow: Izdatel'stvo Akademii nauk SSSR; 1949. 462 p. Russian.
2. DeLong JM, Prange RK. *Taxus* spp.: botany, horticulture, and source of anti-cancer compounds. In: Janick J, editor. *Horticultural Reviews. Volume 32*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2006. p. 299–327.
3. Polyakov AK, Suslova EP. *Khvoynye na yugo-vostoke Ukrainy* [Coniferous trees in the south-east of Ukraine]. Donetsk: Nordpress; 2004. 197 p. Russian.
4. Patel RN. Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis. *Annual Review of Microbiology*. 1998;52:361–395. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.361.
5. Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, et al. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(1):227–231. DOI: 10.1073/pnas.0406361102.
6. Shirmohammadli Y, Hosseinihashemi SK, Jalaligoldeh A, Efhamisizi D, Mousavinezhad SH. Chemical composition of *Taxus baccata* L. leaves and male cones water: methanol extracts. *Celal Bayar University Journal of Science*. 2020;16(3):251–255. DOI: 10.18466/cbayarfb.689482.
7. Baloglu E, Kingston DGI. The taxane diterpenoids. *Journal of Natural Products*. 1999;62(10):1448–1472. DOI: 10.1021/np990176i.
8. Bekhouche M, Benyammi R, Khelifi Slaoui M, Khelifi L, Morsli A. Free radical scavenging activity and detailed flavonoid profiling of algerian yew (*Taxus baccata* L.) by LC-ESI-MS/MS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2021;12(5):2613–2619. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.12(5).2613-19.
9. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97:55–74. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
10. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;9829176. DOI: 10.1155/2020/9829176.
11. Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19(31):5319–5341. DOI: 10.2174/092986712803833335.
12. Wheeler NC, Jech K, Masters S, Brobst SW, Alvarado AB, Hoover AJ, et al. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. *Journal of Natural Products*. 1992;55(4):432–440. DOI: 10.1021/np50082a005.
13. Chunna Yu, Xiujun Luo, Xiaori Zhan, Juan Hao, Lei Zhang, Yao-Bin L Song, et al. Comparative metabolomics reveals the metabolic variations between two endangered *Taxus* species (*T. fuana* and *T. yunnanensis*) in the Himalayas. *BMC Plant Biology*. 2018;18:197. DOI: 10.1186/s12870-018-1412-4.
14. Mukherjee S, Ghosh B, Jha TB, Jha S. Variation in content of taxol and related taxanes in Eastern Himalayan populations of *Taxus wallichiana*. *Planta Medica*. 2002;68(8):757–759. DOI: 10.1055/s-2002-33808.
15. Vidensek N, Lim P, Campbell A, Carlson C. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *Journal of Natural Products*. 1990;53(6):1609–1610. DOI: 10.1021/np50072a039.

16. Ahmad M, Yaseen M, Bhat A, Ganai BA, Zargar MA, Ganie SA, et al. *Taxus wallichiana* as a potential *in vitro* antioxidant with good lethal effect on pathogenic bacterial strains. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 2015;3(3):209–221.
17. Prakash V, Rana S, Sagar A. Analysis of antibacterial and antioxidant activity of *Taxus baccata* Linn. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2018;6(5 part A):40–44.
18. Tabaszewska M, Antoniewska A, Rutkowska J, Skoczylas Ł, Słupski J, Skoczeń-Słupska R. Bioactive components, volatile profile and *in vitro* antioxidative properties of *Taxus baccata* L. red arils. *Molecules*. 2021;26(15):4474. DOI: 10.3390/molecules26154474.
19. Milutinović MG, Stanković MS, Cvetković DM, Topuzović MD, Mihailović VB, Marković SD. Antioxidant and anticancer properties of leaves and seed cones from European yew (*Taxus baccata* L.). *Archives of Biological Sciences*. 2015;67(2):525–534. DOI: 10.2298/ABS141006015M.
20. Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze R, Ruser A, Hansen U-P. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*. 2007;7(10):2080–2095. DOI: 10.3390/s7102080.
21. Lohvina H, Sándor M, Wink M. Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic composition by HPLC-ESI-MS. *Diversity*. 2022;14(1):7. DOI: 10.3390/d14010007.
22. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1977;28(1):49–55.
23. Parthasarathy S, Azizi JB, Ramanathan S, Ismail S, Sasidharan S, Said MIM, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae family) leaves. *Molecules*. 2009;14(10):3964–3974. DOI: 10.3390/molecules14103964.
24. Gavrilin MV, Popova OI, Gubanov EA. [Phenolic compounds of the aboveground part of nutmeg sage (*Salvia sclarea* L.) cultivated in the Stavropol Territory]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2010;4:99–104. Russian.
25. Stagos D. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. *Antioxidants*. 2020;9(1):19. DOI: 10.3390/antiox9010019.
26. Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000;63(7):1035–1042. DOI: 10.1021/np9904509.
27. Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*. 2002;155(3):349–361. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x.
28. Szwajkowska-Michalek L, Przybylska-Balcerek A, Rogoziński T, Stuper-Szablewska K. Phenolic compounds in trees and shrubs of Central Europe. *Applied Sciences*. 2020;10(19):6907. DOI: 10.3390/app10196907.
29. Wickremesinhe ERM, Arteca RN. Roots of hydroponically grown *Taxus* plants as a source of taxol and related taxanes. *Plant Science*. 1994;101(2):125–135. DOI: 10.1016/0168-9452(94)90248-8.

Получена 05.01.2022 / исправлена 19.01.2022 / принята 19.01.2022.
Received 05.01.2022 / revised 19.01.2022 / accepted 19.01.2022.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.64

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОДАВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА БАКТЕРИОФАГАМИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

**Н. В. БЕСАРАБ¹⁾, А. Л. ЛАГОНЕНКО¹⁾, М. А. ЛЕТАРОВА²⁾,
А. К. ГОЛОМИДОВА²⁾, Е. Е. КУЛИКОВ²⁾, А. В. ЛЕТАРОВ²⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾**

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

²⁾Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского
Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
пр. 60-летия Октября, 7, корп. 2, 117312, г. Москва, Россия

Образец цитирования:

Бесараб НВ, Лагоненко АЛ, Летарова МА, Голомидова АК, Куликов ЕЕ, Летаров АВ, Евтушенков АН. Исследование эффективности подавления бактериального ожога бактериофагами в лабораторных условиях. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:59–69.

For citation:

Besarab NV, Lagonenko AL, Letarova MA, Golomidova AK, Kulikov EE, Letarov AV, Evtushenkov AN. Study of the efficiency of suppressing fire blight by bacteriophages under laboratory conditions. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022; 1:59–69. Russian.

Авторы:

Наталья Васильевна Бесараб – аспирантка кафедры молекулярной биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. Н. Евтушенков.

Александр Леонидович Лагоненко – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Мария Анатольевна Летарова – младший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов.

Алла Константиновна Голомидова – кандидат биологических наук; научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов.

Евгений Евгеньевич Куликов – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник, заместитель заведующего лабораторией вирусов микроорганизмов.

Андрей Викторович Летаров – доктор биологических наук; заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов.

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

Authors:

Natalya V. Besarab, postgraduate student at the department of molecular biology, faculty of biology.

natal-vasilna@rambler.ru

Alexander L. Lagonenko, PhD (biology), docent; associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology.

Maria A. Letarova, junior researcher at the laboratory of microbial viruses.

Alla K. Golomidova, PhD (biology); researcher at the laboratory of microbial viruses.

Evgeny E. Kulikov, PhD (biology); senior researcher and deputy head of the laboratory of microbial viruses.

Andrey V. Letarov, doctor of science (biology); head of the laboratory of microbial viruses.

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

В качестве биологического средства контроля бактериального ожога исследованы бактериофаги *Erwinia amylovora* Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka и VyarbaS на модельных объектах – цветках и листьях груши. При обработке бактериофагом за 1 ч до инокуляции *E. amylovora* 1/79Sm статистически значимых отличий в симптомах по сравнению с контролем не обнаружено. Однако отмечено снижение титра патогена на 1–3 порядка при содержании в инокуляте 10^6 – 10^8 КОЕ/мл *E. amylovora* и обработке бактериофагом за 1 ч до заражения патогеном.

Ключевые слова: бактериальный ожог; бактериофаги; *Erwinia amylovora*; груша; защита растений.

STUDY OF THE EFFICIENCY OF SUPPRESSING FIRE BLIGHT BY BACTERIOPHAGES UNDER LABORATORY CONDITIONS

N. V. BESARAB^a, A. L. LAGONENKO^a, M. A. LETAROVA^b,
A. K. GOLOMIDOVA^b, E. E. KULIKOV^b, A. V. LETAROV^b, A. N. EVTUSHENKOV^a

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

^bWinogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology»,
Russian Academy of Sciences, 7 60-letiya Oktyabrya Avenue, 2 building, Moscow 117312, Russia

Corresponding author: N. V. Besarab (natal-vasilna@rambler.ru)

Erwinia amylovora bacteriophages Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka and VyarbaS were studied as a biological fire blight control agents on model objects – pear flowers and leaves. When treated with a bacteriophage 1 h before inoculation with *E. amylovora* 1/79Sm, no statistically significant differences in symptoms were found compared to the control. However, a decrease in the titer of the pathogen by 1–3 orders of magnitude was shown with *E. amylovora* in the inoculum of 10^6 – 10^8 CFU/mL and treatment with a bacteriophage 1 h before infection with the pathogen.

Keywords: fire blight; bacteriophages; *Erwinia amylovora*; pear; plant protection.

Введение

Карантинный вид бактерий *Erwinia amylovora* – возбудитель бактериального ожога – имеет широкое географическое распространение и является вредоносным фитопатогеном, поражающим важные плодовые и декоративные культуры семейства Rosaceae. Наиболее восприимчивы к болезни молодые и интенсивно растущие растения. Первичное инфицирование происходит весной в период цветения. Перенос фитопатогена на растения осуществляется насекомыми или дождевой водой [1; 2]. Следует отметить, что распространение некроза по растению может проходить в течение всего лета [1]. Методами ПЦР, а также визуализации биолюминесценции и флуоресценции меченых клеток бактерий показано перемещение *E. amylovora* по растению из побегов в нижние части и корни [3; 4]. Кроме того, выявлены миграция *E. amylovora* и поражение надземных частей бактериальным ожогом при непосредственном заражении корней груши [5]. В связи с вышеперечисленными особенностями патогенеза *E. amylovora* эффективность контроля бактериального ожога будет зависеть от возможности подавления размножения бактерий в недоступных частях растений, где идет скрытое, бессимптомное развитие болезни. Методами контроля бактериального ожога традиционно являются агротехнические приемы и использование спреев химических агентов, таких как антибиотики и медьсодержащие соединения [6–8]. Успех применения химических агентов зависит от возможности обеспечения непосредственного их контакта с клетками фитопатогена, что осуществимо на эпифитной стадии болезни. Кроме того, несмотря на модификации способа доставки препарата химического агента в растение для контроля бактериального ожога (инъекции в ствол дерева), в литературе описана более низкая эффективность стволовых инъекций стрептомицина по сравнению с применением антибиотика в виде спрея [9]. Исследуемые в настоящее время естественные антагонисты бактерий – бактериофаги – обладают рядом преимуществ использования для контроля бактериозов по сравнению с химическими агентами. К преимуществам бактериофагов относятся природное происхождение, специфичность действия, присутствие в среде до элиминации бактерий-хозяев, способность к саморепликации [10]. Умножение числа бактериофагов при наличии бактерий-хозяев увеличивает шансы контакта бактериофага с бактериальными клетками. Кроме

того, в экспериментах по обработке корней, листьев и стеблей было показано перемещение бактериофагов *E. amylovora* в восходящем и нисходящем направлениях [11; 12], что позволяет предполагать перспективность использования бактериофагов для эндогенного контроля *E. amylovora*. Также в настоящее время исследователями рассматриваются ряд стратегий по преодолению возможных трудностей применения биопрепаратов на основе бактериофагов (подбор вирулентных бактериофагов с перекрестной специфичностью для коктейлей, разработка фотопротекторных смесей для аэрозолей биопрепаратов и т. д.) [13].

Необходимо отметить, что имеющихся на сегодняшний день экспериментальных данных по обработке растений бактериофагами в качестве средства борьбы с бактериальным ожогом недостаточно для подтверждения удовлетворительной эффективности препаратов на их основе. Кроме того, эксперименты в различных литературных источниках заметно отличаются как по времени обработки бактериофагом и способу внесения инокулята *E. amylovora*, так и по стартовым титрам суспензий бактериофага и бактерий [14–18]. Таким образом, настоящее исследование посвящено анализу способности бактериофагов подавлять развитие бактериального ожога. Цель работы – оценка эффективности контроля бактерии *E. amylovora* в лабораторных условиях с использованием пяти бактериофагов семейства *Mycoviridae* (Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka и VyarbaS), выделенных на территории Беларуси.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили штамм фитопатогенной бактерии *E. amylovora* 1/79Sm [19] и проявляющие литическую активность в отношении данного штамма бактериофаги Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka и VyarbaS, а также штамм эпифитной бактерии *Pantoea agglomerans* 216.

Культивирование бактерии-хозяина *E. amylovora* 1/79Sm и бактериофагов проводили при температуре 28 °C в питательной среде на основе пептона и дрожжевого экстракта (пептон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; NaCl – 8,5 г/л; вода дистиллированная – до 1 л) и в питательной среде LB (триптон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; NaCl – 10,0 г/л; вода дистиллированная – до 1 л).

Исследование эффективности подавления признаков бактериального ожога в лабораторных условиях проводили в мае 2020 и мае 2021 г. с использованием цветков и листьев груши. В табл. 1 представлена шкала баллов, которые были присвоены визуальным признакам поражения органов растений при заражении культурой бактерий *E. amylovora* в настоящем эксперименте. Также проведен анализ численности патогена на цветках при обработке бактериофагом. В экспериментах для получения фаголизатов использовали штамм бактерии *P. agglomerans* 216. Перед обработкой органов растений фаголизаты центрифугировали для освобождения от бактериального дебриса. При заражении органов растений *E. amylovora* культуру бактерий наносили на пестики цветков и центральную жилку листа и в точке инокуляции делали надрез. Результаты учитывали на 5-е сутки. В постановке экспериментов 2020 и 2021 гг. имелись отличия (табл. 2).

Таблица 1

Четырехбалльная система оценки визуальных признаков поражения органов растений при заражении культурой бактерий *E. amylovora*

Table 1

A four-point system for assessing symptoms of damage to plant organs when infected with *E. amylovora*

Визуальные признаки поражения груши возбудителем бактериального ожога		Балл
Цветки	Листья*	
Инфекция отсутствует	Инфекция отсутствует	0
Некроз затрагивает пестик	Некроз проявляется в точке инокуляции	1
Некроз затрагивает начало цветоложа	Некроз проявляется в точке инокуляции и затрагивает центральную жилку	2
Некроз поражает цветоложе	Некроз распространяется по центральной и дополнительным жилкам	3
Некроз захватывает часть цветоножки	Некроз затрагивает более 50 % поверхности листа	4

*По данным [20].

Для анализа количества КОЕ и БОЕ на цветках груши последние на 1 ч помещали в 1 мл физиологического раствора, после чего полученную суспензию титровали и высевали на чашки с питательным агаром с добавлением стрептомицина в концентрации 25 мкг/мл.

Эксперименты ставились с проведением двух контролей. Для первой контрольной группы (далее – **контроль 1** и **контроль** в экспериментах 2020 и 2021 гг. соответственно) использовали среду LB, а вторую контрольную группу (далее – **контроль 2** в эксперименте 2020 г.; **1/79Sm (т. 1)**, **1/79Sm (т. 2)** и **1/79Sm (т. 3)** в эксперименте 2021 г.) заражали культурой бактерий *E. amylovora* 1/79Sm, при этом обработку бактериофагом не выполняли. При заражении органов растений культурой бактерий *E. amylovora* 1/79Sm в эксперименте 2021 г. использовали инокулят различного титра, для чего отбор суспензии клеток растущей культуры бактерий проводили в разные временные точки (т. 1, т. 2 или т. 3).

Таблица 2

Условия экспериментов исследования эффективности контроля *E. amylovora*
при обработке органов растений бактериофагами

Table 2

Conditions of experiments on disease control
by bacteriophages on plant organs infected with *E. amylovora*

Номер опыта	Год	Титр бактерий в инокуляте, КОЕ/мл	Титр бактериофага в фаголизате, БОЕ/мл	Порядок обработки	Средняя температура окружающей среды, °С
1	2020	$1 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8$	На цветки и листья распыляли бактериофаг, спустя 1 ч проводили инокуляцию бактерий	23,5
2	2021	$5 \cdot 10^6$ (т. 1) $1 \cdot 10^7$ (т. 2) $2,6 \cdot 10^7$ (т. 3)	$5 \cdot 10^9$	На цветки и листья распыляли бактериофаг, спустя 1 ч проводили инокуляцию бактерий	21,5

Эксперименты выполняли не менее чем в трех повторах. Для статистической обработки данных использовали встроенные функции программы *Microsoft Excel*. Планки погрешностей на рис. 1–4 отражают величину стандартного отклонения.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе проведено исследование эффективности подавления развития бактериального ожога на модельных объектах – цветках и листьях груши. Масштабы тестирования средств борьбы с бактериальным ожогом на растениях ограничены трудоемкостью и продолжительностью возделывания древесных культур [21]. В связи с этим необходимо использовать адекватные модели заражения растений в лабораторных условиях. Первичным органом заражения является цветок [2], поэтому эксперименты на цветках представляют собой наиболее показательную модель заражения бактериальным ожогом. Одно из самых чувствительных растений к патогену *E. amylovora* – груша, по этой причине тестирование антибактериальных агентов чаще всего проводят на ее цветках [22; 23]. Для установления возможности распространения бактерий и бактериофага в тканях растений в качестве упрощенной модели также можно использовать молодые листья растений. Например, отделенные листья груши применяли ранее для выявления чувствительности сортов груши и вирулентности патогенов *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* при проведении анализа прогрессирования зоны некроза [20], а для оценки агрессивности патогена *E. amylovora* и его способности к миграции осуществляли заражение листьев саженцев яблони GFP-мечеными клетками бактерий [24]. В настоящее время имеются данные по изучению подавления бактериофагами *E. amylovora* развития бактериального ожога на цветках груши, яблони и айвы (табл. 3). Следует отметить, что при оценке способности бактериофагов подавлять развитие болезни в исследованиях анализировали численность патогена на цветках (в работе [14] – симптомы болезни). В экспериментах использовались бактериофаги семейств Myoviridae и Podoviridae, причем наилучший результат со снижением титра фитопатогена на несколько порядков показан для рекомбинантного бактериофага Y2::*dpoL1-C*, представляющего собой миовирус, несущий ген деполимеразы подовируса L1 [17].

Таблица 3

Эксперименты по обработке бактериофагами
цветков, зараженных возбудителем бактериального ожога

Table 3

Experiments on disease control by bacteriophages
on flowers infected with the causative agent of fire blight

Штамм-носитель для наработки бактериофага	Последовательность обработки и титр* фаговых и бактериальных компонентов	Эффективность обработки бактериофагом	Источник
<i>P. agglomerans</i> Eh21-5	Бактериофаг и культуру бактерий <i>P. agglomerans</i> смешивали в соотношении 10^8 КОЕ/мл : 10^8 БОЕ/мл и оставляли инкубироваться на 1 ч. Суспензию фага и <i>P. agglomerans</i> распыляли на цветки груши и давали высохнуть в течение 3 ч перед инокуляцией суспензией культуры бактерий <i>E. amylovora</i> (10^6 КОЕ/мл)	Снижение симптомов инфекции на 60 и 84–96 %	[14]
<i>E. amylovora</i>	На рыльце цветков яблони инокулировали суспензию <i>E. amylovora</i> 1/79Sm ($5 \cdot 10^3$ КОЕ) и бактериофагов ($5 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^8$ БОЕ)	Снижение численности патогена на 40–90 %	[15]
<i>E. amylovora</i>	На цветки яблони распыляли фаголизат (10^{12} БОЕ/мл) и инокулировали суспензию ночной культуры бактерий <i>E. amylovora</i> 1/79Sm (10^5 КОЕ/мл) в количестве 10 мкл на цветок	Снижение численности патогена более чем на 45 %	[16]
<i>E. amylovora</i>	На цветки яблони распыляли разное количество культуры бактерий <i>E. amylovora</i> (10^2 ; 10^4 ; 10^6 КОЕ/мл). Через 1 ч распыляли бактериофаги ($3 \cdot 10^8$ БОЕ/мл)	Снижение числа клеток патогена на 6,0; 3,6 и 2,9 порядка на цветках, инокулированных 10^2 ; 10^4 и 10^6 КОЕ/мл, соответственно	[17]
<i>E. amylovora</i>	Смесь 1 : 1 фаголизата (10^{10} БОЕ/мл) и суспензии культуры бактерий <i>E. amylovora</i> 1/79Sm (10^5 КОЕ/мл) объемом 20 мкл наносили на пестики цветков яблони и айвы	Снижение численности патогена на 65–84 % (0,5–1,0 порядка)	[18]

*Выделен полужирным начертанием.

В настоящем исследовании с участием пяти бактериофагов семейства Myoviridae сезонные эксперименты 2020 и 2021 гг. имели методические модификации и продемонстрировали различные результаты при оценке подавления бактериального ожога в лабораторных условиях (см. рис. 1–4).

В эксперименте 2020 г. (см. рис. 1) при визуальной оценке симптомов поражения цветков груши бактериальным ожогом статистически значимой разницы между **контролем 2** и обработанными бактериофагом цветками не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о потенциально низкой эффективности каждого из исследуемых бактериофагов и коктейля фагов в условиях стремительно развивающейся болезни, когда обработка бактериофагом происходит после попадания на цветок растения инокулята с высоким значением КОЕ. Следует отметить, что титр 10^8 КОЕ/мл на 2 и более порядка превышает таковой в проведенных ранее исследованиях (см. табл. 3). Ряд экспериментов свидетельствуют о наличии критического порога в соотношении бактерии и бактериофага, выше которого эффективность применения бактериофага значительно падает [17].

Диапазон разброса данных при обработке отдельными бактериофагами (Hena2 ($1,50 \pm 1,05$), Roschal ($1,67 \pm 1,03$), Pixel ($1,83 \pm 0,75$), Dichka ($1,83 \pm 0,98$) и VyarbaS ($1,67 \pm 1,03$)) был ниже среднего балла оценки визуальных признаков поражения для **контроля 2** ($2,83 \pm 0,98$). В случае применения коктейля фагов статистически значимой разницы с **контролем 2** не наблюдалось.

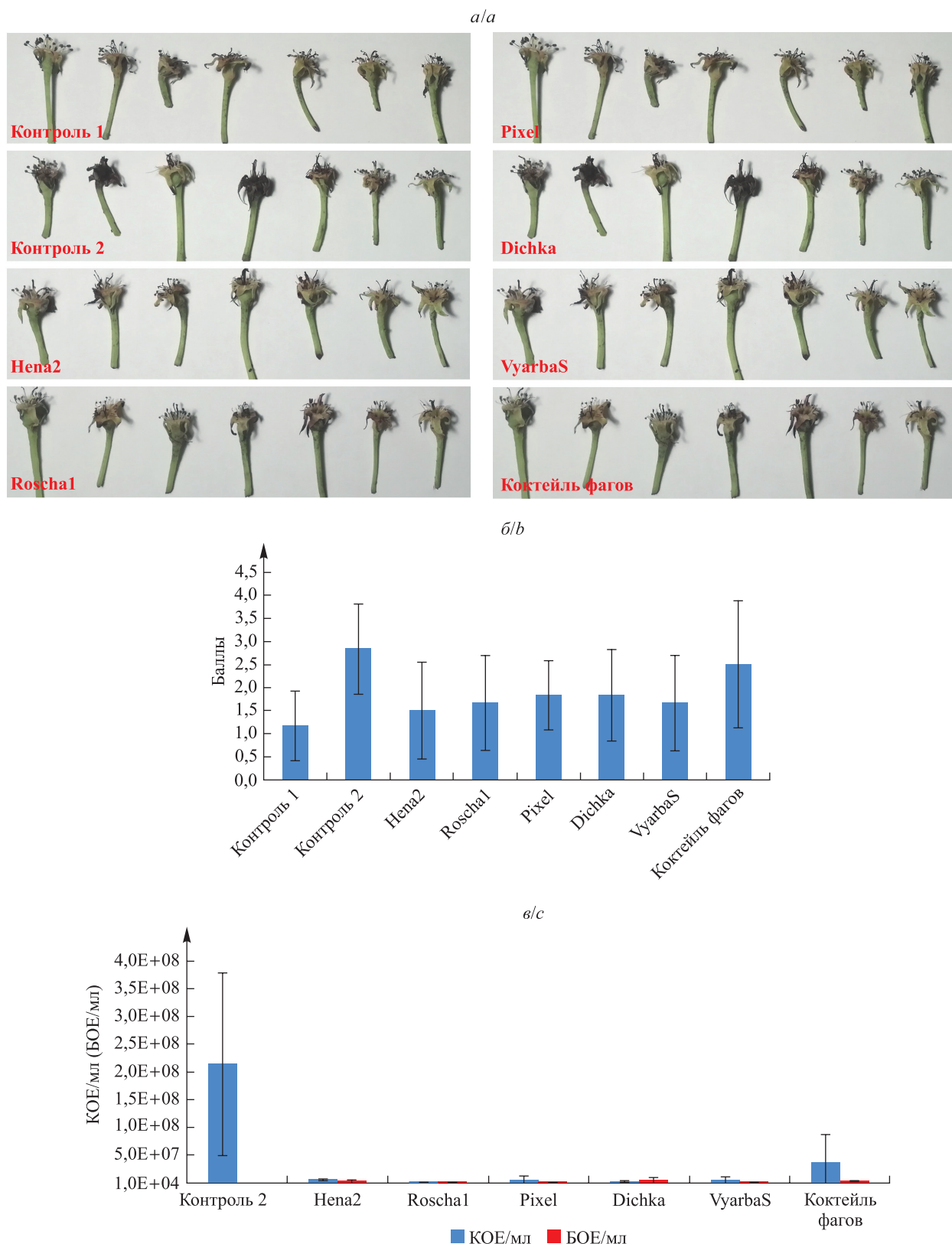


Рис. 1. Анализ поражения цветков груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагами в 2020 г.:
а – цветки груши на 5-е сутки инкубирования;
б – оценка визуальных признаков поражения цветков груши;
в – титр патогена и бактериофага на цветках на 5-е сутки инкубирования

Fig. 1. Analysis of damage to pear flowers after infection with *E. amylovora* and treatment with bacteriophages in 2020:
a – pear flowers on the 5th day of incubation; b – assessment of symptoms on pear flowers;
c – the pathogen and bacteriophage titer on flowers on the 5th day of incubation

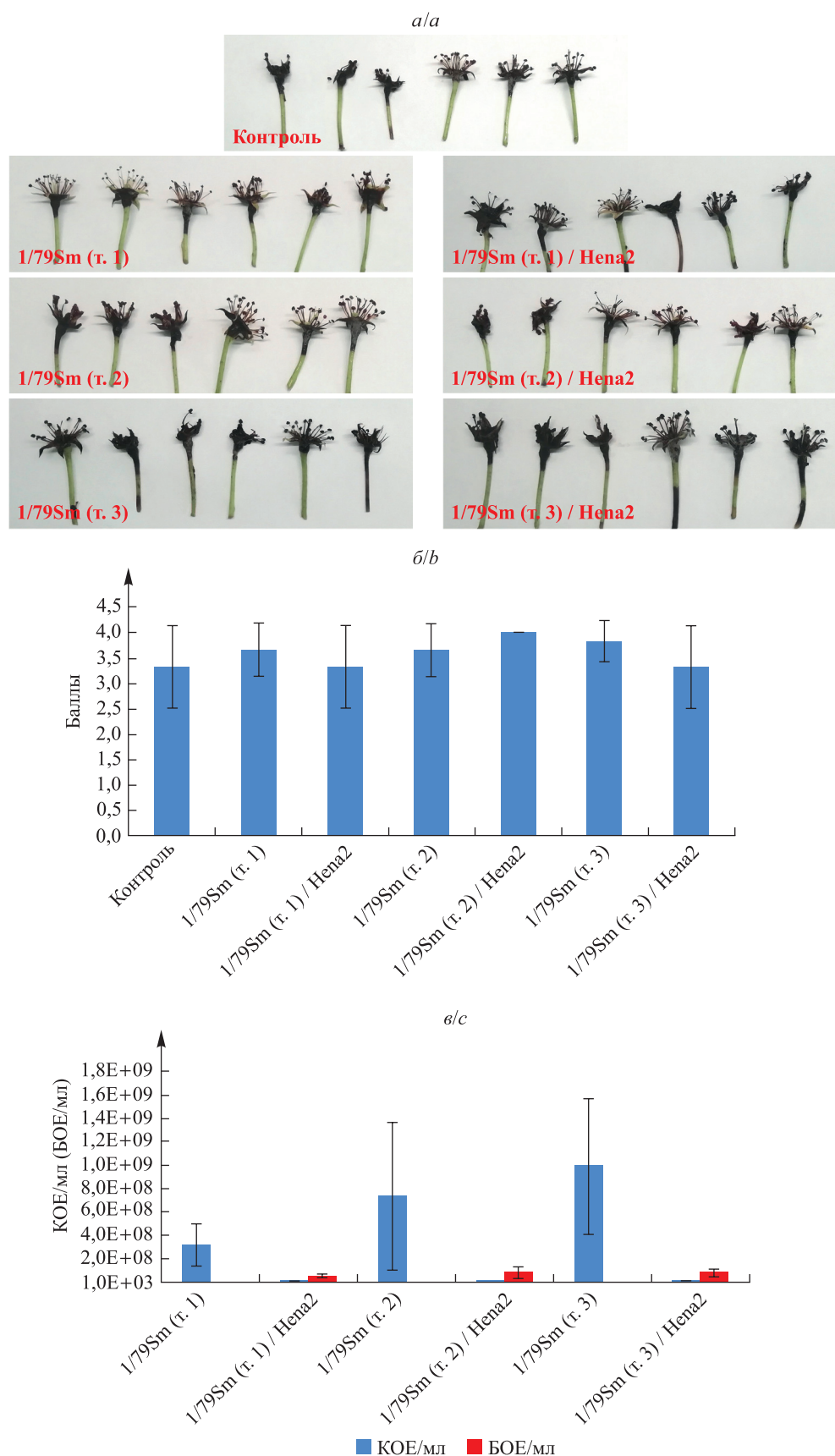
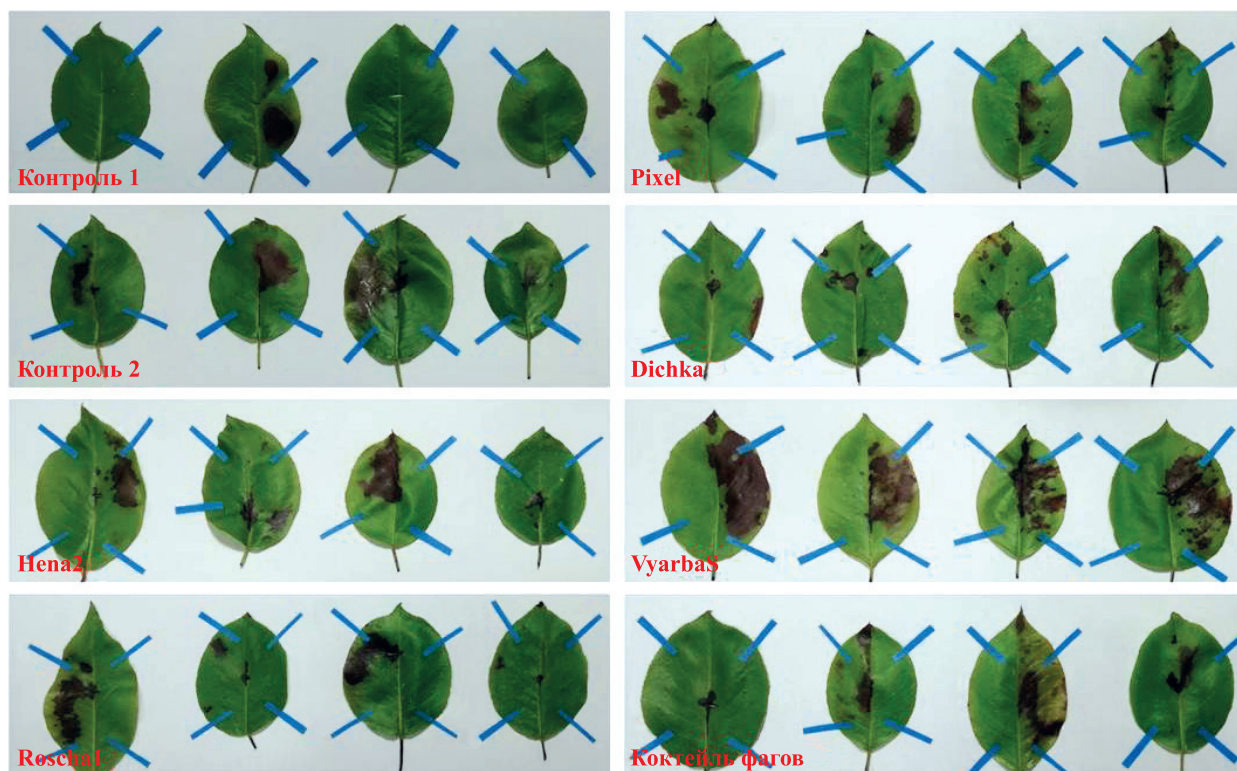


Рис. 2. Анализ поражения цветков груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагом Hena2 в 2021 г.:
а – цветки груши на 5-е сутки инкубирования; б – оценка визуальных признаков поражения цветков груши;
в – титр патогена и бактериофага на цветках на 5-е сутки инкубирования

Fig. 2. Analysis of damage to pear flowers after infection with *E. amylovora* and treatment with bacteriophage Hena2 in 2021: а – pear flowers on the 5th day of incubation;
b – assessment of symptoms on pear flowers; c – the pathogen and bacteriophage titer on flowers on the 5th day of incubation

a/a



b/b

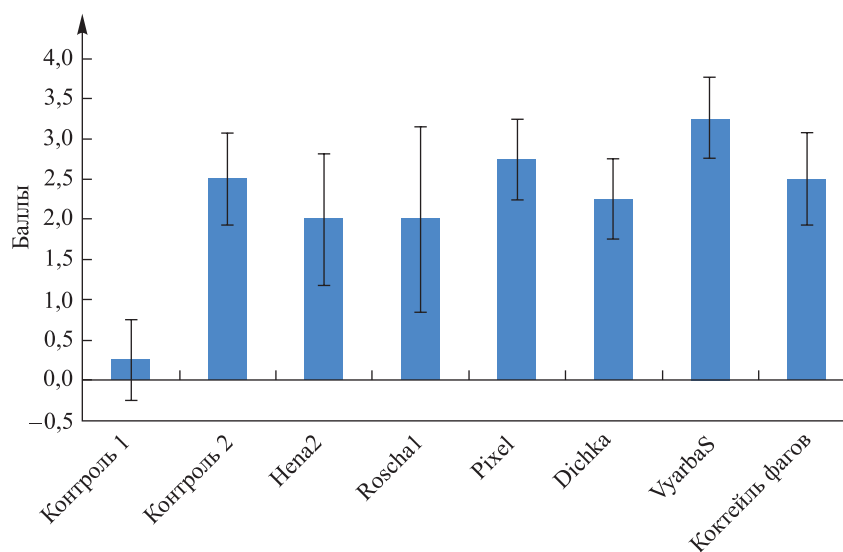


Рис. 3. Анализ поражения листьев груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагами в 2020 г.: а – листья груши на 5-е сутки инкубирования; б – оценка визуальных признаков поражения листьев

Fig. 3. Analysis of damage to pear leaves after infection with *E. amylovora* and treatment with bacteriophages in 2020: а – pear leaves on the 5th day of incubation; б – assessment of symptoms on pear leaves

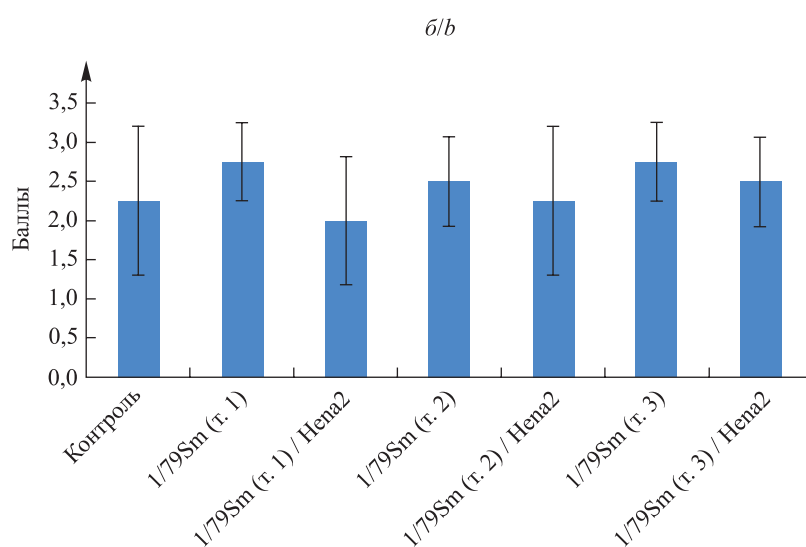
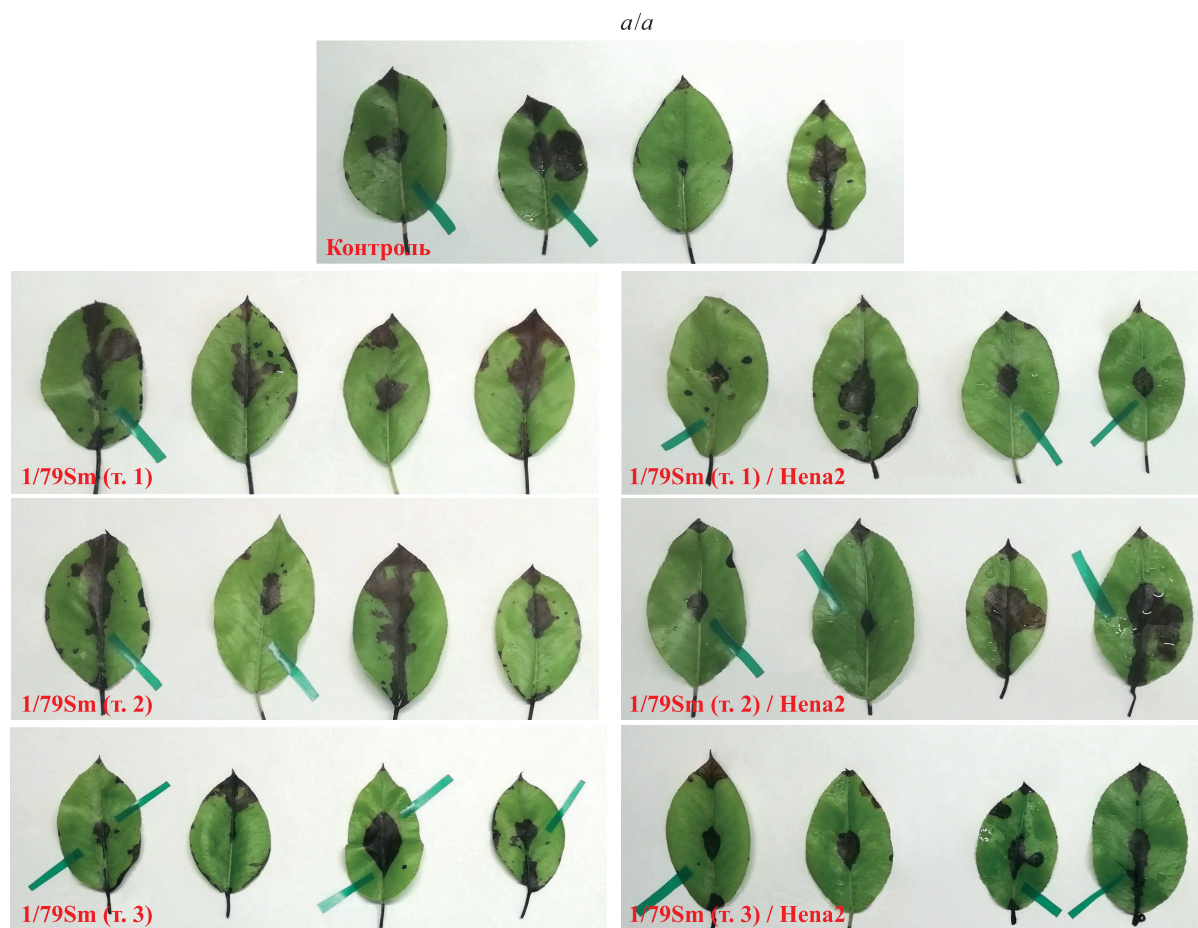


Рис. 4. Анализ поражения листьев груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагом Hena2 в 2021 г.: а – листья груши на 5-е сутки инкубирования; б – оценка визуальных признаков поражения листьев

Fig. 4. Analysis of damage to pear leaves after infection with *E. amylovora* and treatment with Hena2 bacteriophage in 2021: а – pear leaves on the 5th day of incubation; б – assessment of symptoms on pear leaves

Необходимо отметить, что органы растений **контроля 1** и **контроля** в экспериментах 2020 и 2021 гг. также имели достаточно высокий балл некроза тканей (см. рис. 1–4), что может свидетельствовать о негативном влиянии компонентов питательных сред и (или) эпифитной флоры на ткани растений. В связи с этим для получения более полного представления о способности бактериофагов подавлять рост популяции *E. amylovora* на цветках груши в 2020 и 2021 гг. проведен анализ численности бактерий *E. amylovora* 1/79Sm и бактериофагов. В эксперименте 2020 г. (см. рис. 1, в) после 5 сут инкубирования на цветках наблюдали соответствующее снижение титра патогена при обработке отдельными бактериофагами по сравнению с **контролем 2**: Hena2 – в 40,75 раза, Roschal – в 984,15, Pixel – в 44,12, Dichka – в 137,27, VyarbaS – в 47,39 раза. Титр бактериофага (БОЕ/мл) во всех случаях, кроме группы, обработанной бактериофагом Dichka, был ниже титра бактерий (КОЕ/мл). Так, с цветков, обработанных бактериофагом Hena2, высевали $2,4 \cdot 10^6 \pm 2,4 \cdot 10^6$ БОЕ/мл и $5,2 \cdot 10^6 \pm 1,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, Roschal – $7,6 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и $2,2 \cdot 10^5 \pm 1,0 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, Pixel – $2,0 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и $4,8 \cdot 10^6 \pm 6,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, Dichka – $3,4 \cdot 10^6 \pm 5,2 \cdot 10^6$ БОЕ/мл и $1,6 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, VyarbaS – $8,5 \cdot 10^4 \pm 1,1 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и $4,5 \cdot 10^6 \pm 6,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, коктейлем фагов – $2,5 \cdot 10^6 \pm 9,5 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и $3,6 \cdot 10^7 \pm 5,2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл.

В эксперименте 2021 г. (см. рис. 2) проведено исследование эффективности подавления развития бактериального ожога бактериофагом Hena2 при более низком значении количества КОЕ *E. amylovora* 1/79Sm в инокуляте (см. табл. 2). При анализе визуальных признаков поражения цветков статистически значимых отличий между **контролем**, **1/79Sm (т. 1)**, **1/79Sm (т. 2)**, **1/79Sm (т. 3)** и обработанными бактериофагом цветками не выявлено. Однако показатель снижения численности патогена был выше, чем в эксперименте 2020 г.: количество КОЕ на обработанных бактериофагом Hena2 цветках оказалось в 67; 2164 и 247 раз ниже, чем для **1/79Sm (т. 1)**, **1/79Sm (т. 2)** и **1/79Sm (т. 3)** соответственно. Титр бактериофага на цветках после 5 сут инкубирования также был выше в эксперименте 2021 г. (на 1–3 порядка).

При исследовании прогрессирования некроза у листьев груши (см. рис. 3, 4) наблюдали развитие поражения растительной ткани для всех групп листьев, на которые производили инокуляцию патогена *E. amylovora* 1/79Sm. Статистически значимых отличий между результатами для **контроля 2 (1/79Sm (т. 1))**, **1/79Sm (т. 2)**, **1/79Sm (т. 3)** и обработанных бактериофагом групп листьев не обнаружено.

Необходимо отметить, что в эксперименте 2021 г. листья груши в **контроле** также имели высокий балл некроза тканей, что говорит о возможной интерференции результатов, обусловленной влиянием на ткани растений компонентов питательных сред, используемых для приготовления препарата бактериофага, и эпифитной флоры.

Заключение

В работе исследована способность бактериофагов Hena2, Roschal, Pixel, Dichka и VyarbaS подавлять развитие бактериального ожога при заражении органов растений культурой бактерий *E. amylovora* 1/79Sm. Статистически значимых отличий при оценке симптомов болезни не обнаружено, однако получены сравнительно высокие значения подавления численности патогена на цветках груши (см. табл. 3). Наилучший результат наблюдали при обработке бактериофагом за 1 ч до внесения инокулята *E. amylovora* более низкой плотности (эксперимент 2021 г.): количество КОЕ *E. amylovora* уменьшалось на 2–3 порядка, что выше результатов в литературных источниках или сопоставимо с ними. Наличие жизнеспособных клеток бактерий *E. amylovora* может быть обусловлено фагорезистентными вариантами или экологическими особенностями бактериофагов, что представляет интерес для дальнейших исследований.

Библиографические ссылки / References

1. Vrancken K, Holtappels M, Schoofs H, Deckers T, Valcke R. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: state of the art. *Microbiology*. 2013;159(part 5):823–832. DOI: 10.1099/mic.0.064881-0.
2. Johnson KB. Fire blight of apple and pear. *The Plant Health Instructor* [Internet]. 2000 [cited 2021 August 24]. Available from: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/FireBlight.aspx>. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0726-01.
3. Bogs J, Bruchmüller I, Erbar C, Geider K. Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*. 1998;88(5):416–421. DOI: 10.1094/PHYTO.1998.88.5.416.
4. Momol MT, Norelli JL, Piccioni DE, Momol EA, Gustafson HL, Cummins JN, et al. Internal movement of *Erwinia amylovora* through symptomless apple scion tissues into the rootstock. *Plant Disease*. 1998;82(6):646–650. DOI: 10.1094/PDIS.1998.82.6.646.
5. Santander RD, Català-Senent JF, Figàs-Segura À, Biosca EG. From the roots to the stem: unveiling pear root colonization and infection pathways by *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2020;96(12):fiae210. DOI: 10.1093/femsec/fiae210.
6. Gusberti M, Klemm U, Meier MS, Maurhofer M, Hunger-Glaser I. Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015;12(9):11422–11447. DOI: 10.3390/ijerph120911422.

7. CABI. *Erwinia amylovora* (fireblight) [Internet]. In: *Invasive species compendium*. Wallingford: CAB International; 2021 [cited 2021 August 24]. Available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21908>.
8. Dagher F, Olishevskaya S, Phillion V, Jie Zheng, Déziel E. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon*. 2020;6(10):e05222. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05222.
9. Aćimović SG, Quan Zeng, McGhee GC, Sundin GW, Wise JC. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:16. DOI: 10.3389/fpls.2015.00016.
10. Jones JB, Jackson LE, Balogh B, Obradovic A, Iriarte FB, Momol MT. Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:245–262. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411.
11. Doffkay Z, Dömötör D, Kovács T, Rákhely G. Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens. *Acta Biologica Szegediensis*. 2015;59(supplement 2):291–302.
12. Nagy JK, Schwarczinger I, Künstler A, Pogány M, Király L. Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple – a possibility of enhanced control of fire blight. *European Journal of Plant Pathology*. 2015;142(4):815–827. DOI: 10.1007/s10658-015-0654-3.
13. Nagy JK, Király L, Schwarczinger I. Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European Journal of Biology*. 2012;7(1):1–12. DOI: 10.2478/s11535-011-0093-x.
14. Boulé J, Sholberg PL, Lehman SM, O’Gorman DT, Svircev AM. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2011;33(3):308–317. DOI: 10.1080/07060661.2011.588250.
15. Müller I, Lurz R, Kube M, Quedenau C, Jelkmann W, Geider K. Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbial Biotechnology*. 2011;4(6):735–745. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00272.x.
16. Schwarczinger I, Kiss E, Süle S, Tóth M, Hevesi M. Control of fire blight by bacteriophages on apple flowers. In: Sobiczewski P, Kaluzna M, Pulawska J, editors. *Proceedings of the 12th International Workshop on Fire Blight; 2010 August 16–20; Warsaw, Poland*. [S. l.]: International Society for Horticultural Science; 2011. p. 457–462 (Acta Horticulturae; volume 896). DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.66.
17. Born Y, Fieseler L, Thöny V, Leimer N, Duffy B, Loessner MJ. Engineering of bacteriophages Y2::dpoL1-C and Y2::luxAB for efficient control and rapid detection of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017;83(12):e00341-17. DOI: 10.1128/AEM.00341-17.
18. Schwarczinger I, Nagy JK, Künstler A, Szabó L, Geider K, Király L, et al. Characterization of Myoviridae and Podoviridae family bacteriophages of *Erwinia amylovora* from Hungary – potential of application in biological control of fire blight. *European Journal of Plant Pathology*. 2017;149(3):639–652. DOI: 10.1007/s10658-017-1214-9.
19. Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K. Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amyloporan synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994;16(6):290–296. DOI: 10.1016/0141-8130(94)90058-2.
20. Moragrega C, Llorente I, Manceau C, Montesinos E. Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology*. 2003;109(4):319–326. DOI: 10.1023/A:1023574219069.
21. Ferree DC, Warrington IJ, editors. *Apples: botany, production and uses*. Cambridge: CABI Publishing; 2003. XI, 660 p. DOI: 10.1079/9780851995922.0000.
22. Teviotdale BL. *Fire blight* [Internet]. Davis: University of California; 2011 [cited 2021 August 24]. Available from: <http://ipm.ucanr.edu/PDF/PESTNOTES/pnfireblight.pdf> (Pest notes; 7414).
23. Evans K, Frank E, Beddes T, Pace M, Shao M, Moulton A. *Fire blight* [Internet]. Logan: Utah State University Extension; 2008 [cited 2021 August 24]. Available from: <https://extension.usu.edu/files-ou/publications/factsheet/fire-blight-08.pdf>. Co-published by the Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory.
24. Bogs J, Richter K, Kim W-S, Jock S, Geider K. Alternative methods to describe virulence of *Erwinia amylovora* and host-plant resistance against fireblight. *Plant Pathology*. 2004;53(1):80–89. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2004.00954.x.

Получена 09.09.2021 / исправлена 22.01.2022 / принята 22.01.2022.
Received 09.09.2021 / revised 22.01.2022 / accepted 22.01.2022.

УДК 634.737:631.529:581.543

ЗАВЯЗЫВАЕМОСТЬ ПЛОДОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОРТОВОЙ СПЕЦИФИКИ И ПОГОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

О. В. ДРОЗД¹⁾

¹⁾Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2В, 220012, г. Минск, Беларусь

На основании данных четырехлетних исследований выявлены особенности завязываемости плодов 15 сортов голубики высокорослой. Показатели выхода зрелых ягод от числа цветков у рассматриваемых сортов варьируются в достаточно широких пределах и в среднем составляют от 46 % (Chandler) до 83 % (Sunrise). Степень изменчивости значений завязываемости ягод у исследуемых таксонов значительно изменялась по годам – от низкого (Bluejay, Nui, Puru, Spartan, Sunrise) до очень высокого (Bonus) уровня. Установлено, что чем ниже уровень изменчивости значения завязываемости плодов, тем более высокой адаптивной способностью к изменяющимся погодным условиям обладает таксон. На завязываемость плодов голубики высокорослой оказывают влияние такие погодные факторы, как осадки и температура воздуха. Осадки, выпадающие в количествах, близких к среднегодовым значениям либо несколько превышающих их, и температура воздуха, близкая к климатической норме, способствуют повышению завязываемости плодов голубики. Выраженный дефицит осадков во время цветения и роста ягод, особенно на фоне повышенной среднесуточной температуры, а также дождливая погода в период массового цветения голубики приводят к снижению завязываемости плодов. Основным лимитирующим фактором во время цветения и формирования ягод голубики является снижение температуры воздуха до минусовых показателей (заморозки).

Ключевые слова: голубика высокорослая; *Vaccinium corymbosum*; интродукция; опыляемость цветков; завязываемость плодов; метеорологические условия; Беларусь.

FEATURES FRUIT SET HIGBUSH BLUEBERRY DEPENDING ON THE CULTIVAR SPECIFICATIONS AND WEATHER AND CLIMATIC CONDITIONS

O. V. DROZD^a

^aCentral Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus,
2B Surhanava Street, Minsk 220012, Belarus

On the basis of four-year data, the features of fruit set are shown for 15 cultivars of highbush blueberry. The average yield of ripe berries from the number of flowers varies within a fairly wide range and averages from 46 % (Chandler) to 83 % (Sunrise) for highbush blueberry cultivars. The degree of variability in berry setting indices in the taxa under study varied significantly over the years: from a low level (Bluejay, Nui, Puru, Spartan, Sunrise) to a very high level (Bonus). It was revealed that the lower the level of variability of the fruit setting indicator, the higher the adaptive ability of the taxon to changing weather and climatic conditions. The setting of highbush blueberry fruits is influenced by such weather and climatic factors as humidity and air temperature. Precipitations falling within the range close to the mean annual

Образец цитирования:

Дрозд ОВ. Завязываемость плодов голубики высокорослой в зависимости от сортовой специфики и погодных условий. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:70–80.

For citation:

Droz O V. Features fruit set highbush blueberry depending on the cultivar specifications and weather and climatic conditions. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:70–80. Russian.

Автор:

Ольга Владимировна Дрозд – научный сотрудник отраслевой лаборатории интродукции и технологии нетрадиционных ягодных растений.

Author:

Olga V. Drozd, researcher at the branch laboratory of introduction and technology of non-traditional berry varieties.
drozd_olgaw@rambler.ru

values or slightly higher than them, and the air temperature close to the climatic norm, contribute to better fruit setting. A pronounced shortage of precipitation, especially against the background of an increased average daily temperature, during flowering and growth of fruits, as well as heavy precipitation during the period of mass flowering of blueberries, have a negative effect on berry setting. At the same time, the main limiting temperature factor during flowering and formation of blueberry fruits is a decrease in air temperature to minus indicators (freezing).

Keywords: highbush blueberry; *Vaccinium corymbosum*; introduction; pollination on flowers; fruit set; meteorological conditions; Belarus.

Введение

В последние годы голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) является одним из мировых лидеров по увеличению площадей возделывания среди ягодных культур. В Беларуси площадь промышленных насаждений голубики к концу 2017 г. составила 1000 га [1]. Рентабельность возделывания плодовых и ягодных культур, в том числе голубики высокорослой, определяется величиной и качеством урожая, который, в свою очередь, зависит от биологических особенностей сорта. Растения голубики способны формировать высокий уровень ягодной продукции почти ежегодно, но на практике наблюдается чередование урожаев от обильных до слабых. На данную особенность голубики высокорослой обращает внимание Н. Б. Павловский [1], голубики топяной (*V. uliginosum* L.) – Г. В. Сорокина [2]. Полнота реализации потенциала биологической продуктивности растений голубики зависит не только от их сортовой специфики, но и от климатических и эдафических особенностей местности, метеорологических условий года, комплекса проводимых агротехнических мероприятий. При этом основной причиной неудовлетворительного плодоношения, как правило, становится низкая адаптивность интродуцированных сортов голубики к варьирующимся погодно-климатическим условиям района интродукции.

Формирование генеративных органов у голубики высокорослой, как и у других представителей семейства брусничных, происходит в течение двух вегетационных сезонов, вследствие чего подразделяется на два этапа: внутрипочечное развитие, когда идет закладка и дифференциация эмбриональных соцветий, и внепочечное развитие, которое включает в себя бутонизацию, цветение, завязывание и созревание плодов [3; 4]. Следует отметить, что погодно-климатические условия наиболее ощутимо сказываются на эффективности плодоношения голубики в период цветения, роста и созревания ягод [5]. В исследованиях, проведенных Т. В. Курлович и В. Н. Босаком в условиях Белорусского Полесья на пяти сортах голубики высокорослой (Herbert, Coville, Scammel, Blueray, Rancocas) [6], процент выхода зрелых плодов от числа цветков варьировался в пределах 72,0–94,0 %. Согласно А. Б. Конобеевой [7], в Центрально-Черноземном регионе России при свободном опылении завязываемость у четырех сортов голубики высокорослой (Herbert, Coville, Blueray, Rancocas) составляла 75,8–97,6 %. В период массового созревания у голубики топяной обнаруживается лишь 30,0–50,0 % ягод от первоначального числа цветков [8]. Завязываемость плодов у голубики узколистной (*V. angustifolium* Ait.) варьируется от 25,8 до 75,0 % [3].

Выявление и изучение сортов с высокой адаптивной способностью является актуальным в работе с голубикой высокорослой, так как при всем разнообразии сортимента каждой климатической зоне должен соответствовать набор таксонов, адаптированный к местным условиям. Определение потенциального выхода зрелых плодов от числа цветков у голубики и установление первостепенных факторов, оказывающих влияние на завязываемость ягод, – неотъемлемое условие для предварительного прогнозирования урожайности по цветению.

Цель исследования – оценка завязываемости плодов новых интродуцированных в Беларуси сортов голубики высокорослой в зависимости от сортовой специфики и погодно-климатических условий.

Материалы и методы исследования

Исследования выполняли в 2017–2020 гг. в коллекционных насаждениях отраслевой лаборатории интродукции и технологии нетрадиционных ягодных растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси, расположенной в Ганцевичском районе Брестской области (52° 44' с. ш., 26° 22' в. д.). Объектом исследований являлись 15 сортов голубики высокорослой разных сроков созревания урожая: Bluejay, Collins, Chanticleer и Spartan (раннеспелые), Bluecrop, Denise Blue, Nui, Puru, Sunrise и Toro (среднеспелые), Bonifacy, Bonus, Brigitta Blue, Chandler и Goldtraube (позднеспелые). В качестве стандарта принят районированный сорт голубики высокорослой Bluecrop. Насаждения голубики созданы двулетними корнесобственными саженцами в 2008 г. Почва на участке минеральная, подстилаемая рыхлым разнородным песком (рН(H₂O) 4,6). Схема посадки растений – 2,0 × 1,5 м. Приствольная полоса в насаждениях голубики замульчирована опилками хвойных пород слоем 10 см, шириной 1 м, в междурядьях использовано естественное задернение.

Фенологические наблюдения за репродуктивной сферой растений голубики проводились согласно методике, описанной в работе [9]. Погодные условия в период цветения, роста и созревания плодов голубики (май – август) приведены по данным метеорологической станции Ганцевичи (табл. 1). Дополнительно осуществлялся мониторинг наличия заморозков на коллекционном участке. В период цветения и формирования плодов ночные заморозки (до -4°C) были отмечены 4 июня 2017 г. и 7 июня 2018 г. Климатические нормы¹ (средне многолетние значения метеорологических показателей) приведены на основании данных за период с 1981 по 2010 г.

Таблица 1

Характеристика гидротермического режима в период цветения, роста и созревания плодов голубики в 2017–2020 гг.

Table 1

Characteristics of the hydrothermal regime during flowering, growth and ripening of blueberry fruits in 2017–2020

Месяц	Декада	Температура воздуха			Осадки		
		Среднее значение, °С	Процент от климатической нормы		Сумма, мм	Процент от климатической нормы	
			За декаду	За месяц		За декаду	За месяц
2017 г.							
Май	I	10,3	87	97	12,1	71	37
	II	12,1	89		3,0	14	
	III	16,8	114		7,8	31	
Июнь	I	15,0	96	102	2,6	10	68
	II	17,3	106		20,8	69	
	III	17,8	104		37,3	117	
Июль	I	15,4	86	94	17,6	55	172
	II	17,4	94		43,5	145	
	III	19,5	104		95,6	330	
Август	I	20,9	112	114	11,3	54	79
	II	21,3	120		17,7	85	
	III	17,4	108		20,1	101	
2018 г.							
Май	I	17,5	147	124	4,8	28	17
	II	14,6	107		5,9	28	
	III	17,9	121		0,5	2	
Июнь	I	16,7	106	111	0,3	11	66
	II	19,7	120		14,4	48	
	III	17,9	104		44,1	138	
Июль	I	16,8	93	107	47,2	148	158
	II	20,0	108		80,8	269	
	III	22,5	120		16,0	55	
Август	I	21,3	115	114	18,1	86	71
	II	20,5	116		5,5	26	
	III	18,0	112		20,4	102	

¹Справочник по климату Беларуси / Респ. центр по гидрометеорологии, контролю радиоактив. загрязнения и мониторингу окружающей среды. Минск, 2017. Ч. 1 : Температура воздуха и почвы. 85 с. ; Ч. 2 : Осадки. 64 с.

Окончание табл. 1
Ending table 1

Месяц	Декада	Температура воздуха			Осадки		
		Среднее значение, °С	Процент от климатической нормы		Сумма, мм	Процент от климатической нормы	
			За декаду	За месяц		За декаду	За месяц
2019 г.							
Май	I	8,6	72	102	42,1	248	235
	II	15,4	113		82,2	391	
	III	17,4	118		23,3	93	
Июнь	I	19,8	126	126	14,0	52	70
	II	22,3	136		39,4	131	
	III	20,1	117		8,5	27	
Июль	I	16,3	91	94	40,4	126	94
	II	16,3	88		15,5	52	
	III	19,4	103		29,2	101	
Август	I	16,5	89	104	12,6	60	101
	II	19,0	107		50,2	239	
	III	18,9	117		0,0	0	
2020 г.							
Май	I	10,9	92	82	20,7	122	159
	II	10,3	76		24,8	119	
	III	11,8	80		54,9	220	
Июнь	I	15,7	100	117	52,6	196	110
	II	20,4	124		38,6	130	
	III	21,2	123		7,1	22	
Июль	I	19,3	107	100	54,3	169	96
	II	17,8	96		18,1	60	
	III	18,1	96		15,2	52	
Август	I	20,1	108	110	12,7	62	103
	II	18,0	102		4,3	19	
	III	19,1	119		47,2	236	

В 2017 г. количественная оценка генеративных органов голубики проводилась на стадиях *цветок – зрелая ягода*, в 2018–2020 гг. – на стадиях *цветок – завязавшаяся ягода – зрелая ягода*. Для этого на растениях каждого сорта у 20 соцветий, начиная с фазы бутонизации и до полного созревания плодов, подсчитывалось число цветков, завязавшихся ягод и зрелых плодов (2-кратная повторность). Определялись процент завязавшихся ягод от числа цветков (опыляемость) и процент зрелых плодов от числа цветков (завязываемость). Оценка степени изменчивости признаков осуществлялась по величине коэффициента вариации по шкале Смирнова [10]. Учет урожая плодов исследуемых сортов голубики проводили в несколько приемов (по мере их созревания) путем взвешивания и суммирования массы собранных ягод с каждого модельного растения с последующим вычислением средних для него показателей [11]. Учет и оценка повреждений отрицательными температурами воздуха генеративных органов голубики проводились через 3–5 сут после заморозка [11].

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с применением пакета анализа данных программы *Microsoft Excel* на уровне значимости 95 %.

Результаты и их обсуждение

Сортовая специфика. Завязываемость плодов голубики высокорослой в зависимости от таксона варьируется в достаточно широких пределах и в среднем составляет от 46 до 83 % (табл. 2). Максимальный средний выход зрелых ягод от числа цветков отмечен у сорта Sunrise (83 %), несколько ниже данный показатель у сортов Toro (80 %), Collins (79 %) и Bluejay (78 %). Наименьшим средним показателем завязываемости плодов характеризуется сорт Chandler (46 %). Анализ зависимости завязываемости ягод голубики от срока созревания урожая не дал четкой закономерности, однако прослеживается тренд, свидетельствующий о более низком потенциальном выходе зрелых плодов у позднеспелых сортов голубики по сравнению с ранне- и среднеспелыми таксонами данной культуры. Показатель завязываемости позднеспелых культиваров варьируется от 46 % (Chandler) до 68 % (Bonifacy) и в среднем равен 62 %. Завязываемость плодов ранне- и среднеспелых сортов в среднем по группам составляет 72 и 76 % соответственно и изменяется от 53 % (Chanticleer) до 79 % (Collins) у сортов раннего срока созревания и от 71 % (Denise Blue) до 83 % (Sunrise) у среднеспелых культиваров.

Показатели изменчивости (коэффициенты вариации) завязываемости плодов исследуемых сортов голубики значительно варьируются по годам – от низкого до очень высокого уровня изменчивости. Низкий уровень изменчивости значений выхода зрелых плодов (8–12 %) отмечен у сортов Bluejay, Nui, Puru, Sunrise и Spartan, средний (13–20 %) – у сортов Collins, Chanticleer и Toro, повышенный (21–40 %) – у сортов Bluecrop, Brigitta Blue, Denise Blue, Goldtraube, Chandler и Bonifacy, очень высокий (более 40 %) – у сорта Bonus. Чем ниже уровень изменчивости значений завязываемости ягод у того или иного сорта голубики, тем более стабильным плодоношением и, как следствие, более высокой адаптивной способностью к варьирующимся погодно-климатическим условиям района интродукции обладает данный таксон.

Сравнительный анализ показывает, что, как правило, чем выше средний показатель завязываемости плодов, тем более высокой средней урожайностью характеризуются растения голубики. Так, в 2019 г. отмечены высокий средний показатель выхода зрелых ягод (73 %) и максимальная средняя урожайность для исследуемых сортов (3,1 кг на растение). В 2018 г., наоборот, зафиксированы минимальные показатели как завязываемости плодов (57 %), так и урожайности (0,9 кг на растение). Согласно исследованиям [12; 13], необходимым условием для получения хороших урожаев голубики является выход зрелых плодов от числа цветков не менее 80 %, в то время как другим растениям требуется около 20 %. В работе [14] сообщается, что в случае ягодных растений, в том числе голубики высокорослой, удовлетворительный процент завязываемости ягод составляет от 50 до 80 %. Следует отметить, что завязываемость плодов является лишь одной из составляющих, которые оказывают влияние на урожайность растений голубики. Так, у сорта Bluejay в 2018 г. при показателе выхода зрелых плодов 76 % урожайность составила всего 0,9 кг на растение, в 2019 г. при завязываемости ягод 70 % показатель плодоношения был равен 3,6 кг на растение. Это свидетельствует о том, что, кроме завязываемости плодов, на урожайность голубики оказывают влияние и другие морфоструктурные компоненты продуктивности: средняя масса плода, число ягод в кисти, число кистей на одном генеративном побеге и число плодоносящих побегов на растении [7; 11]. Поэтому при прогнозировании потенциально возможной урожайности растений голубики по числу цветков следует учитывать завязываемость плодов совместно с другими компонентами продуктивности.

Сравнительный анализ установленных в данном исследовании показателей завязываемости плодов для 15 сортов голубики и имеющихся в литературных источниках сведений выявил некоторые несоответствия. Так, указанные в публикации [14] показатели выхода зрелых ягод у сортов Bonifacy (33,8–87,7 %), Brigitta Blue (38,7–43,9 %) и Chandler (34,1–82,7 %) в условиях Польши сходны с полученными в настоящей работе значениями. Процент выхода зрелых плодов от числа цветков у сортов Bluejay (39,7–80,3 %), Puru (28,0–73,3 %), Spartan (30,2–65,1 %), Sunrise (34,5–70,2 %) и Toro (31,2–74,0 %) варьируется по годам более чем в 2 раза и соответствует представленным в настоящей статье данным лишь по максимальным показателям завязываемости. Процент выхода зрелых ягод у голубики высокорослой сортов Bluecrop, Bluejay, Spartan и Collins, приведенный в работах польских исследователей [15–17], превышает полученные автором статьи значения в среднем на 11–27 %. В условиях США, по данным публикации [18], завязываемость плодов у сортов Sunrise (87–91 %) и Toro (68–71 %) сопоставима с установленными в настоящей работе показателями. Согласно исследованию С. Л. Приходько, проведенному в условиях Белорусского Полесья на шести сортах голубики высокорослой [19], завязываемость ягод у сортов Bluecrop (92,4 %) и Toro (91,4 %) соответствует представленным в статье данным лишь по максимальным показателям выхода зрелых плодов, а у сорта Spartan (96,9 %) превышает полученные автором значения на 11–38 %.

Таким образом, показатели завязываемости плодов новых интродуцируемых сортов голубики высокорослой в условиях Белорусского Полесья в большей части сопоставимы с данными, полученными для исследуемых таксонов в условиях их родины, а также соседней страны.

Завязываемость плодов и урожайность разных сортов голубики в 2017–2020 гг.

Fruit set and yield of different blueberry cultivars in 2017–2020

Сорт	Год										Среднее значение		
	2017		2018		2019		2020						
	Завязываемость, %	Урожайность, кг/раст.	Опыляемость, %	Завязываемость, %	Урожайность, кг/раст.	Опыляемость, %	Завязываемость, %	Урожайность, кг/раст.	Опыляемость, %	Завязываемость, %	Урожайность, кг/раст.	Завязываемость, % $x \pm m_x$	Урожайность, кг/раст. V
Раннеспелые сорта													
Bluejay	81 ± 9	1,3 ± 0,4	91 ± 10	76 ± 21	0,9 ± 0,1	98 ± 3	70 ± 20	3,6 ± 0,6	91 ± 9	84 ± 10	2,9 ± 0,5	78 ± 4	8 2,2 ± 0,8
Collins	79 ± 14	3,7 ± 0,2*	86 ± 12	65 ± 20	1,8 ± 0,4	96 ± 5	81 ± 13	4,0 ± 0,4	91 ± 11	90 ± 11	3,1 ± 0,9	79 ± 6	13 3,2 ± 0,6
Chanticleer	45 ± 13	0,5 ± 0,1*	99 ± 3	51 ± 25	1,0 ± 0,2	93 ± 5	60 ± 16*	2,2 ± 0,7	83 ± 13*	57 ± 26*	0,5 ± 0,1*	53 ± 4*	13 1,1 ± 0,5
Spartan	70 ± 24	1,2 ± 0,3*	86 ± 10	71 ± 13	1,5 ± 0,5	96 ± 6	70 ± 13	3,6 ± 0,9	93 ± 7	87 ± 8	3,2 ± 0,8	75 ± 5	11 2,4 ± 0,7
Среднее	69 ± 10	1,7 ± 0,9	90 ± 4	66 ± 7	1,3 ± 0,3	96 ± 1	70 ± 5	3,4 ± 0,5	90 ± 3	79 ± 9	2,4 ± 0,8	72 ± 7	— 2,2 ± 0,5
Среднеспелые сорта													
Bluecrop (st)	60 ± 9	2,1 ± 0,3	92 ± 6	63 ± 6	1,4 ± 0,3	97 ± 3	84 ± 8	3,1 ± 0,5	94 ± 5	92 ± 5	3,1 ± 0,6	75 ± 9	21 2,4 ± 0,5
Denise Blue	62 ± 20	1,4 ± 0,5	85 ± 16	48 ± 28	0,4 ± 0,2*	100 ± 0	77 ± 14	3,7 ± 0,7	95 ± 5	94 ± 6	2,9 ± 0,5	71 ± 12	28 2,1 ± 0,9
Nui	69 ± 20	1,9 ± 0,4	80 ± 10	73 ± 10	0,7 ± 0,4*	91 ± 9	75 ± 14	2,2 ± 0,9	88 ± 6	84 ± 4	1,2 ± 0,5*	75 ± 4	9 1,5 ± 0,4
Puru	70 ± 10	0,5 ± 0,2*	74 ± 18*	70 ± 15	0,5 ± 0,1*	93 ± 8	68 ± 11	1,2 ± 0,2*	95 ± 4	85 ± 8	0,3 ± 0,0*	74 ± 5	11 0,6 ± 0,3*
Sunrise	88 ± 21*	2,9 ± 0,7	86 ± 10	82 ± 11	1,0 ± 0,1	97 ± 4	71 ± 13	3,7 ± 0,9	92 ± 5	92 ± 5	3,2 ± 0,8	83 ± 6	11 2,7 ± 0,7
Toro	82 ± 21*	0,8 ± 0,4*	69 ± 25*	58 ± 23	0,8 ± 0,3*	100 ± 0	85 ± 12	1,3 ± 0,3*	99 ± 3	96 ± 4	2,1 ± 0,5	80 ± 10	20 1,2 ± 0,4
Среднее	72 ± 7	1,6 ± 0,6	81 ± 6	66 ± 8	0,8 ± 0,2	96 ± 2	77 ± 5	2,5 ± 0,7	94 ± 2	91 ± 3	2,1 ± 0,8	76 ± 3	— 1,8 ± 0,5
Позднеспелые сорта													
Bonifacy	63 ± 25	0,3 ± 0,0*	97 ± 4	35 ± 23*	0,9 ± 0,3*	99 ± 2	86 ± 7	3,2 ± 0,9	92 ± 6	86 ± 6	1,2 ± 0,2*	68 ± 15	36 1,4 ± 0,8
Bonus	75 ± 13	1,2 ± 0,5*	99 ± 2	25 ± 15*	0,2 ± 0,1*	97 ± 4	77 ± 10	2,8 ± 0,8	91 ± 11	81 ± 10	1,9 ± 0,5	64 ± 16	41 1,5 ± 0,7
Brigitta Blue	52 ± 16	0,8 ± 0,4*	91 ± 8	53 ± 21	0,7 ± 0,1*	79 ± 8*	54 ± 13*	3,0 ± 1,2	86 ± 9	80 ± 10	2,8 ± 1,0	60 ± 8	22 1,8 ± 0,8
Chandler	46 ± 12	0,5 ± 0,3*	93 ± 5	25 ± 15*	0,2 ± 0,0*	73 ± 9*	57 ± 9*	2,8 ± 0,5	76 ± 14*	57 ± 7*	0,8 ± 0,1*	46 ± 9*	33 1,1 ± 0,7
Goldtraube	43 ± 11	3,8 ± 0,8*	93 ± 9	54 ± 27	1,5 ± 0,3	97 ± 5	74 ± 19	6,2 ± 0,8*	93 ± 5	90 ± 6	2,0 ± 0,9	65 ± 13	32 3,4 ± 1,3
Среднее	56 ± 8	1,3 ± 0,9	94 ± 2	40 ± 10	0,7 ± 0,3	89 ± 8	69 ± 9	3,6 ± 0,9	88 ± 5	79 ± 8	1,8 ± 0,5	62 ± 5	— 1,8 ± 0,6
Среднее по всем сортам	66 ± 10	1,5 ± 0,8	88 ± 6	57 ± 12	0,9 ± 0,3	94 ± 5	73 ± 7	3,1 ± 0,8	91 ± 4	84 ± 8	2,1 ± 0,7	70 ± 7	— 1,9 ± 0,5
HCP _{0,05}	21,1	0,84	15,1	25,3	0,52	7,3	17,6	1,43	10,8	12,8	1,21	21,7	— 1,65

Примечание. St – стандарт; x – среднее; m_x – ошибка среднего; V – коэффициент вариации; кг/раст. – килограммов на растении; * – $p < 0,05$ (достоверность различий по сравнению с контролем).

Метеорологические условия. Показатели завязываемости плодов голубики высокорослой варьировались по годам в достаточно широких пределах и в среднем составили от 57 % в 2018 г. до 84 % в 2020 г. На завязываемость плодов голубики оказывали влияние такие погодно-климатические факторы, как влажность и температура воздуха. При этом основной лимитирующий температурный фактор – это снижение температуры воздуха до минусовых показателей (заморозки) во время цветения и формирования плодов. Так, низкие средние показатели завязываемости плодов голубики в 2017 и 2018 гг. (66 и 57 % соответственно) главным образом были обусловлены наличием ночных заморозков в первой декаде июня. В 2017 г. снижение температуры воздуха до -4°C произошло в период массового цветения растений голубики, что привело к повреждению и последующему осыпанию цветков у всех исследуемых сортов. Это связано с тем, что во время цветения растений их морозостойкость снижается и повреждения органов цветка, прежде всего пестика, у многих культур, в том числе голубики, начинаются при температуре около $-2...-5^{\circ}\text{C}$ [20–22]. Незначительные повреждения низкими температурами отмечены у сортов Denise Blue и Goldtraube (повреждены единичные цветки на растении), наибольшие – у сорта Toro (повреждены цветки, формирующиеся плоды, а также побеги, расположенные в базальной части растения). В 2018 г. наблюдалось аналогичное снижение температуры в первой декаде июня, однако, в отличие от 2017 г., к этому времени у всех исследуемых сортов голубики завязались плоды. Воздействие низких температур на формирующиеся ягоды привело к большему повреждению генеративных органов и, как следствие, к снижению на 14 % среднего показателя завязываемости плодов в 2018 г. (57 %) по сравнению со значением 2017 г. (66 %). По данным М. А. Соловьевой [23], Н. И. Туровцева и др. [24], по мере развития генеративной сферы плодовых и ягодных растений их морозостойкость снижается, и в период формирования плодов критическая температура для завязавшихся ягод составляет от $-1,0$ до $-1,1^{\circ}\text{C}$. На степень повреждения генеративных органов голубики низкими температурами, кроме стадии их развития, оказывают влияние такие факторы, как температуры воздуха, предшествующие заморозку, продолжительность и сила заморозка, скорость ветра, облачность и др. [22]. Установлено, что если заморозкам предшествует прохладная погода и температура воздуха понижается достаточно медленно, то растения голубики закаляются и генеративные органы (цветки, плоды) повреждаются при более низких температурах воздуха. И наоборот, если накануне заморозка отмечается умеренный температурный фон, а затем происходит резкое снижение температуры воздуха, то, по данным работы [22], холодовые повреждения генеративных органов могут возникнуть даже при 0°C . Так, в 2017 г. в течение 5 сут перед заморозком наблюдалось постепенное снижение среднесуточной, максимальной и минимальной температур воздуха на $10,2-10,4^{\circ}\text{C}$ (рис. 1). В 2018 г. отмечено резкое снижение показателей среднесуточной и максимальной температур воздуха на $9,0$ и $12,1^{\circ}\text{C}$ за 2 сут до заморозка, а минимальной температуры на $9,1^{\circ}\text{C}$ за 1 сут до заморозка, что наряду с более поздней стадией развития генеративных органов и привело к их большему повреждению.

Следует отметить, что в период снижения температуры воздуха до минусовых показателей в 2018 г. у исследуемых сортов голубики были сформированы плоды различной стадии развития – от только сбросивших венчик до ягод диаметром до 15 мм. При этом основная часть плодов имели диаметр от 8 до 10 мм. Как правило, у большинства сортов наиболее поврежденными оказались ягоды, находившиеся на ранней

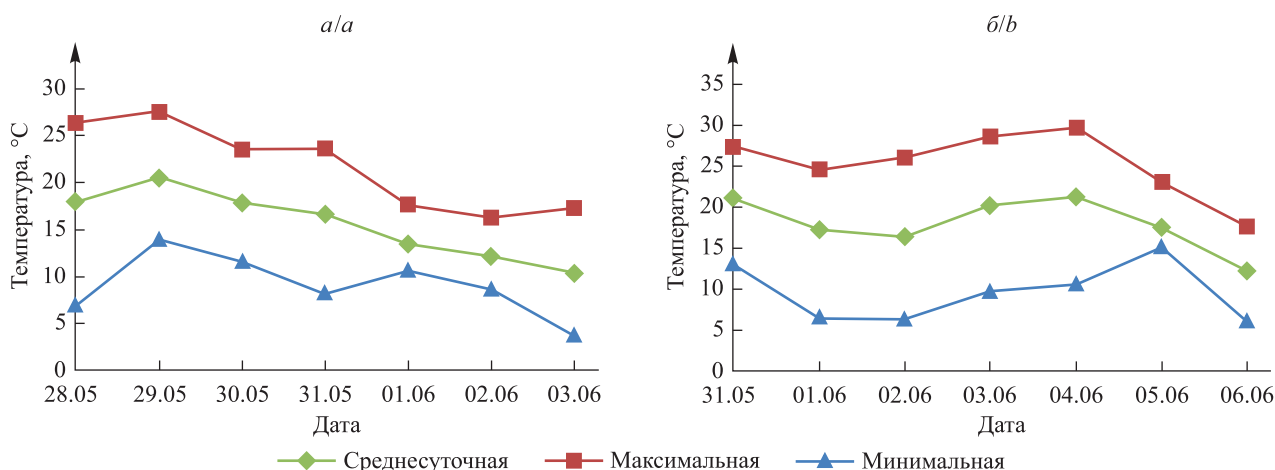


Рис. 1. Динамика среднесуточной, максимальной и минимальной температур воздуха в течение 7 сут, предшествующих заморозкам, в 2017 г. (а) и 2018 г. (б)

Fig. 1. Dynamics of the average daily, maximum and minimum air temperatures during the 7 days preceding the frosts, in 2017 (a) and 2018 (b)

стадии развития (до 5 мм в диаметре), тогда как более сформированные плоды (свыше 5 мм) пострадали в меньшей степени. Это обусловлено тем, что генеративные органы голубики наиболее подвержены влиянию заморозков в период интенсивного роста, который присущ ранним стадиям развития ягод [12]. Заморозок привел к частичному или полному повреждению завязавшихся плодов (рис. 2) и последующему их осыпанию. Так, наиболее сильное подмерзание (до 75 % ягод) отмечено у сортов Bonus и Chandler, несколько меньшее – у сортов Chanticleer и Denise Blue (до 60 % плодов), среднее (до 50 % ягод) – у сорта Toro, слабое (до 25 % плодов) – у сортов Puru, Bluejay и Goldtraube, очень слабое (до 10 % погибших ягод на растение) – у сортов Bluescop, Bonifacy, Brigitta Blue, Collins, Nui, Spartan и Sunrise. Повреждающее воздействие заморозков в весенне-летний период на цветки и завязавшиеся плоды голубики высокорослой также отмечает в своей работе Н. Б. Павловский [25], голубики топяной – Г. В. Сорокина [26].



Рис. 2. Повреждения плодов и листьев у сорта Denise Blue, возникшие в результате заморозка

Fig. 2. Frost damage to Denise Blue fruits and leaves

Анализ влияния погодно-климатических факторов на завязываемость плодов голубики показал, что выраженный дефицит осадков во время цветения и роста плодов на фоне повышенной среднесуточной температуры воздуха весьма негативно сказывается на проценте выхода зрелых ягод. И наоборот, выпадение осадков в количествах, близких к климатической норме или несколько превышающих ее, в сочетании с температурой, близкой к среднемноголетним значениям, способствует повышению завязываемости плодов голубики. Так, низкая средняя опыляемость цветков голубики в 2018 г., составившая 88 %, была обусловлена острым дефицитом осадков (17 % от климатической нормы за месяц) на фоне повышенных среднесуточных температур воздуха (124 %) в период цветения, что привело к частичному осыпанию цветков. И наоборот, в 2019–2020 гг., когда во время цветения голубики суммы выпавших осадков варьировались от значений, близких к средней многолетней норме, до значений, превышающих ее в 2–4 раза, опыляемость составила 94 и 91 % соответственно. Следует отметить, что обильные осадки, в несколько раз превышающие климатическую норму, ограничивают лет насекомых – опылителей голубики (шмелей, пчел и др.), что приводит к снижению опыляемости цветков. При этом немаловажную роль играет не только обильность осадков, но и их распределение. Так, в 2019 и 2020 гг. сумма выпавших осадков во время цветения, как правило, превышала климатическую норму и составила 105,5 и 122,9 мм соответственно. При этом за весь период цветения в 2019 г. 50 % дней были с дождем, причем обильные осадки, превышающие среднемноголетнюю норму за декаду в 4 раза (391 %), отмечены лишь в начале цветения, а в период массового цветения сумма выпавших осадков приближалась к среднемноголетнему значению (93 %). В 2020 г. в период цветения 64 % дней были дождливыми, при этом осадки, превышающие климатическую норму за декаду в 2 раза (196 и 220 %), выпали преимущественно в период массового цветения голубики. Ввиду этого можно предположить, что снижение среднего показателя опыляемости цветков голубики в 2020 г. (91 %), по сравнению с показателем 2019 г. (94 %), обусловлено дождливой погодой в период массового цветения голубики. Согласно литературным данным [22; 25], засуха и жара во время цветения приводят к плохому завязыванию плодов. В работе [17] также отмечается, что лучшая завязываемость ягод голубики наблюдалась, когда во время цветения температура была несколько ниже, а влажность воздуха увеличивалась.

Несмотря на наибольшие средние показатели опыляемости в 2019 г., максимальный выход зрелых плодов от числа цветков зафиксирован в 2020 г. (в среднем 84 %). Анализ соотношения опыляемости и завязываемости показывает, что число плодов на ранней стадии развития (до 5 мм в диаметре), как правило, больше числа созревших ягод, причем потери варьируются в достаточно широких пределах – от 7 % в 2020 г. до 31 % в 2018 г. В 2019 г. уменьшение выхода зрелых плодов от числа цветков в среднем на 21 % относительно показателей опыляемости главным образом обусловлено дефицитом осадков (70 % от климатической нормы) на фоне повышенных среднесуточных температур (126 %) в период интенсивного роста и формирования ягод. В 2020 г. отмечены наименьшие потери плодов на стадии их роста, составившие 7 %, что объясняется благоприятными погодными условиями: температуры воздуха (100–117 %) и суммы осадков (96–110 %) находились в пределах среднесуточных месячных норм либо незначительно превышали их. Следует отметить, что такие метеорологические факторы, как осадки и температура воздуха, воздействуют на растение одновременно и каждый из них может как смягчить негативное действие другого фактора, так и усугубить его. Например, повреждающее действие на генеративную сферу голубики при дефиците осадков будет более выраженным при повышенной температуре окружающего воздуха и, соответственно, менее значительным, когда среднесуточная температура близка к среднесуточным значениям либо несколько ниже их.

Заключение

Показатели завязываемости плодов у сортов голубики высокорослой изменяются в достаточно широких пределах и в среднем составляют от 46 % у сорта Chandler до 83 % у сорта Sunrise. Степень изменчивости значений выхода зрелых ягод от числа цветков у исследуемых таксонов значительно варьировалась по годам – от низкого (Bluejay, Nui, Puru, Spartan, Sunrise) до очень высокого (Bonus) уровня. Выявлено, что чем ниже уровень изменчивости значений завязываемости ягод у того или иного сорта голубики, тем более стабильным плодоношением и, как следствие, более высокой адаптивной способностью к изменению погодных факторов района интродукции он характеризуется. Высокие и достаточно стабильные показатели завязываемости плодов в условиях района интродукции отмечены у среднеспелых сортов Sunrise, Toro, Nui, Puru, а также раннеспелых культиваров Bluejay, Spartan и Collins. Показатели завязываемости плодов новых интродуцируемых сортов голубики высокорослой в условиях Белорусского Полесья сопоставимы с данными, полученными для исследуемых таксонов в условиях их родины, а также соседней страны (Польша).

На завязываемость плодов голубики оказывают влияние такие погодные факторы, как осадки и температура воздуха. Осадки, выпадающие в количествах, близких к среднесуточным значениям либо несколько превышающих их, а также температура воздуха, близкая к климатической норме, способствуют повышению завязываемости плодов голубики. Выраженный дефицит осадков во время цветения и роста ягод, особенно на фоне повышенной среднесуточной температуры, равно как и дождливая погода в период массового цветения голубики, приводит к снижению завязываемости плодов. Основным лимитирующим температурным фактором во время цветения и формирования ягод голубики являются заморозки.

Полученные данные о сортовой специфике завязываемости плодов можно использовать при прогнозировании потенциально возможной урожайности растений голубики по цветению с учетом других компонентов продуктивности.

Библиографические ссылки

1. Павловский НБ. Плодоношение сортов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) в Беларуси. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2018;63(4):486–499. DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-4-486-499.
2. Сорокина ГВ. Влияние метеорологических факторов на сохранность генеративных почек голубики. В: Багинский ВФ, Аксамитова ЭВ, Дворник АМ, Усень ВВ, Волчков ВЕ, Баранов ОЮ и др., редакторы. *Лес в жизни восточных славян от Киевской Руси до наших дней. Сборник докладов Международной научной конференции; 27–29 июня 2003 г.; Гомель, Беларусь*. Гомель: Институт леса Национальной академии наук Беларуси; 2003. с. 196–198 (Сборник научных трудов Института леса Национальной академии наук Беларуси; выпуск 57).
3. Морозов ОВ, Яковлев АП. Цветение и плодоношение голубики узколистной (*Vaccinium angustifolium* Ait.) при интродукции в условиях Беларуси. В: Ковалевич АИ, Усень ВВ, Трухоневец ВВ, Гедых ВБ, Гримашевич ВВ, Тарасенко ВП и др., редакторы. *Теоретические и прикладные аспекты рационального использования и воспроизводства недревесной продукции леса. Материалы Международной научно-практической конференции; 10–12 сентября 2008 г.; Гомель, Беларусь*. Гомель: Институт леса Национальной академии наук Беларуси; 2008. с. 267–275.
4. Тяк ГВ. Развитие репродуктивных и вегетативных органов и возможность прогнозирования урожая клюквы и черники. В: Дудин ВА, редактор. *Повышение продуктивности лесов южной тайги*. Москва: Всесоюзный научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства; 1985. с. 78–85.

5. Скрябина АА. К вопросу прогнозирования цветения голубики по генеративным почкам. *Растительные ресурсы*. 1971; 7(1):91–95.
6. Курлович ТВ, Босак ВН. *Голубика высокорослая в Беларуси*. Минск: Беларуская навука; 1998. 176 с.
7. Конобеева АБ. *Брусничные в Центрально-Черноземном регионе*. Мичуринск: Издательство Мичуринского государственного аграрного университета; 2007. 230 с.
8. Скрябина АА. Цветение и плодоношение *Vaccinium uliginosum* L. *Растительные ресурсы*. 1970;6(2):206–212.
9. Юркевич ИД, Голод ДС, Ярошевич ЭП. *Фенологические исследования древесных и травянистых растений*. Минск: Наука и техника; 1980. 87 с.
10. Смирнов ВС. Изменчивость биологических явлений и коэффициент вариации. *Журнал общей биологии*. 1971;32(2): 152–162.
11. Седов ЕН, Огольцова ТП, редакторы. *Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур*. Орел: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур; 1999. 608 с.
12. Shutak VG, Marucci PE. Chapter 8. Plant and fruit development. In: Eck P, Childers NF, editors. *Blueberry culture*. New Brunswick: Rutgers University Press; 1966. p. 179–198.
13. MacKenzie KE. Pollination requirements of three highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1997;122(6):891–896. DOI: 10.21273/JASHS.122.6.891.
14. Bieniasz M. Ocena samopłodności kilkunastu odmian borówki wysokiej. In: Krupa T, redaktor. *Przyrodnicze uwarunkowania uprawy borówki wysokiej (Vaccinium corymbosum L.). Tom IV*. Warszawa: Hortpress; 2013. s. 85–93.
15. Wach D. Charakterystyka zawiązywania owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w warunkach Lubelszczyzny na tle wybranych odmian. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio EEE: Horticultura*. 2004;14:1–6.
16. Bożek M. Flowering and fruit set of six cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in the conditions of the Lublin region. *Acta Agrobotanica*. 2009;62(1):91–96. DOI: 10.5586/aa.2009.011.
17. Jabłoński B, Król S, Pliszka K, Żurowska Z. Nektarowanie i zapylanie borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. 1983;27:91–109.
18. Ehlenfeldt MK. Self- and cross-fertility in recently released highbush blueberry cultivars. *HortScience*. 2001;36(1):133–135. DOI: 10.21273/HORTSCI.36.1.133.
19. Приходько СЛ. Урожайность сортов *Vaccinium covealeanum* But. et Pl. В: *Промышленная ботаника: состояние и перспективы развития. Материалы VII Международной научной конференции; 17–19 мая 2017 г.; Донецк, Украина*. Ростов-на-Дону: Альтаир; 2017. с. 356–358.
20. Ожерельева ЗЕ, Курашѣв ОВ. Изучение устойчивости крыжовника к весенним заморозкам. В: Самусь ВА, Матвеев ВА, Шмыглевская НА, Андрушкевич ТМ, Васеха ВВ, Гашенко ТА и др., редакторы. *Плодоводство. Том 28 = Fruit-growing. Volume 28*. Самохваловичи: [б. и.]; 2016. с. 301–306.
21. Ожерельева ЗЕ, Ефремов ИН. Оценка устойчивости генеративных органов вишни к весенним заморозкам. *Современное садоводство*. 2018;3:63–68. DOI: 10.24411/2312-6701-2018-10309.
22. Gough RE. *The highbush blueberry and its management*. New York: Food Products Press; 1994. 288 p. DOI: 10.1201/9781482298000.
23. Соловьева МА. *Атлас повреждений плодовых и ягодных культур морозами*. Киев: Урожай; 1988. 176 с.
24. Туровцев НИ, Тараненко ЛИ, Павлюк ВВ, Ласкавий ВФ, Мищенко ВФ, Мойсейченко НВ и др. *Слива, вишня, черешня*. Андрейченко МВ, Кондратенко ПВ, редакторы. Киев: Урожай; 2004. 272 с. (Помология; том 4).
25. Павловский НБ. Влияние температурного режима на урожайность сортов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum*), интродуцированных в Белорусском Полесье. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2010;3:13–18.
26. Сорокина ГВ. Воздействие заморозков на генеративные органы голубики топяной (*Vaccinium uliginosum* L.) при выращивании ее в культуре. В: *Плодоводство. Том 17. Часть 1*. Самохваловичи: [б. и.]; 2005. с. 247–251.

References

1. Pavlovskiy NB. Fruiting of varieties of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Belarus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2018;63(4):486–499. Russian. DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-4-486-499.
2. Sorokina GV. [Influence of meteorological factors on the safety of generative blueberry buds]. In: Baginskii VF, Aksamitova EV, Dvornik AM, Usenya VV, Volchikov VE, Baranov OYu, et al., editors. *Les v zhizni vostochnykh slavyan ot Kievskoi Rusi do nashikh dnei. Sbornik dokladov Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii; 27–29 iyunya 2003 g.; Gomel', Belarus'* [Forest in the life of the Eastern Slavs from Kievan Rus to the present day. Collection of reports of the International scientific conference; 2003 June 27–29; Gomel, Belarus]. Gomel: Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus; 2003. p. 196–198 (Sbornik nauchnykh trudov Instituta lesa Natsional'noi akademii nauk Belarusi; issue 57). Russian.
3. Morozov OV, Yakovlev AP. [Flowering and fruiting of angustifolium blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) when introduced in Belarus]. In: Kovalevich AI, Usenya VV, Trukhonovets VV, Gedykh VB, Grimashevich VV, Tarasenko VP, et al., editors. *Teoreticheskie i prikladnye aspekty ratsional'nogo ispol'zovaniya i vosproizvodstva nedrevesnoi produktsii lesa. Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 10–12 sentyabrya 2008 g.; Gomel', Belarus'* [Theoretical and applied aspects of the rational use and reproduction of non-timber forest products. Materials of the International scientific and practical conference; 2008 September 10–12; Gomel, Belarus]. Gomel: Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus; 2008. p. 267–275. Russian.
4. Tyak GV. [Development of reproductive and vegetative organs and the possibility of predicting the yield of cranberries and blueberries]. In: Dudin VA, editor. *Povyshenie produktivnosti lesov yuzhnoi taigi* [Increasing the productivity of the forests of the southern taiga]. Moscow: Vsesoyuznyi nauchno-issledovatel'skii institut lesovodstva i mekhanizatsii lesnogo khozyaistva; 1985. p. 78–85. Russian.
5. Skryabina AA. [On the issue of predicting the flowering of blueberries by generative buds]. *Rastitel'nye resursy*. 1971;7(1):91–95. Russian.
6. Kurlovich TV, Bosak VN. *Golubika vysokoroslaya v Belarusi* [Highbush blueberry in Belarus]. Minsk: Belaruskaja navuka; 1998. 176 p. Russian.

7. Konobeeva AB. *Brusnichnye v Central'no-Chernozemnom regione* [Cowberry's in the Central Black Earth region]. Michurinsk: Publishing House of the Michurinsk State Agrarian University; 2007. 230 p. Russian.
8. Skryabina AA. [Flowering and fruiting of *Vaccinium uliginosum* L.]. *Rastitel'nyye resursy*. 1970;6(2):206–212. Russian.
9. Yurkevich ID, Golod DS, Yaroshevich EP. Fenologicheskie issledovaniya drevesnykh i travyanistyykh rastenii [Phenological studies of woody and herbaceous plants]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1980. 87 p. Russian.
10. Smirnov VS. [Variability of biological phenomena and the coefficient of variation]. *Zhurnal obshchei biologii*. 1971;32(2):152–162. Russian.
11. Sedov EN, Ogoľtsova TP, editors. *Programma i metodika sortoizucheniya plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kul'tur* [Program and methods cultivar fruit, berry and nut crops]. Orel: Vserossiiskii nauchno-issledovatel'skii institut selektsii plodovykh kul'tur; 1999. 608 p. Russian.
12. Shutak VG, Marucci PE. Chapter 8. Plant and fruit development. In: Eck P, Childers NF, editors. *Blueberry culture*. New Brunswick: Rutgers University Press; 1966. p. 179–198.
13. MacKenzie KE. Pollination requirements of three highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1997;122(6):891–896. DOI: 10.21273/JASHS.122.6.891.
14. Bieniasz M. Ocena samopłodności kilkunastu odmian borówki wysokiej. In: Krupa T, redaktor. *Przyrodnicze uwarunkowania uprawy borówki wysokiej (Vaccinium corymbosum L.). Tom IV*. Warszawa: Hortpress; 2013. s. 85–93.
15. Wach D. Charakterystyka zawiązywania owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w warunkach Lubelszczyzny na tle wybranych odmian. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio EEE: Horticultura*. 2004;14:1–6.
16. Bożek M. Flowering and fruit set of six cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in the conditions of the Lublin region. *Acta Agrobotanica*. 2009;62(1):91–96. DOI: 10.5586/aa.2009.011.
17. Jabłoński B, Król S, Pliszka K, Żurowska Z. Nektarowanie i zapylanie borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.). *Pszczelnice Zeszyty Naukowe*. 1983;27:91–109.
18. Ehlenfeldt MK. Self- and cross-fertility in recently released highbush blueberry cultivars. *HortScience*. 2001;36(1):133–135. DOI: 10.21273/HORTSCI.36.1.133.
19. Prikhod'ko SL. [Yield of *Vaccinium coveleanum* But. et Pl. cultivars]. In: *Proyshlennaya botanika: sostoyanie i perspektivy razvitiya. Materialy VII Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii; 17–19 maya 2017 g.; Donetsk, Ukraina* [Industrial botany: state and development prospects. Materials of the 7th International scientific conference; 2017 May 17–19; Donetsk, Ukraine]. Rostov-on-Don: Al'tair; 2017. p. 356–358. Russian.
20. Ozherelieva ZE, Kurashev OV. Study of gooseberry resistance to spring frosts. In: Samus VA, Matveyev VA, Shmiglevskaya NA, Andrushkevich TM, Vasekha VV, Gashenko TA, editors. *Fruit-growing. Volume 28*. Samachvalavičy: [s. n.]; 2016. p. 301–306. Russian.
21. Ozherelieva ZE, Efremov IN. The assessment of resistance of cherry generative organs to spring frosts. *Contemporary Horticulture*. 2018;3:63–68. Russian. DOI: 10.24411/2312-6701-2018-10309.
22. Gough RE. *The highbush blueberry and its management*. New York: Food Products Press; 1994. 288 p. DOI: 10.1201/9781482298000.
23. Solov'eva MA. *Atlas povrezhdenii plodovykh i yagodnykh kul'tur morozami* [Atlas of frost damage to fruit and berry crops]. Kyiv: Urozhai; 1988. 176 p. Russian.
24. Turovtsev NI, Taranenko LI, Pavlyuk VV, Laskavyi VF, Mishchenko VF, Moiseichenko NV, et al. *Sliva, vishnya, cheresnya* [Plum, cherry, sweet cherry]. Kyiv: Urozhai; 2004. 272 p. (Pomologiya; volume 4). Russian.
25. Pavlovski NB. Influence of the temperature regime on the yield of the highbush blueberry cultivars introduced in Belarus Polesje region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2010;3:13–18. Russian.
26. Sorokina GV. [Effect of frost on the generative organs of marsh blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) when growing in culture]. In: *Plodovodstvo. Tom 17. Chast' I* [Fruit-growing. Volume 17. Part 1]. Samachvalavičy: [s. n.]; 2005. p. 247–251. Russian.

Получена 14.09.2021 / исправлена 11.01.2022 / принята 11.01.2022.
Received 14.09.2021 / revised 11.01.2022 / accepted 11.01.2022.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

BIODIVERSITY

УДК 582.361:581.9(476.2)

CREPIS RHOEADIFOLIA M. BIEB. (COMPOSITAE) ВО ФЛОРЕ БЕЛАРУСИ

Н. А. ЛИТВИНОВА¹⁾

¹⁾Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины,
ул. Советская, 104, 246019, г. Гомель, Беларусь

В 2021 г. было обнаружено третье местонахождение *Crepis rheadifolia* M. Bieb. в Беларуси за последние 120 лет. Дана фитоценотическая характеристика местообитания *C. rheadifolia* в Ветковском районе Гомельской области, особое внимание уделено географическому распространению вида. Составлена карта общего ареала *C. rheadifolia*, которая отражает современное распространение вида. С помощью программы *MaxEnt* выявлена эколого-климатическая ниша *C. rheadifolia*, что позволило сделать вывод о заносной природе и перспективе дальнейшего распространения вида в Беларуси.

Ключевые слова: *Crepis rheadifolia*; флора Беларуси; фитоценотическая характеристика; географическое распространение; ареал.

Благодарность. Автор выражает благодарность Е. Я. Куликовой (Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси, БГУ) за помощь в определении типа фитоценоза.

CREPIS RHOEADIFOLIA M. BIEB. (COMPOSITAE) IN THE FLORA OF BELARUS

N. A. LITVINOVA^a

^aFrancisk Skorina Gomel State University, 104 Saveckaja Street, Homiel 246019, Belarus

In 2021, the third location of *Crepis rheadifolia* M. Bieb. was identified in Belarus for the last 120 years. The article gives a phytocenotic characteristic of the habitat of *C. rheadifolia* in the Vetkovsky District of the Gomel Region, special attention is paid to the geographical distribution of the species. A map of the general range of *C. rheadifolia* has been

Образец цитирования:

Литвинова НА. *Crepis rheadifolia* M. Bieb. (Compositae) во флоре Беларуси. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:81–89.

For citation:

Litvinova NA. *Crepis rheadifolia* M. Bieb. (Compositae) in the flora of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:81–89. Russian.

Автор:

Наталья Александровна Литвинова – аспирантка кафедры геологии и географии геолого-географического факультета. Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент В. Н. Тихомиров.

Author:

Natalia A. Litvinova, postgraduate student at the department of geology and geography, faculty of geology and geography.
litvinova-85@list.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1430-8105>

compiled, which reflects the current distribution of the species. With the help of the *MaxEnt* program, the ecological and climatic niche of *C. rhoeadifolia* was identified, which allows us to come to the conclusion about the adventitious origin and the prospect of further distribution of the species in Belarus.

Keywords: *Crepis rhoeadifolia*; flora of Belarus; phytocenotic characteristics; geographical distribution; area.

Acknowledgements. The author grateful to E. Ya. Kulikova (Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarusian State University) for her help in determining the type of phytocenosis.

Введение

В связи с возрастающей антропогенной нагрузкой на природу и климатическими изменениями важно проследить темпы и степень трансформации растительного покрова. Проблема сохранения биоразнообразия остается ключевой и требует незамедлительных решений. Изучение изменения различных параметров флоры возможно благодаря исследованию динамики ареала отдельных видов.

В ходе геоботанических исследований 25 июля 2021 г. в окрестностях аг. Старое Село Ветковского района Гомельской области нами обнаружена скерда маколистная (*Crepis rhoeadifolia* M. Bieb.). Впервые для флоры Беларуси скерда маколистная была указана И. К. Пачоским в 1897 г. под названием *Barkhausia rhoeadifolia* и отмечена как очень редкое растение. Вид найден 23 июля в сосновом лесу на поляне около д. Ручаевки Речицкого уезда Минской губернии (сейчас – Лоевский район Гомельской области) с цветами и плодами [1]. Этот экземпляр хранится в гербарии Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН в Санкт-Петербурге.

В издании «Флора БССР» (1959) *B. rhoeadifolia* упоминается только для Лоевского района Гомельской области [2]. При этом указывается, что вид встречается в песчаных местах как сорняк. Ранее В. А. Михайловская отмечала, что данный вид растет на травянистых склонах и в сосновых лесах на полянах, и приводила его для двух местонахождений – д. Ручаевки в Гомельской области и окрестностей Минска [3]. Вероятнее всего, указание для окрестностей Минска является ошибочным, так как в более поздней литературе это местонахождение больше не приводится.

В списке флоры Беларуси Н. В. Козловской [4] *C. rhoeadifolia* (*B. rhoeadifolia*) отсутствует, как и в систематическом списке видов сосудистых растений флоры Белорусского Полесья В. И. Парфенова [5]. Вид упоминается в издании «Определитель высших растений Беларуси» (1999) под редакцией В. И. Парфенова только для окрестностей д. Ручаевки [6].

В 2013 г. спустя почти 120 лет Д. В. Дубовиком и А. Н. Скуратовичем *C. rhoeadifolia* была обнаружена в Слонимском районе Гродненской области – в песчано-гравийном карьере в окрестностях д. Вороницы и на краю грунтовой дороги в окрестностях д. Чемеры [7, с. 130]. В последний локалитет скерда маколистная занесена с песчано-гравийным материалом из карьера в окрестностях д. Вороницы (здесь вид был довольно обилен) при реконструкции дороги [7, с. 130].

Данный вид является редким для Беларуси и требует дальнейшего изучения. Будучи теплолюбивым южным растением, *C. rhoeadifolia* выступает одним из примеров поведения субпонтического вида в условиях изменения климата и антропогенного преобразования природы.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились в июле 2021 г. маршрутным методом. Для фитоценотической характеристики мест произрастания изучаемого таксона применялся метод пробных площадей [8, с. 183–187]. При анализе распространения *C. rhoeadifolia* использовались данные GBIF¹ и источники [2; 7; 9–18]. Подготовка картографического материала осуществлялась с помощью геоинформационной системы QGIS и карты 2GIS. В целях выявления эколого-климатической ниши вида использовалась программа *MaxEnt* и 19 биоклиматических переменных (BioClim) базы данных WorldClim².

Результаты и их обсуждение

Род *Crepis* относится к семейству астровых (Asteraceae) и насчитывает 252 вида³. Представители рода *Crepis* обитают преимущественно в Европе, Азии, Африке и Северной Америке. В Беларуси произрастают 8 видов скерд: *C. praemorsa*, *C. paludosa*, *C. mollis*, *C. capillaris*, *C. biennis*, *C. tectorum*, *C. alpina*, *C. rhoeadifolia* [6].

¹GBIF [Electronic resource]. URL: <https://www.gbif.org> (date of access: 25.08.2021).

²WorldClim [Electronic resource]. URL: <https://worldclim.org> (date of access: 21.08.2021).

³The Plant List [Electronic resource]. URL: <http://www.theplantlist.org> (date of access: 21.08.2021).

Таксономия *C. rhoeadifolia* спорна. Род *Barkhausia* морфологически отличается от близкого рода *Crepis* наличием хорошо выраженного хохолка, что может рассматриваться как признак для их разграничения. Вид *C. rhoeadifolia* (*B. rhoeadifolia*) очень схож с близким видом *C. foetida* L., и зачастую они считаются одним видом. Таксономия *C. rhoeadifolia* и *C. foetida* еще недостаточно изучена.

Морфологическая характеристика вида *C. rhoeadifolia* приводится на основе литературных данных [2; 6; 19; 20] и собранного нами гербарного образца.

C. rhoeadifolia M. Bieb. – однолетнее или двулетнее растение высотой 20–60 см (рис. 1), более или менее равномерно покрытое довольно длинными, изогнутыми, оттопыренными, жесткими волосками. Корень стержневой, вертикальный или косой. Стебель чаще одиночный, прямостоячий или восходящий, разветвленный, с раскидистыми ветвями, тонкорребристо-бороздчатый, олистенный. Прикорневые и нижние стеблевые листья до 20 см длиной и до 4–5 см шириной, обратноланцетные, продолговато-обратноланцетные, реже эллиптически-обратноланцетные, на верхушке от туповатых до острых, выемчато-зубчатые, чаще перисто-лопастные, струговидно-перисто-раздельные или почти перисто-рассеченные, с более крупной непарной верхней долей, по краям зубчатые. Средние стеблевые листья сходны с прикорневыми и нижними стеблевыми, продолговатые или продолговато-ланцетные, сидячие, при основании с острыми ушками. Верхние листья значительно меньше, сидячие, при основании стеблеобъемлющие. Цветочные корзинки в рыхлом, щитковидном соцветии, до цветения поникающие. Обертки во время плодоношения ширококолокольчатые, 10–15 мм длиной и 8–12 мм шириной. Лепестки обертки снаружи усажены густыми, довольно длинными, нежелезистыми, желтоватыми щетинками. Наружные лепестки обертки (в количестве 9–13) неравные по длине, линейно-ланцетные, острые, без перепончатого окаймления; внутренние лепестки обертки (в количестве 12–14) равновеликие, продолговато-ланцетные, к верхушке суженные, туповатые, перепончато-окаймленные, на внутренней поверхности густоприжатопушенные. Цветки желтые, часто красновато-пурпуровые на наружной поверхности язычков; язычок около 2 мм шириной; трубка венчика 4–8 мм длиной, опушенная рассеянными короткими игловидными волосками; ветви столбика темно-зеленые, зеленоватые или желтые; семянки двух типов: краевые семянки светло-коричневые, 5–7 мм длиной и 0,6–0,8 мм шириной, веретеновидные, едва сжатые, к верхушке суженные, без носика, слабобороздчатые; внутренние семянки коричневые, 10–16 мм длиной, с расширенной частью 4–6 мм длиной и 0,4–0,5 мм шириной, веретеновидные, постепенно вытянутые в тонкий носик 5–10 мм длиной, с 15–18 узкими выступающими ребрышками. Хохолок 6–8 мм длиной, у краевых семянок более короткий (4,5–6,0 мм длиной), белый, непадающий, значительно превышающий обертку. Набор хромосом – $2n = 10$.

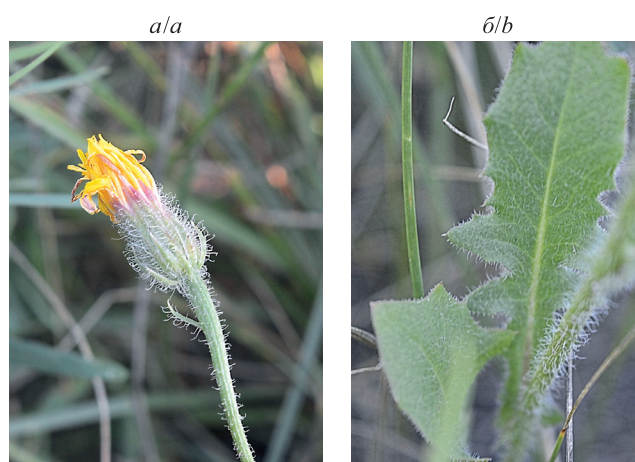


Рис. 1. Образец *C. rhoeadifolia* из окрестностей
аг. Старое Село Ветковского района

Fig. 1. A sample of *C. rhoeadifolia* from the vicinity
of Old Village agricultural town of the Vetkovsky District

В работе [21, S. 324] *C. rhoeadifolia* рассматривается как подвид *C. foetida*, приводится карта общего ареала данного вида и его подвидов. В связи с обнаружением новых местонахождений и появлением более современных методов исследования географического распространения растений возникла необходимость уточнить и дополнить карту общего ареала *C. rhoeadifolia*. На составленной нами карте граница ареала проходит севернее, отмечены значительные популяции вида во Франции и Италии, указаны новые местонахождения в странах Европы (Бельгия, Нидерланды, Дания, Беларусь, Россия и др.). В результате сравнения ареалов *C. rhoeadifolia* можно прийти к выводу, что данный вид имеет современную тенденцию к продвижению на север.

На основе данных GBIF и источников [2; 7; 9–18] нами была составлена карта общего ареала *C. rhoeadifolia* в системе QGIS (рис. 2). В Европе ареал этого таксона простирается от побережья Черного моря на запад через Украину и Молдову, Балканский полуостров, Центральную Европу, северную часть Италии до юго-запада Франции. На север от основного ареала *C. rhoeadifolia* известна только на антропогенных местообитаниях. За пределами Европы вид встречается на Кавказе, в Малой Азии, на севере Ирана⁴ [9; 19]. *C. rhoeadifolia* отмечена в Германии, Австрии, Бельгии, Нидерландах, Дании, Италии, Франции, Чехии, Словакии, Венгрии, Словении, Хорватии, Сербии, Черногории, Румынии, Албании, Греции, Болгарии, Македонии, Польше, России, Беларуси, Украине, Молдове, Турции, Грузии, Азербайджане, Армении, Туркменистане, Иране⁵ [11; 19].

Скерда маколистная является евроазиатским субпонтическим видом. Основные популяции *C. rhoeadifolia* сосредоточены на южном и западном побережьях Каспийского моря, в Причерноморье и Крыму, на побережье Азовского моря, в Поднепровье Украины, в южной части Балканского полуострова, на юго-востоке Франции и в Центральной Европе. *C. rhoeadifolia* произрастает в Верхней Силезии и районе Гроссштайна (юго-запад Польши), Чехии, низменности Эльбы (Германия), отмечена в Мангейме, Людвигсхафене и Мюнхене, часто встречается в Австрии [22, S. 1175].



Рис. 2. Общий ареал *C. rhoeadifolia*

Fig. 2. General range of *C. rhoeadifolia*

Сейчас *C. rhoeadifolia* встречается далеко от своего первичного ареала, что связано с заносом растений, особенно благодаря наземному транспорту. Во вторичных ареалах скерда маколистная произрастает в антропогенных местообитаниях (прежде всего в карьерах, на обочинах автомобильных дорог, около железнодорожных путей), близких к своим естественным местообитаниям по экологическим условиям.

В естественных местообитаниях *C. rhoeadifolia* растет в степях, песчаных местах и на приморских песках, среди кустарников, на каменистых и щебнистых травянистых склонах, каменистых известняковых грядках, в сорных местах, на лесных полянах и вырубках, в посевах как сорняк, вдоль автомобильных дорог и железнодорожных путей, в карьерах [6; 9–12; 19; 20], встречается до среднего пояса гор на высоте до 2000 м над уровнем моря [19]. По экологической шкале Ландольта вид имеет следующие оптимальные характеристики: температура – 5, континентальность – 3, увлажнение почвы – 1, кислотность почвы – 3, азотообеспеченность – 4, гумус – 3, гранулометрический состав – 3, освещенность – 4. Согласно шкале Ландольта *C. rhoeadifolia* является теплолюбивым видом, может расти на очень сухих почвах и выступает индикатором сухих местообитаний.

C. rhoeadifolia была обнаружена нами в окрестностях аг. Старое Село Ветковского района в составе рудерального сообщества *Calamagrostidetum epigeios* var. *Apera spica-venti*. Растения (5 особей) росли вдоль грунтовой дороги, ведущей из аг. Старое Село по направлению к р. Сож. По одну сторону от дороги находились посевы кукурузы, по другую – травянисто-кустарниковая растительность окрестностей оз. Чечель.

⁴GBIF [Electronic resource]. URL: <https://www.gbif.org> (date of access: 25.08.2021).

⁵Ibid.

Для фитоценотической характеристики местообитания *C. rhoeadifolia* нами были заложены три пробные площади (ПП) размером 2×10 м в местах произрастания растений:

- ПП № 1 ($52,52453^\circ$ с. ш., $31,14774^\circ$ в. д.) – к дороге прилегали посевы кукурузы, 2 особи *C. rhoeadifolia* имели высоту около 30 см, были нормально развиты, находились в фазе цветения, общее проективное покрытие травянистого покрова составило примерно 40 %;

- ПП № 2 ($52,52407^\circ$ с. ш., $31,14774^\circ$ в. д.) – к дороге прилегала травянисто-кустарниковая растительность окрестностей оз. Чечель, 1 особь *C. rhoeadifolia* имела высоту 32 см, была нормально развита, находилась в фазе цветения, общее проективное покрытие травянистого покрова составило около 50 %;

- ПП № 3 ($52,5455^\circ$ с. ш., $31,14663^\circ$ в. д.) – к дороге прилегала травянисто-кустарниковая растительность окрестностей оз. Чечель, 2 особи *C. rhoeadifolia* имели высоту около 30 и 50 см, были нормально развиты, находились в фазе цветения, общее проективное покрытие травянистого покрова составило примерно 80 %.

Краткая фитоценотическая характеристика местонахождения *C. rhoeadifolia* в окрестностях аг. Старое Село Ветковского района приведена в таблице. В характеристике использована шкала обилия Браун-Бланке [8, с. 195–196].

В северной части своего ареала *C. rhoeadifolia* встречается преимущественно в рудеральных сообществах, в то время как в более южных районах – в естественных, полуестественных и антропогенных. В Польше, Германии, Австрии, Словакии, Чехии вид обитает в основном на антропогенных участках [9].

C. rhoeadifolia часто образует ассоциацию *Dauco-Crepidetum rhoeadifoliae* Hejný & Grüll in Hejný, Kopecky, Jehlik & Krippelova 1979 и союз *Dauco carotae-Melilotion albi* Görs 1966 в пределах как северной, так и южной части ареала [9; 23]. В Крыму ассоциация *Dauco-Crepidetum rhoeadifoliae* представлена ксерофильными летними сообществами многолетних агрофитоценозов (сады, насаждения розы и лаванды) на бурых лесных, бурых степных, луговых, дерновых и коричневых почвах [23, с. 47]. Помимо *C. rhoeadifolia*, союз *Dauco carotae-Melilotion albi* образован *Daucus carota* L., *Melilotus albus* Medik., а также *Echium vulgare* L., *Cichorium intybus* L., *Pastinaca sativa* L., *Picris hieracioides* L., *Verbascum lychnitis* L. [23, с. 47]. Он включает рудеральную растительность с преобладанием двулетних и многолетних видов, часто образующих начальные стадии сукцессии на антропогенных субстратах⁶ [23]. Это растительное сообщество существовало еще в Средние века, но широко распространилось в XX в. в связи с развитием дорожной и железнодорожной сети, строительством зданий и горнодобывающей деятельностью⁷. *C. rhoeadifolia* входит в рудеральные сообщества, в которых большую роль играют *C. tectorum*, *C. biennis*, *Medicago lupulina*, *Plantago lanceolata*, *Trifolium repens*, *Daucus carota*, *Conyza canadensis*, *Erigeron annuus*, *Melilotus albus*, *M. officinalis*, *Echium vulgare*, *Erysimum hieracifolium* [9].

**Фитоценотическая характеристика местонахождения *C. rhoeadifolia*
в окрестностях аг. Старое Село Ветковского района**

**Phytocenotic characteristics of the location of *C. rhoeadifolia*
in the vicinity of Old Village agricultural town of the Vetkovsky District**

Вид	ПП № 1	ПП № 2	ПП № 3
<i>Achillea millefolium</i> L. s. l.	+	+	+
<i>Apera spica-venti</i> (L.) P. Beauv.	3	2	3
<i>Artemisia campestris</i> L.	+	+	+
<i>Berteroa incana</i> (L.) DC.	+	+	+
<i>Bromopsis inermis</i> (Leyss.) Holub	+	–	–
<i>Calamagrostis epigeios</i> (L.) Roth	2	3	2
<i>Cichorium intybus</i> L.	+	–	–
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronq.	1	1	1
<i>Crepis rhoeadifolia</i> M. Bieb.	r	r	r
<i>Digitaria aegyptiaca</i> (Retz.) Willd.	–	r	–
<i>Euphorbia uralensis</i> Fisch. ex Link	+	–	+
<i>Galium verum</i> L.	+	–	+

⁶Pladias [Electronic resource]. URL: <https://pladias.cz> (date of access: 24.08.2021).

⁷Ibid.

Окончание таблицы
Ending table

Вид	ПП № 1	ПП № 2	ПП № 3
<i>Hieracium umbellatum</i> L.	–	–	+
<i>Lepidium densiflorum</i> Schrad.	+	+	–
<i>Lolium perenne</i> L.	–	+	–
<i>Melandrium album</i> (Mill.) Garcke	+	+	–
<i>Melilotus albus</i> Medik.	+	–	–
<i>Oenothera villosa</i> Thunb.	+	+	+
<i>Plantago lanceolata</i> L.	+	+	+
<i>Plantago major</i> L.	–	+	–
<i>Rumex thyrsoiflorus</i> Fingerh.	–	+	+
<i>Saponaria officinalis</i> L.	+	–	–
<i>Setaria viridis</i> (L.) P. Beauv.	–	+	+
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	+	+	2

Примечание. Прочерк означает, что вид не был представлен на данной ПП; г – проективное покрытие менее 1 %; знак «+» – проективное покрытие от 1 до 5 %; 1 – проективное покрытие от 5 до 10 %; 2 – проективное покрытие от 10 до 25 %; 3 – проективное покрытие от 25 до 50 %; 4 – проективное покрытие от 50 до 75 %; 5 – проективное покрытие более 75 %.

В целях выявления эколого-климатической ниши вида и особенностей его распространения нами было проведено моделирование географического распространения вида методом максимальной энтропии с помощью программы *MaxEnt*. При этом использовались координаты находок *C. rhoeadifolia* и 19 биоклиматических переменных базы данных WorldClim, усредненных за временной интервал с 1950 по 2000 г.

Проанализировав графический результат пространственного моделирования ареала *C. rhoeadifolia* (рис. 3), можно убедиться, что климатические условия Беларуси не являются приемлемыми для данного таксона (оттенками синего цвета показаны территории с неблагоприятными климатическими условиями для вида).

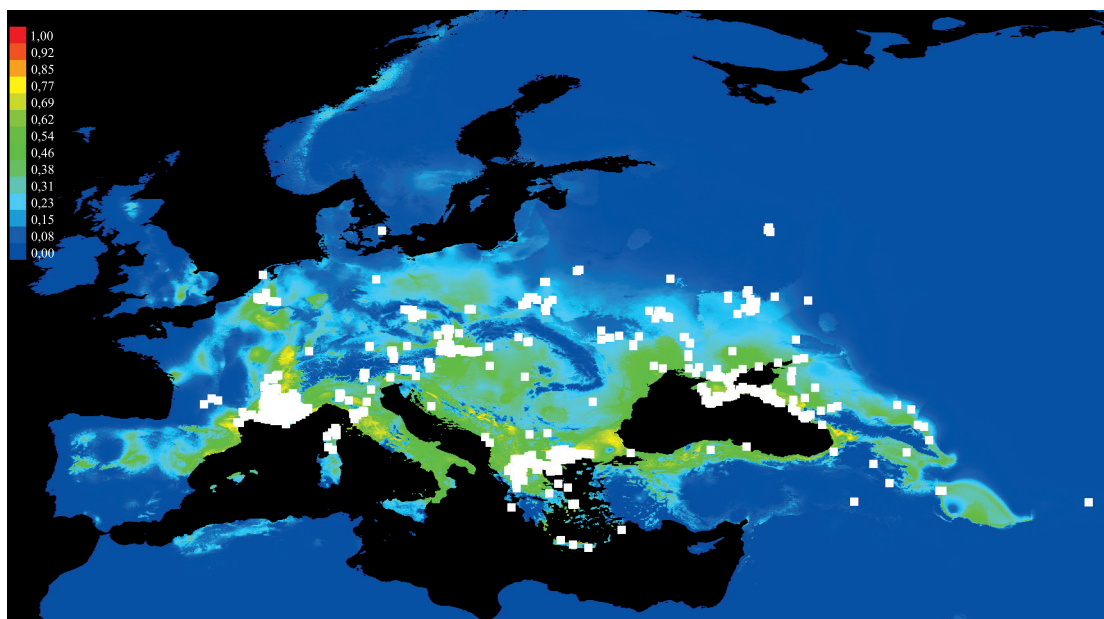


Рис. 3. Графический результат пространственного моделирования ареала *C. rhoeadifolia*, полученный в программе *MaxEnt*

Fig. 3. Graphical result of spatial modelling of the *C. rhoeadifolia* area obtained in the *MaxEnt* program

Вид *C. rhoeadifolia* в Беларуси является заносным и находится за пределами своего естественного ареала. Дальнейшее активное распространение *C. rhoeadifolia* не предвидится, но в связи с антропогенным воздействием и развитием транспортной системы нахождение вида в антропогенных местобитаниях очевидно. Широкого распространения *C. rhoeadifolia* в Беларуси получить не может из-за сдерживающего климатического фактора.

В результате сокращения естественных мест произрастания и расширения рудеральных местообитаний *C. rhoeadifolia* адаптировалась к новым условиям обитания. Природные условия антропогенно трансформированных экотопов оказались подходящими для расселения этого вида. *C. rhoeadifolia* в Беларуси заслуживает пристального внимания как редкий лугово-степной таксон.

Заключение

Нами подтверждено произрастание вида *C. rhoeadifolia* на территории Гомельской области, которое не отмечалось здесь уже более 120 лет. Скерда маколистная является евроазиатским субпонтическим видом, основные популяции которого сосредоточены в Средиземноморье, южной части Центральной и Восточной Европы. Ареал *C. rhoeadifolia* расширяется за счет продвижения вида на север в результате хозяйственной деятельности человека и потепления климата. Это подтверждается обнаружением новых местонахождений вида за пределами северной границы его первичного ареала. Распространение вида может быть самостоятельным и носить случайный характер. В Беларуси *C. rhoeadifolia* имеет случайный занос, произрастает вблизи северной границы своего вторичного ареала и является примером адаптации лугово-степного вида к антропогенным условиям. Климатические условия Беларуси не способствуют распространению *C. rhoeadifolia*, но в пределах преобразованных человеком участков вид может находить достаточно приемлемые параметры природной среды для своего выживания и дальнейшей жизнедеятельности.

Библиографические ссылки

1. Пачоский ИК. *Флора Полесья и прилегающих местностей (продолжение)*. Санкт-Петербург: Типография В. Демакова; 1899. 115 с.
2. Михайловская ВА. Род 652. Баркгаузия – *Barkhausia* Moench. В: Козловская НВ, Круганова ЕА, Михайловская ВА, Томин МП, Цеттерман НО, составители. *Флора БССР. Том 5*. Шишкин БК, Томин МП, редакторы. Минск: Издательство Академии наук Белорусской ССР; 1959. с. 194–196.
3. Михайловская ВА. *Флора Полесской низменности*. Шишкин БК, Лупинович ИС, Томин МП, редакторы. Минск: Издательство АН БССР; 1953. 454 с.
4. Козловская НВ. *Флора Белоруссии, закономерности ее формирования, научные основы использования и охраны*. Парфенов ВИ, редактор. Минск: Наука и техника; 1978. 128 с.
5. Парфенов ВИ. *Флора Белорусского Полесья (современное состояние и тенденции развития) = Flora of Byelorussian Polesje (the current status and trends of development)*. Минск: Наука и техника; 1983. 295 с.
6. Сауткина ТА, Третьяков ДИ, Зубкевич ГИ, Козловская НВ, Парфенов ВИ, Блажевич РЮ и др. *Определитель высших растений Беларуси*. Парфенов ВИ, редактор. Минск: Дизайн ПРО; 1999. 472 с.
7. Дубовик ДВ, Скуратович АН. О некоторых редких адвентивных видах растений во флоре Беларуси. В: Прищепа ИМ, Кузьменко ВЯ, Литвинкова ИА, Мерзвинский ЛМ, Бобрик МИ, Сушко ГГ и др., редакторы. *Экологическая культура и охрана окружающей среды: I Дорофеевские чтения. Материалы Международной научно-практической конференции; 21–22 ноября 2013 г.; Витебск, Беларусь*. Витебск: Витебский государственный университет имени П. М. Машерова; 2013. с. 130–132.
8. Лемеза НА, Джус МА. *Геоботаника. Учебная практика*. Минск: Вышэйшая школа; 2008. 255 с.
9. Nowak S. The role of rock mining for maintaining *Dauco carotae-Crepidetum rhoeadifoliae* Hejný et Grüll in Hejný et al. 1979 – a new to Poland plant association. *Central European Journal of Biology*. 2013;8(8):799–812. DOI: 10.2478/s11535-013-0185-2.
10. Ионица О, Тофан-Дорофеев Е. Конспект рода *Crepis* L. (Asteraceae) во флоре Республики Молдова. В: Никитина НН, Козловцева ОС, Глазунов ВА, Шереметова СА, Сабаяева НИ, редакторы. *Ботанические чтения – 2013. Материалы Международной научно-практической конференции; 13 мая 2013 г.; Ишим, Россия = Botanical readings – 2013. Proceedings of the International scientific and practical conference; 2013 May 13; Ishim, Russia*. Ишим: Ишимский государственный педагогический институт имени П. П. Ершова; 2013. с. 60–62.
11. Черепанов СК. *C. rhoeadifolia* Vieb. В: Гельтман ДВ, Заиконникова ТИ, Иконников СС, Конечная ГЮ, Леонова ТГ, Цвелев НН и др. *Флора европейской части СССР. Том 8*. Цвелев НН, редактор. Ленинград: Наука; 1989. с. 137.
12. Сухоруков АП, Кушунина МА. Новые данные по адвентивной фракции флоры Белгородской области. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки*. 2012;21:40–46.
13. Полуянов АВ, Скляр ЕА. Дополнения и уточнения к флоре Курской области по материалам 2014 года. *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*. 2015;120(3):63–64.
14. Трофименко ВГ, Соколова ЕИ. Промежуточные результаты изучения флоры г. Луганска. *Полевой журнал биолога*. 2019;1(2):69–78. DOI: 10.18413/2658-3453-2019-1-2-69-78.
15. Виноградова ЮК, Бочкин ВД, Майоров СР, Теплов КЮ, Баринов АВ. Историческая флора железнодорожного узла московского мегаполиса (в границах до 2012 года). *Hortus Botanicus*. 2017;12:88–136. DOI: 10.15393/j4.art.2017.3402.

16. Литвинская СА, Постарнак ЮА. Аннотированный список флоры Вербной косы по данным 2006–2008 года. В: Пого-
релов АВ, Беликов МЮ, Ефремов ЮВ, Литвинская СА, Нагалецкий ЮА, Чистяков ВИ, редакторы. *Географические исследо-
вания Краснодарского края. Выпуск 4*. Краснодар: Кубанский государственный университет; 2009. с. 170–182.
17. Попович АВ. Редкие виды сосудистых растений, энтомо- и герпетофауны урочища Мысхако. В: Шагаров ЛМ, редактор.
*Устойчивое развитие особо охраняемых природных территорий. Том 5. Сборник статей V Всероссийской научно-практиче-
ской конференции; 10–12 октября 2018 г.; Сочи, Россия*. Сочи: Природный орнитологический парк в Имеретинской низмен-
ности; 2018. с. 243–266.
18. Bartha D, Bán M, Schmidt D, Tiborcz V. *Vascular plants of Hungary online database* [Internet]. University of Sopron, 2021
[cited 2021 September 4]. Available from: <http://floraatlasz.uni-sopron.hu>.
19. Черепанов СК. *C. rhoeadifolia* M. B. В: Борисова АГ, Васильев ВН, Васильченко ИТ, Кирпичников МЭ, Леонова ТГ,
Липшиц СЮ и др., составители. *Флора СССР. Том 29*. Бобров ЕГ, Цвелев НН, редакторы. Москва: Ботанический институт
Академии наук СССР; 1964. с. 690–692.
20. Гейдеман ТС. *Определитель высших растений Молдавской ССР*. Черепанов СК, редактор. 3-е издание. Кишинев:
Штиинца; 1986. 638 с.
21. Meusel H, Jäger EJ, Weinert E. *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Band 3. Teil 1*. Jena: Gustav Fischer
Verlag; 1992. IX, 333 S.
22. Hegi G. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa. Mit besonderer Berücksichtigung von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz.
Zum Gebrauche in den Schulen und zum Selbstunterricht. Band 6. Hälfte 2*. München: J. F. Lehmanns Verlag; 1906. 1386 S.
23. Багрикова НА. Изучение синантропной растительности Крымского полуострова с позиций эколого-флористического
подхода: состояние вопроса, классификация сообществ и перспективы исследований. *Сборник научных трудов Государствен-
ного Никитского ботанического сада*. 2016;142:25–58.

References

1. Pachosky IK. *Flora Poles'ya i prilozhashchikh mestnostei (prodlzhenie)* [Flora of Polesje and adjacent areas (continued)].
Saint Petersburg: Tipografiya V. Demakova; 1899. 115 p. Russian.
2. Mikhailovskaya VA. Genus 652. *Barkhausia* – *Barkhausia* Moench. In: Kozlovskaya NV, Kruganova EA, Mikhailovskaya VA,
Tomin MP, Tsetserman NO, compilers. *Flora BSSR. Tom 5* [Flora of the BSSR. Volume 5]. Shishkin BK, Tomin MP, editors. Minsk:
Publishing House of the Academy of Sciences of the BSSR; 1959. p. 194–196. Russian.
3. Mikhailovskaya VA. *Flora Polesskoi nizmennosti* [Flora of the Polesskaya lowland]. Shishkin BK, Lupinovich IS, Tomin MP,
editors. Minsk: Publishing House of the Academy of Sciences of the BSSR; 1953. 454 p. Russian.
4. Kozlovskaya NV. *Flora Belorussii, zakonomernosti ee formirovaniya, nauchnye osnovy ispol'zovaniya i okhrany* [Flora of
Belarus, regularities of its formation, scientific bases of use and protection]. Parfenov VI, editor. Minsk: Nauka i tekhnika; 1978. 128 p.
Russian.
5. Parfenov VI. *Flora of Byelorussian Polesje (the current status and trends of development)*. Minsk: Nauka i tekhnika; 1983.
295 p. Russian.
6. Sautkina TA, Tret'yakov DI, Zubkevich GI, Kozlovskaya NV, Parfenov VI, Blazhevich RYu, et al. *Opredelitel' vysshikh rastenii
Belarusi* [The determinant of the higher plants of Belarus]. Parfenov VI, editor. Minsk: Dizain PRO; 1999. 472 p. Russian.
7. Dubovik DV, Skuratovich AN. [About some rare adventitious plant species in the flora of Belarus]. In: Prishchepa IM,
Kuz'menko VYa, Litvenkova IA, Merzhvinskii LM, Bobrik MI, Sushko GG, et al., editors. *Ekologicheskaya kul'tura i okhrana okru-
zhayushchei sredy: I Dorofeevskie chteniya. Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 21–22 noyabrya 2013 g.;
Vitebsk, Belarus* [Ecological culture and environmental protection: 1st Dorofeyev readings. Materials of the International scientific and
practical conference; 2013 November 21–22; Vitebsk, Belarus]. Vitebsk: Vitebsk State University named after P. M. Masherov; 2013.
p. 130–132. Russian.
8. Lemeza NA, Dzhus MA. *Geobotanika. Uchebnaya praktika* [Geobotany. Educational practice]. Minsk: Vyshnejshaja shkola;
2008. 255 p. Russian.
9. Nowak S. The role of rock mining for maintaining *Dauco carotae-Crepidetum rhoeadifoliae* Hejný et Grüll in Hejný et al.
1979 – a new to Poland plant association. *Central European Journal of Biology*. 2013;8(8):799–812. DOI: 10.2478/s11535-013-0185-2.
10. Ionitsa O, Tofan-Dorofeev E. [Abstract of the genus *Crepis* L. (Asteraceae) in the flora of the Republic of Moldova]. In: Nikiti-
na NN, Kozlovskaya OS, Glazunov VA, Sheremetova SA, Sabaeva NI, editors. *Botanical readings – 2013. Proceedings of the Inter-
national scientific and practical conference; 2013 May 13; Ishim, Russia*. Ishim: P. P. Ershov Ishim State Teacher's Training Institute;
2013. p. 60–62. Russian.
11. Cherepanov SK. [*C. rhoeadifolia* Bieb.]. In: Gel'tman DV, Zaikonnikova TI, Ikonnikov SS, Konechnaya GYu, Leonova TG,
Tsvelev NN, et al. *Flora evropeiskoi chasti SSSR. Tom 8* [Flora of the European part of the USSR. Volume 8]. Tsvelev NN, editor.
Leningrad: Nauka; 1989. p. 137. Russian.
12. Sukhorukov AP, Kushunina MA. New data on the alien flora of the Belgorod region. *Belgorod State University Scientific Bul-
letin. Series: Natural Sciences*. 2012;21:40–46. Russian.
13. Poluyanov AV, Sklyar EA. Additions and corrections to the flora of Kursk province based on records of 2014. *Bulletin of Mos-
cow Society of Naturalists. Biological Series*. 2015;120(3):63–64. Russian.
14. Trofimenko VG, Sokolova EI. Intermediate results of study of the flora of Lugansk city. *Field Biologist Journal*. 2019;1(2):69–78.
Russian. DOI: 10.18413/2658-3453-2019-1-2-69-78.
15. Vinogradova YuK, Bochkina VD, Mayorov SR, Teplov KYu, Barinov AV. Historical flora of Moscow's railway junction (until 2012).
Hortus Botanicus. 2017;12:88–136. Russian. DOI: 10.15393/j4.art.2017.3402.
16. Litvinskaya SA, Postarnak YuA. [Annotated list of Verbian spit flora according to 2006–2008 data]. In: Pogorelov AV, Beli-
kov MYu, Efremov YuV, Litvinskaya SA, Nagalevskii YuYa, Chistyakov VI, editors. *Geograficheskie issledovaniya Krasnodarskogo
kraya. Vypusk 4* [Geographical research of the Krasnodar territory. Issue 4]. Krasnodar: Kuban State University; 2009. p. 170–182.
Russian.

17. Popovich AV. [Rare species of vascular plants, entomo- and herpetofauna of the Myshako]. In: Shagarov LM, editor. *Ustoi-chivoe razvitie osobo okhranyaemykh prirodnnykh territorii. Tom 5. Sbornik statei V Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 10–12 oktyabrya 2018 g.; Sochi, Rossiya* [Sustainable development of specially protected natural territories. Volume 5. Collection of articles of the 5th All-Russian scientific and practical conference; 2018 October 10–12; Sochi, Russia]. Sochi: Prirodnyi ornitologicheskii park v Imeretinskoi nizmennosti; 2018. p. 243–266. Russian.
18. Bartha D, Bán M, Schmidt D, Tiborcz V. *Vascular plants of Hungary online database* [Internet]. University of Sopron, 2021 [cited 2021 September 4]. Available from: <http://floraatlasz.uni-sopron.hu>.
19. Cherepanov SK. [*C. rhoeadifolia* M. B.]. In: Borisova AG, Vasil'ev VN, Vasil'chenko IT, Kirpichnikov ME, Leonova TG, Lipshits SYu, et al., compilers. *Flora SSSR. Tom 29* [Flora of the USSR. Volume 29]. Bobrov EG, Tsvelev NN, editors. Moscow: Botanical Institute of the Academy of Sciences of the USSR; 1964. p. 690–692. Russian.
20. Geideman TS. *Opredelitel' vysshikh rastenii Moldavskoi SSR* [Determinant of higher plants of the Moldavian SSR]. Cherepanov SK, editor. 3rd edition. Kishinev: Shtiintsa; 1986. 638 p. Russian.
21. Meusel H, Jäger EJ, Weinert E. *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Band 3. Teil 1*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1992. IX, 333 S.
22. Hegi G. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa. Mit besonderer Berücksichtigung von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz. Zum Gebrauche in den Schulen und zum Selbstunterricht. Band 6. Hälfte 2*. München: J. F. Lehmanns Verlag; 1906. 1386 S.
23. Bagrikova NA. Study of synanthropic vegetation of the Crimean peninsula according to ecological-floristic approach: state of matter, communities classification and perspective of the researches. *Works of Nikitsky Botanical Garden*. 2016;142:25–58. Russian.

Получена 16.09.2021 / исправлена 21.01.2022 / принята 21.01.2022.
Received 16.09.2021 / revised 21.01.2022 / accepted 21.01.2022.

УДК 343.983.7:575.174.015.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОГО ДНК-АНАЛИЗА

А. С. ПАРФЁНОВА¹⁾, С. А. ПОЛЕВОЙ¹⁾, Е. А. СПИВАК¹⁾,
А. Е. ГРЕБЕНЧУК¹⁾, А. Н. ХОХ¹⁾, С. А. КОТОВА¹⁾

¹⁾Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь,
ул. Филимонова, 25, 220114, г. Минск, Беларусь

Микросателлиты, как высокополиморфные маркеры, являются ценным инструментом в идентификационных и популяционных исследованиях. В целях формирования подходов к судебно-экспертной ДНК-идентификации при расследовании дел о незаконных рубках протестированы 17 SSR-маркеров сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с использованием ДНК растений, произрастающих в западной и восточной частях Республики Беларусь. Показана высокая информативность для шести микросателлитных маркеров. Установлена потенциальная возможность применения комплекса отобранных маркеров для ДНК-идентификации образцов древесины сосны обыкновенной в судебной экспертизе.

Ключевые слова: сосна обыкновенная; незаконные рубки; SSR-маркеры; ДНК-идентификация.

RESEARCH OF POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE MARKERS OF SCOTS PINE FOR THE PURPOSES OF FORENSIC DNA ANALYSIS

N. S. PARFIONAVA^a, S. A. PALIAVOI^a, A. A. SPIVAK^a,
A. E. HREBIANCHUK^a, A. N. HOH^a, S. A. KOTAVA^a

^aScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee
of the Republic of Belarus, 25 Filimonava Street, Minsk 220114, Belarus

Corresponding author: N. S. Parfionava (anastaciaparfionova@gmail.com)

Microsatellites as highly polymorphic markers are a valuable tool in identification and population studies. In order to form approaches to forensic DNA identification in the investigation of illegal logging cases, 17 SSR markers of Scots pine

Образец цитирования:

Парфёнова АС, Полевой СА, Спивак ЕА, Гребенчук АЕ, Хох АН, Котова СА. Исследование полиморфизма микросателлитных маркеров сосны обыкновенной для целей криминалистического ДНК-анализа. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:90–98.

For citation:

Parfionava NS, Paliavoi SA, Spivak AA, Hrebianchuk AE, Hoh AN, Kotava SA. Research of polymorphism of microsatellite markers of Scots pine for the purposes of forensic DNA analysis. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:90–98. Russian.

(*Pinus sylvestris* L.) were tested using DNA from plants growing in the western and eastern parts of the Republic of Belarus. High information content was shown for six microsatellite markers. The potential possibility of using a complex of selected markers for the purpose of DNA identification of Scots pine wood samples in forensic examination has been established.

Keywords: Scots pine; illegal logging; SSR markers; DNA identification.

Введение

Лесная отрасль в Республике Беларусь находится под постоянным контролем государства, вместе с тем нередко случаи нарушения законодательства в сфере охраны окружающей среды, такие как незаконные рубки, незаконное уничтожение, изъятие или повреждение лесных насаждений, а также нарушения таможенного законодательства, главным образом связанные с недекларированием либо недостоверным декларированием лесо- и пиломатериалов, пилопродукции. Преимущественно объектом незаконных действий становится сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) как наиболее распространенный и хозяйственно ценный вид древесных растений Республики Беларусь. До настоящего времени экспертное сопровождение дел в сфере рационального природопользования, нелегального оборота древесины и лесопродукции хвойных пород базировалось главным образом на методах макродиагностики (дендрохронология) и микродиагностики (морфология строения). С развитием молекулярной генетики данная методология может быть успешно дополнена анализом полиморфизма ДНК, поскольку хвойные породы содержат в своем геноме до 75 % повторяющихся элементов [2]. Удобным инструментом при этом являются микросателлитные маркеры, к которым относятся короткие последовательные повторы (*simple sequence repeats*, SSR).

Анализ работ отечественных и зарубежных авторов в области изучения генетического разнообразия сосны обыкновенной позволяет сделать вывод, что наиболее перспективными для ДНК-идентификации являются следующие SSR-маркеры ядерной ДНК: Psyl17, Psyl42, Psyl19, PtTX4011, PtTX4001, Psyl44, Psyl18, Psyl16, Psyl36, Psyl25, Psyl2, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psyl57, LOP1, LOP3, PtTX3025. Исследование естественных популяций сосны в Российской Федерации (60 и 240 образцов), Литовской Республике (400 образцов), Республике Польша (384 образца), Чешской Республике (180 образцов), а также растений, отобранных на искусственной лесосеменной плантации в Республике Беларусь, показало, что вышеперечисленные маркеры являются полиморфными и имеют от 2 аллельных вариантов (Psyl25) до 21 аллельного варианта (PtTX4001) [3–9]. В Российской Федерации маркеры Psyl19, PtTX4011, PtTX4001, Spac11.4 успешно апробированы в генетической экспертизе незаконного оборота древесины сосны обыкновенной [10].

Цель данной работы – тестирование 17 микросателлитных локусов ядерной ДНК (Psyl17, Psyl42, Psyl19, PtTX4011, PtTX4001, Psyl44, Psyl18, Psyl16, Psyl36, Psyl25, Psyl2, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psyl57, LOP1, LOP3, PtTX3025) в качестве маркеров для изучения генетического разнообразия популяций сосны на территории Республики Беларусь и оценка их информативности при использовании в судебно-экспертной практике для ДНК-идентификации образцов древесины по делам о незаконных рубках, незаконном уничтожении, изъятии или повреждении лесных насаждений.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись растения сосны обыкновенной из двух естественных субпопуляций, произрастающие в западной (Гродненская область (46 образцов)) и восточной (Могилёвская область (42 образца)) частях Республики Беларусь. Материалом для исследования послужила ДНК сосны, полученная путем экстракции из радиальных кернов диаметром 4–5 мм, содержащих древесину от коры до сердцевины дерева. Выделение ДНК из древесины осуществляли модифицированным методом Танга¹. Для целевой амплификации SSR-маркеров были сформированы четыре мультилокусные тест-системы, включающие флуоресцентные праймеры со структурой, аналогичной структуре, описанной в литературных источниках [11–15]. Продукты амплификации ДНК с праймерами тест-системы анализировали методом капиллярного гель-электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser (*Thermo Fisher Scientific*, США), используя программное обеспечение *GeneMapper ID-X Software 1.4*. Доказательством аллельной принадлежности пиков в ПЦР-спектрах послужили воспроизводимые результаты амплификации (не менее трех повторов), ПЦР-продукты которых соответствовали аллельным диапазонам микросателлитных локусов, указанным в литературных источниках.

Основные показатели генетической изменчивости и криминалистические параметры рассчитывали с помощью программных средств *GenAlEx 6.5*, *Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT) 1.0*,

¹DNA extraction for sunflower PCR and RFLP analysis (small quantity) [Electronic resource]. URL: <http://www.zoology.ubc.ca/~riesenberg/RiesenbergResources/wp-content/uploads/2011/10/Knap-Burke-Lab-CTAB-DNA-Extraction-Protocol.pdf> (date of access: 20.12.2020).

Cervus 3.0.7 и *GenePop 4.7.0* [16–19]. Оценку частоты нуль-аллелей осуществляли посредством программных продуктов *Micro-Checker 2.2.3* [20], *Cervus 3.0.7*, *GenePop 4.7.0*. Проверку на сцепленность наследования маркеров проводили с использованием программ *GenePop 4.7.0* и *Arlequin 3.5.1.3* [21]. Анализ популяционной структуры выполняли с помощью программных средств *Structure 2.3.4* и *Structure Harvester*² [22].

Результаты и их обсуждение

Генотипированием 88 образцов ДНК белорусской популяции сосны обыкновенной установлено, что все 17 микросателлитных маркеров являются полиморфными. Наименьший уровень полиморфизма обнаружен у маркера Psyl25 (2 аллели), а наибольшее количество аллельных вариантов зарегистрировано для маркеров Spac11.4 (17), Psyl16 (14) и LOP1 (13). Показатели генетического разнообразия популяции сосны обыкновенной представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели генетического разнообразия популяции
сосны обыкновенной по 17 микросателлитным маркерам

Table 1

Indicators of genetic diversity of the Scots pine
population by 17 microsatellite markers

Маркер	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>DF</i>	χ^2	<i>F</i>
Spac11.4	17	6,772	0,875	0,852	136	182,732	–0,027
SsrPt-ctg4363	10	3,209	0,648	0,688	45	42,570	0,059
LOP1	13	3,182	0,614	0,686	78	76,053	0,105
Psyl57	7	2,221	0,511	0,550	21	47,959	0,070
LOP3	5	1,221	0,193	0,181	10	1,006	–0,069
PtTX3025	9	3,060	0,455	0,673	36	197,572*	0,325
Psyl17	10	4,326	0,716	0,769	45	53,279	0,069
Psyl42	4	3,218	0,670	0,689	6	4,237	0,027
Psyl19	4	1,149	0,136	0,130	6	0,471	–0,051
PtTX4001	11	4,835	0,739	0,793	55	61,014	0,069
PtTX4011	7	2,518	0,466	0,603	21	51,105*	0,227
Psyl44	3	1,047	0,023	0,045	3	38,441*	0,491
Psyl18	4	1,084	0,057	0,077	6	38,494*	0,265
Psyl16	14	5,934	0,761	0,831	91	234,337*	0,084
Psyl36	3	1,299	0,216	0,230	3	0,825	0,061
Psyl25	2	1,011	0,011	0,011	1	0,003	–0,006
Psyl2	3	1,282	0,227	0,220	3	0,214	–0,033

Примечание. *Na* – число аллелей на локус; *Ne* – эффективное число аллелей на локус; *Ho* и *He* – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно; *DF* – число степеней свободы; *F* – индекс фиксации Райта; * – $p < 0,05$ (с поправкой Бонферрони).

Для локусов Psyl17, PtTX4001, PtTX4011, Psyl44, Psyl18, Psyl16, Psyl2, Spac11.4, SsrPt-ctg4363, Psyl57, LOP1, LOP3, PtTX3025, имеющих, согласно литературным данным, ди- и тринуклеотидные tandemные повторы, установлено наличие микровариантов, отличающихся от основной аллели на один нуклеотид.

Анализ полиморфизма и частот встречаемости аллелей тестируемых локусов показал унимодальный характер распределения аллелей для маркеров Psyl19, PtTX4011, Psyl44, Psyl18, Psyl36, Psyl2, Psyl25, Psyl57, LOP3, для которых выявлены мажорные аллельные варианты с частотами встречаемости от 0,591 (PtTX4011) до 0,994 (Psyl25) (см. рисунок). Схожий характер распределения аллельных вариантов для маркеров PtTX4001, PtTX4011, Psyl44, Psyl42, Psyl18, Psyl16, Psyl2, Spac11.4, Psyl57 был показан в работе [5], посвященной анализу генетического разнообразия литовской популяции сосны обыкновенной.

²Structure Harvester [Electronic resource]. URL: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/> (date of access: 20.12.2020).

С учетом низкого полиморфизма и крайне низкого эффективного числа аллелей на локус ДНК-маркеры LOP3, Psyl19, Psyl36, Psyl44, Psyl18, Psyl25, Psyl2 были исключены из дальнейшего исследования как малоинформативные для криминалистического ДНК-анализа.

Расчет значения критерия χ^2 выявил достоверное (с учетом поправки Бонферрони) несоответствие распределению Харди – Вайнберга для трех SSR-маркеров (PtTX3025, PtTX4011 и Psyl16) в совокупной выборке сосны обыкновенной. Анализ генотипов с использованием программных средств *Micro-Checker 2.2.3*, *Cervus 3.0.7* и *GenePop 4.7.0* позволил сделать вывод, что избыток гомозигот для микросателлитных маркеров PtTX4011 и PtTX3025 может быть связан с присутствием нуль-аллелей с суммарными частотами 0,1153 и 0,1931 соответственно. На предположительное наличие нуль-аллелей для маркера PtTX4011 указывалось ранее при исследовании генетического разнообразия сосны обыкновенной, произрастающей в польской и чешской популяциях, а для маркера PtTX3025 – в польской популяции [7; 8]. По причине высокого уровня нуль-аллелей (более 10 %) в белорусской популяции сосны обыкновенной ДНК-маркеры PtTX4011 и PtTX3025 также были исключены из дальнейшего исследования.

Попарный анализ восьми оставшихся рассматриваемых локусов с использованием программных средств *GenePop 4.7.0* и *Arlequin 3.5.1.3* указал на возможное сцепленное наследование аллелей локусов SsrPt-ctg4363 и LOP1, Psyl17 и Psyl16, Psyl42 и Psyl16. Поскольку для выяснения статистической корректности расчета генетической сцепленности маркеров необходимо более расширенное исследование, маркеры Psyl16 и LOP1 также были исключены из дальнейшего анализа.

По итогу рассмотрения основных показателей генетической изменчивости, оценки частоты нуль-аллелей и сцепленности маркеров для криминалистического ДНК-анализа сосны обыкновенной были отобраны шесть микросателлитных маркеров ядерной ДНК: Psyl17, Psyl42, PtTX4001, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psyl57.

При оценке криминалистических параметров исследуемых маркеров значения совокупного исключаящего (CPE) и совокупного дискриминирующего (CPD) потенциалов составили 0,977230 и 0,9999982 соответственно. При этом наиболее информативными для генетической идентификации были маркеры Psyl17, PtTX4001, Spac11.4, значения информационного содержания полиморфизма которых превышали 0,7 (табл. 2). Вероятность случайного совпадения генотипов, рассчитанная по выявленным частотам аллелей, составила $1,781617 \cdot 10^{-6}$.

Таблица 2

Криминалистические параметры шести наиболее перспективных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной

Table 2

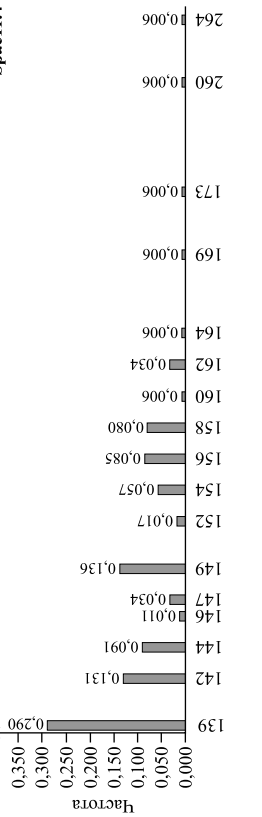
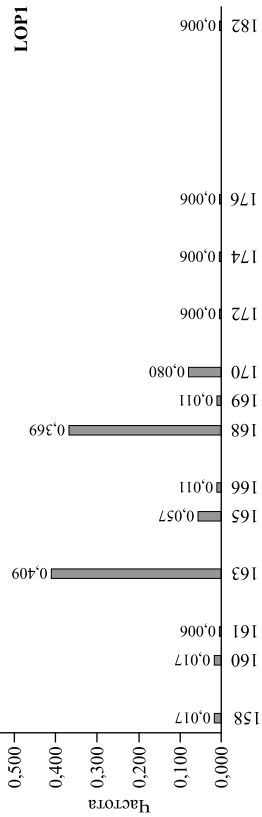
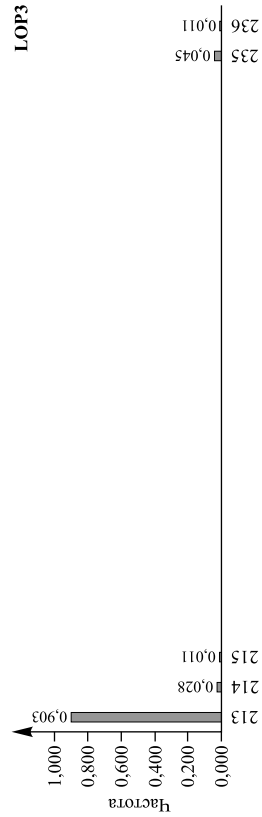
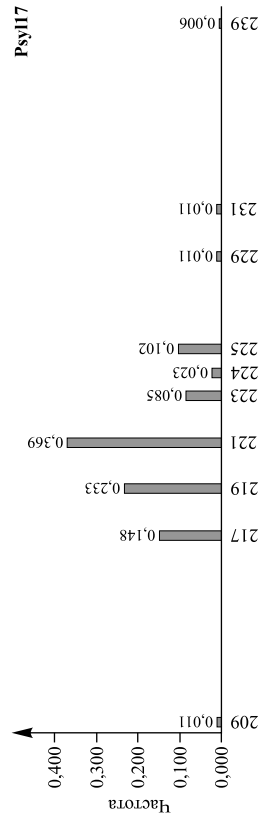
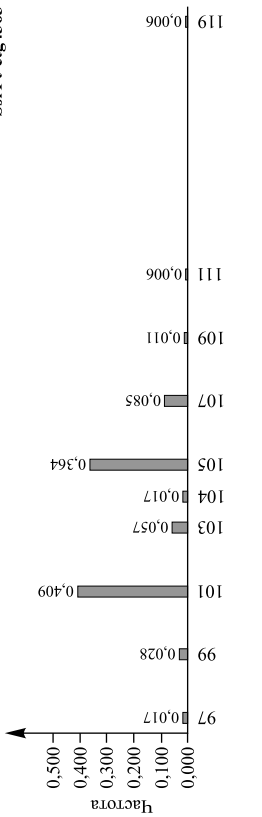
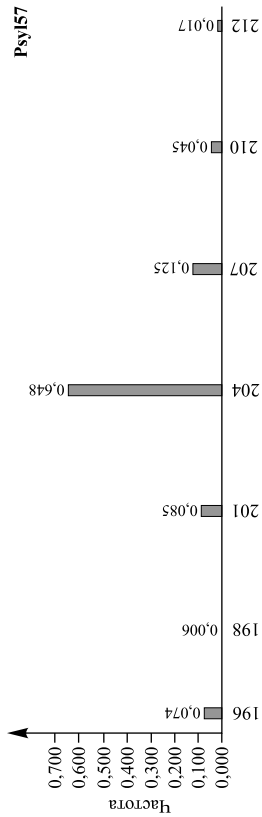
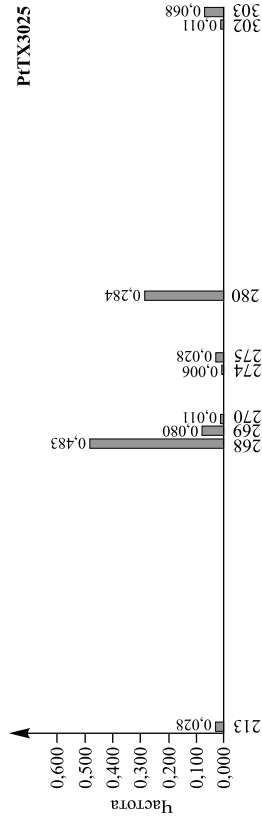
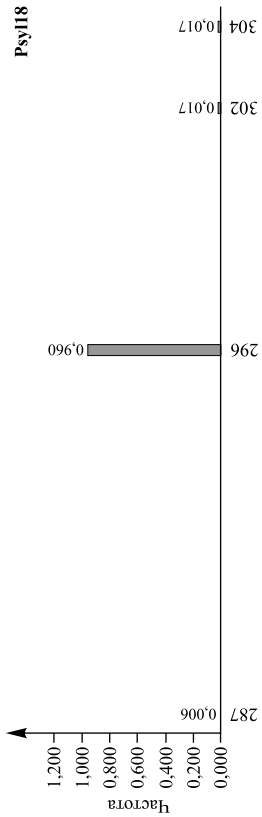
Criminalistic parameters of the six most promising Scots pine microsatellites markers

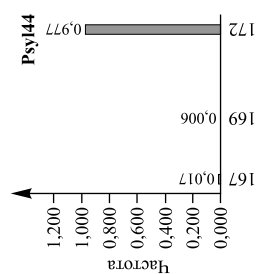
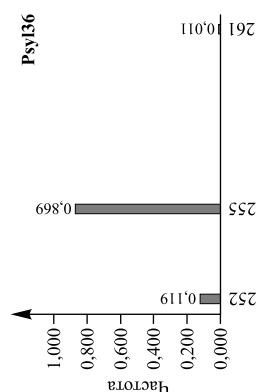
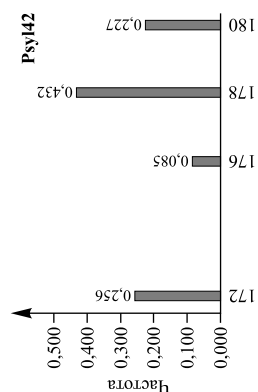
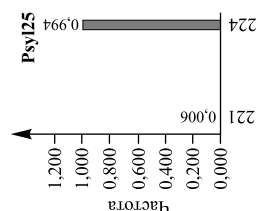
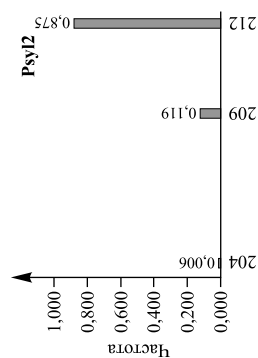
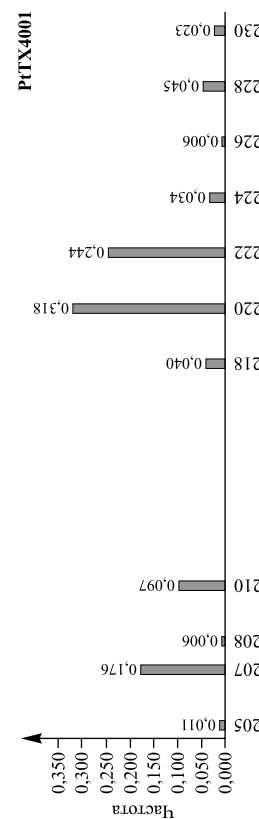
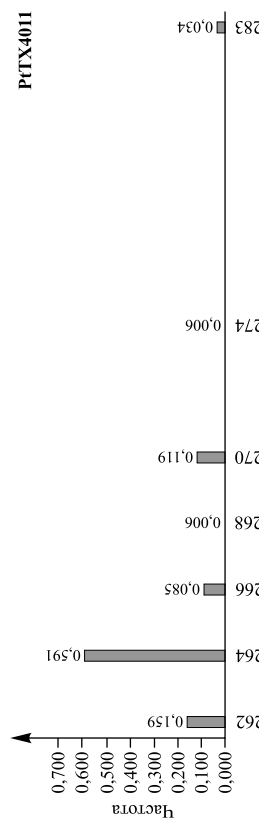
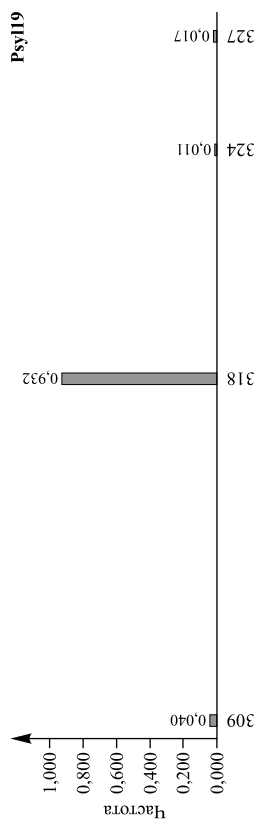
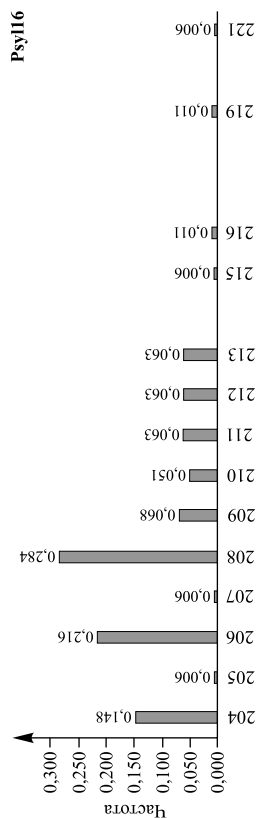
Маркер	PIC	PE	PD
Psyl17	0,7376	0,4533	0,9093
Psyl42	0,6344	0,3841	0,8468
PtTX4001	0,7653	0,4905	0,9228
SsrPt-ctg4363	0,6368	0,3521	0,8520
Spac11.4	0,8384	0,7447	0,9527
Psyl57	0,5233	0,1976	0,7624

Примечание. PIC – информационное содержание полиморфизма; PE – исключаяющий потенциал; PD – дискриминирующий потенциал.

Исследование уровня генетической подразделенности популяций сосны обыкновенной методом молекулярной дисперсии (AMOVA) на основе генотипов в формате шести локусов показало, что большая часть общей генетической вариативности обусловлена изменчивостью внутри популяции, достигающей 99,0 %, межпопуляционная изменчивость при этом составляет 1,0 % (при $p < 0,05$).

В целях оценки применимости тестируемых маркеров для установления в экспертной практике места произрастания отдельных растений проведен кластерный анализ белорусской популяции сосны с использованием программного средства *Structure 2.3.4* и последующей обработкой результатов в программе *Structure Harvester*. Установлено, что исследованные выборки сосны образуют единый кластер. Скорее всего, это является следствием недостаточности полиморфизма генотипов из шести локусов для выявления генетической вариативности регионального характера.





Распределение частот встречаемости аллелей
17 микросателлитных маркеров сосны обыкновенной
Allele frequency distribution by 17 microsatellite markers

Заключение

В результате анализа генетического разнообразия сосны обыкновенной, произрастающей на территории Республики Беларусь, показана принципиальная возможность использования системы из шести микросателлитных маркеров (Psl17, Psl42, PtTX4001, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psl157) для ДНК-идентификации растений в судебно-экспертной практике при сопровождении дел о незаконных рубках, незаконном уничтожении, изъятии или повреждении лесных насаждений. Отобранные в ходе исследования маркеры являются высокоинформативными для криминалистического ДНК-анализа сосны обыкновенной и имеют значения информационного содержания полиморфизма выше 0,52. Для большинства из указанных ДНК-маркеров в белорусской популяции сосны зарегистрированы микроварианты, которые могут рассматриваться как потенциальный источник повышения дискриминирующей силы SSR-маркеров. Использование комплекса из шести микросателлитных локусов ядерной ДНК позволяет достигнуть значения совокупного дискриминирующего потенциала 0,999 998 2. В то же время рассчитанная вероятность случайного совпадения $1,781\,617 \cdot 10^{-6}$, соответствующая вероятности случайного совпадения генотипов для 1 из 561 288 растений, является недостаточной для однозначной идентификации растений, учитывая общий размер популяции сосны обыкновенной в Республике Беларусь. В связи с этим вопрос о формировании системы маркеров, информативных для экспертного сопровождения дел в сфере рационального природопользования, нелегального оборота древесины и лесопроизводства хвойных пород, остается открытым и требует дальнейшей работы по поиску перспективных SSR-маркеров в дополнение к комплексу из отобранных шести локусов (Psl17, Psl42, PtTX4001, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psl157).

Библиографические ссылки

1. Nowakowska JA. Application of DNA markers against illegal logging as a new tool for the Forest Guard Service. *Folia Forestalia Polonica. Series A: Forestry*. 2011;53(2):142–149. DOI: 10.5281/zenodo.30813.
2. Eriksson G, Ekberg I. *An introduction to forest genetics*. Uppsala: SLU; 2001. 166 p.
3. Гладков ЮФ, Шейкина ОВ. Генетический полиморфизм деревьев сосны обыкновенной из смежных болотной и суходольной ценопопуляций по ядерным микросателлитным локусам. *Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование*. 2019;4:70–79. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70.
4. Торбик ДН, Бедрицкая ТВ, Власова ММ, Синельников ИГ. Генетическое разнообразие естественных популяций *Pinus sylvestris*. В: Демидова НА, редактор. *Наука – лесному хозяйству Севера*. Архангельск: [б. и.]; 2019. с. 91–99.
5. Danusevičius D, Kavaliauskas D, Fussi B. Optimum sample size for SSR-based estimation of representative allele frequencies and genetic diversity in Scots pine populations. *Baltic Forestry*. 2016;22(2):194–202.
6. Hebda A, Wójkiewicz B, Wachowiak W. Genetic characteristics of Scots pine in Poland and reference populations based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Silva Fennica*. 2017;51(2):1721. DOI: 10.14214/sf.1721.
7. Nowakowska JA, Zachara T, Konecka A. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. *Leśne Prace Badawcze*. 2014;75(1):47–54. DOI: 10.2478/frp-2014-0005.
8. Máchová P, Cvrčková H, Poláková L, Trčková O. Genetická variabilita vybraných populací Borovice Lesní v České Republice. *Zprávy Lesnického Výzkumu*. 2016;61(3):223–229.
9. Падутов АВ. Изучение генетической структуры полусибирского потомства клонов сосны обыкновенной на лесосеменных плантациях II порядка (краткое сообщение). В: Кильчевский АВ, Хотылёва ЛВ, Вильчук КУ, Гриб СИ, Давыденко ОГ, Евтушенков АН и др., редакторы. *Молекулярная и прикладная генетика. Том 25*. Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; 2018. с. 92–98.
10. Шилкина ЕА, Ибе АА, Шеллер МА, Сухих ТВ. Использование методов ДНК-анализа в экспертизе незаконного оборота древесины. *Сибирский лесной журнал*. 2019;3:64–70. DOI: 10.15372/SJFS20190308.
11. Sebastiani F, Pinzauti F, Kujala ST, González-Martínez SC, Vendramin GG. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):231–234. DOI: 10.1007/s12686-011-9513-5.
12. Auckland LD, Bui T, Zhou Y, Shepherd M, Williams CG. *Conifer microsatellite handbook*. Raleigh: Corporate Press; 2002. 57 p.
13. Soranzo N, Provan J, Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*. 1998;7(9):1260–1261.
14. Chagné D, Chaumeil P, Ramboer A, Collada C, Guevara A, Cervera MT, et al. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(6):1204–1214. DOI: 10.1007/s00122-004-1683-z.
15. Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, Ritland K. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(2):361–369. DOI: 10.1007/s00122-004-1635-7.
16. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
17. Ristow PG, D’Amato ME. Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT): a streamlined workflow for forensic statistics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e52–e54. DOI: 10.1016/j.fsigs.2017.09.006.
18. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
19. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.

20. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
21. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 2005;1:47–50. DOI: 10.1177/117693430500100003.
22. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.

References

1. Nowakowska JA. Application of DNA markers against illegal logging as a new tool for the Forest Guard Service. *Folia Forestalia Polonica. Series A: Forestry*. 2011;53(2):142–149. DOI: 10.5281/zenodo.30813.
2. Eriksson G, Ekberg I. *An introduction to forest genetics*. Uppsala: SLU; 2001. 166 p.
3. Gladkov YuF, Sheikina OV. Genetic polymorphism of the *Pinus sylvestris* trees from bog land and upland cenopopulations on nuclear SSR loci. *Vestnik of Volga State University of Technology. Series: Forest. Ecology. Nature Management*. 2019;4:70–79. Russian. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70.
4. Torbik DN, Bedrickaya TV, Vlasova MM, Sinelnikov IG. Genetic diversity of natural populations of *Pinus sylvestris*. In: Demidova NA, editor. *Nauka – lesnomu khozyaystvu Severa* [Science – forestry of the North]. Arkhangelsk: [s. n.]; 2019. p. 91–99. Russian.
5. Danusevičius D, Kavaliauskas D, Fussi B. Optimum sample size for SSR-based estimation of representative allele frequencies and genetic diversity in Scots pine populations. *Baltic Forestry*. 2016;22(2):194–202.
6. Hebda A, Wójcikiewicz B, Wachowiak W. Genetic characteristics of Scots pine in Poland and reference populations based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Silva Fennica*. 2017;51(2):1721. DOI: 10.14214/sf.1721.
7. Nowakowska JA, Zachara T, Konecka A. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. *Leśne Prace Badawcze*. 2014;75(1):47–54. DOI: 10.2478/frp-2014-0005.
8. Máchová P, Cvrčková H, Poláková L, Trčková O. Genetická variabilita vybraných populací Borovice Lesní v České Republice. *Zprávy Lesnického Výzkumu*. 2016;61(3):223–229.
9. Padutov AV. Study of the genetic half-sib progeny structure of Scots pine clones on forest-seed order II orchards (short report). In: Kil'chevskii AV, Khotyleva LV, Vil'chuk KU, Grib SI, Davydenko OG, Evtushenkov AN, et al., editors. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika. Tom 25* [Molecular and applied genetics. Volume 25]. Minsk: Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus; 2018. p. 92–98. Russian.
10. Shilkina EA, Ibe AA, Sheller MA, Sukhikh TV. Using methods of DNA-analysis in the examination of the illegal timber trade. *Sibirskii lesnoi zhurnal*. 2019;3:64–70. Russian. DOI: 10.15372/SJFS20190308.
11. Sebastiani F, Pinzauti F, Kujala ST, González-Martínez SC, Vendramin GG. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):231–234. DOI: 10.1007/s12686-011-9513-5.
12. Auckland LD, Bui T, Zhou Y, Shepherd M, Williams CG. *Conifer microsatellite handbook*. Raleigh: Corporate Press; 2002. 57 p.
13. Soranzo N, Provan J, Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*. 1998;7(9):1260–1261.
14. Chagné D, Chaumeil P, Ramboer A, Collada C, Guevara A, Cervera MT, et al. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(6):1204–1214. DOI: 10.1007/s00122-004-1683-z.
15. Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, Ritland K. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(2):361–369. DOI: 10.1007/s00122-004-1635-7.
16. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
17. Ristow PG, D'Amato ME. Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT): a streamlined workflow for forensic statistics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e52–e54. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.006.
18. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
19. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
20. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
21. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 2005;1:47–50. DOI: 10.1177/117693430500100003.
22. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.

Получена 20.09.2021 / исправлена 20.01.2022 / принята 03.02.2022.
Received 20.09.2021 / revised 20.01.2022 / accepted 03.02.2022.

Авторы:

Анастасия Сергеевна Парфёнова – стажер младшего научного сотрудника сектора криминалистической идентификации биологических объектов научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Authors:

Nastassia S. Parfionava, probationer of junior researcher at the sector forensic identification of biological objects, laboratory of molecular biological research.
anastaciaparfionova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3573-3039>

Сергей Александрович Полевой – стажер младшего научного сотрудника сектора криминалистической идентификации биологических объектов научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Елена Александровна Спивак – младший научный сотрудник лаборатории психолого-лингвистических исследований научного отдела речеведческих и экономических исследований.

Александра Евгеньевна Гребенчук – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Анна Николаевна Хох – заведующий лабораторией исследования материалов, веществ и изделий научного отдела технических, криминалистических и специальных исследований.

Светлана Александровна Котова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории технических и криминалистических исследований научного отдела технических, криминалистических и специальных исследований.

Siarhei A. Paliavoi, probationer of junior researcher at the sector forensic identification of biological objects, laboratory of molecular biological research.

ultrabook@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-0647-152X>

Alena A. Spivak, junior researcher at the laboratory of psychological and linguistic research, scientific department of speech and economic research.

spivak_e@inbox.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0062-7340>

Aliaksandra E. Hrebianchuk, junior researcher at the laboratory of molecular biological research.

iamsanya94@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1224-3275>

Anna N. Hoh, head of the laboratory research of materials, substances and products, scientific department of technical, forensic and special research.

Iann1hoh@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-4633-0163>

Sviatlana A. Kotava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of technical and forensic research, scientific department of technical, forensic and special research.

svetlkotova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6521-7732>

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ

INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 582.28(075.8)

Прикладная микология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», специализаций: 1-31 01 01-01 02 «Ботаника», 1-31 01 01-02 02 «Ботаника» / БГУ ; сост. А. К. Храмцов. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2021. 119 с. : табл. Библиогр.: с. 116–119. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/271895>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 16.11.2021, № 011316112021.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», специализаций 1-31 01 01-01 02 «Ботаника», 1-31 01 01-02 02 «Ботаника». Содержание ЭУМК предполагает формирование у студентов целостной системы знаний о роли грибов и грибоподобных организмов в жизни человека, а также возможностях и перспективах их практического использования.

УДК 60(075.8)

Евтушенков А. Н. Введение в биотехнологию [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление спец. 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)» / А. Н. Евтушенков, О. Б. Русь, А. М. Ходосовская ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2021. 196 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 183–185. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/273443>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.12.2021, № 014121122021.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление специальности 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)».

Содержание ЭУМК предполагает изучение теоретических основ и достижений классической и новейшей биотехнологии, основанной на достижениях геномной и клеточной инженерии. ЭУМК включает также лабораторный практикум по биотехнологии, позволяющий получить навыки работы с микроорганизмами. Раздел контроля знаний призван облегчить подготовку к итоговой аттестации по дисциплине.

УДК 579.25(075.8)

Веремеенко Е. Г. Геномика и метаболомика микроорганизмов [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 03 «Микробиология» / Е. Г. Веремеенко ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2021. 58 с. : ил. Библиогр.: с. 57–58. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/273496>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 23.12.2021, № 014223122021.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов 2-й ступени высшего образования специальности 1-31 01 03 «Микробиология». Содержание ЭУМК посвящено освоению принципов использования в исследовательской практике постгеномных технологий, включающих целый комплекс современных подходов, таких как геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика, получению навыков работы с программами, позволяющими собирать отдельные риды в полногеномные последовательности, проводить аннотацию геномов, предсказывать функции неохарактеризованных генов, интерпретировать и интегрировать метаболомные данные.

УДК 614.8(075.8)

Телюк Н. А. Электронный банк ситуативных эвристических и творческих заданий по курсу «Безопасность жизнедеятельности человека» [Электронный ресурс] : учеб.-метод. пособие для спец. гуманитар. профиля / Н. А. Телюк ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 85 с. : табл. Библиогр. в тексте. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/274995>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 01.02.2022, № 000501022022.

Учебно-методическое пособие «Электронный банк ситуативных эвристических и творческих заданий по курсу “Безопасность жизнедеятельности человека”» предназначено для студентов гуманитарных специальностей. В пособии представлены эвристические задания, моделирующие различные жизненные ситуации, а также творческие и исследовательские задания по различным темам. Задания предназначены как для семинарских и практических занятий по дисциплине «Безопасность жизнедеятельности человека», так и для выполнения студентами управляемой самостоятельной работы.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

<i>Костюк В. А.</i> Сверхслабая фотонная эмиссия биообъектов: возможное биологическое значение и пути практического использования	3
<i>Аладьева Т. Л., Зиматкин С. М.</i> Каталаза клетки: строение, биогенез, многообразие, функции	12

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

<i>Сидоров А. В., Шаденко В. Н.</i> Электрические характеристики сенсорного нейрона и оборонительные реакции моллюска <i>Lymnaea stagnalis</i> в условиях пролонгированной гипергликемии	23
--	----

БИОХИМИЯ

<i>Приступа К. В., Кукулянская Т. А., Храмова Е. А.</i> Изучение влияния ионов никеля(II) в почве на общую антиоксидантную активность и состояние компонентов аскорбат-глутатионного цикла в трансгенных растениях <i>Nicotiana tabacum</i>	39
<i>Филиппова С. Н., Логвина А. О., Спиридович Е. В.</i> Органо- и тканеспецифические особенности проявления антирадикального потенциала и содержания фенольных соединений в растениях рода <i>Taxus</i> spp.	48

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

<i>Бесараб Н. В., Лагоненко А. Л., Летарова М. А., Голомидова А. К., Куликов Е. Е., Летаров А. В., Евтушенков А. Н.</i> Исследование эффективности подавления бактериального ожога бактериофагами в лабораторных условиях	59
<i>Дрозд О. В.</i> Завязываемость плодов голубики высокорослой в зависимости от сортовой специфики и погодно-климатических условий.....	70

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

<i>Литвинова Н. А.</i> <i>Crepis rheoadifolia</i> M. Bieb. (Compositae) во флоре Беларуси	81
---	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Парфёнова А. С., Полевой С. А., Спивак Е. А., Гребенчук А. Е., Хох А. Н., Котова С. А.</i> Исследование полиморфизма микросателлитных маркеров сосны обыкновенной для целей криминалистического ДНК-анализа	90
Аннотации депонированных в БГУ работ.....	99

CONTENTS

REVIEWS

<i>Kostyuk V. A.</i> Superweak biophoton emission: possible biological significance and ways of practical use	3
<i>Aladyeva T. L., Zimatkin S. M.</i> Cellular catalase: structure, biogenesis, diversity, functions.....	12

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

<i>Sidorov A. V., Shadenko V. N.</i> Electrical properties of the sensory neuron and defense reactions of mollusc <i>Lymnaea stagnalis</i> at conditions of prolonged hyperglycemia	23
---	----

BIOCHEMISTRY

<i>Pristupa K. V., Kukulianskaya T. A., Khramtsova E. A.</i> The influence of nickel(II) ions in soil on total antioxidant activity and components of the ascorbat-glutathione cycle in transgenic plants <i>Nicotiana tabacum</i>	39
<i>Filipava S. N., Lohvina H. O., Spiridovich E. V.</i> Organ- and tissue-specific variation in antiradical potential and phenolic compounds content in plants of the genus <i>Taxus</i> spp.	48

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Besarab N. V., Lagonenko A. L., Letarova M. A., Golomidova A. K., Kulikov E. E., Letarov A. V., Evtushenkov A. N.</i> Study of the efficiency of suppressing fire blight by bacteriophages under laboratory conditions	59
<i>Drozd O. V.</i> Features fruit set highbush blueberry depending on the cultivar specifications and weather and climatic conditions.....	70

BIODIVERSITY

<i>Litvinova N. A.</i> <i>Crepis rhoeadifolia</i> M. Bieb. (Compositae) in the flora of Belarus	81
---	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Parfionava N. S., Paliavoi S. A., Spivak A. A., Hrebanchuk A. E., Hoh A. N., Kotava S. A.</i> Research of polymorphism of microsatellite markers of Scots pine for the purposes of forensic DNA analysis.....	90
Indicative abstracts of the papers deposited in BSU.....	99

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

**Экспериментальная биология
и биотехнология.
№ 1. 2022**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

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

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

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

E-mail: jbiol@bsu.by

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

«Экспериментальная биология
и биотехнология» издается с января 1969 г.
С 1969 по 2016 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»,
с 2017 по 2021 г. – под названием
«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология».

Редактор *О. А. Семенец*
Технический редактор *В. В. Пишкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 28.02.2022.
Тираж 100 экз. Заказ 1477.

Издательско-полиграфическое частное
унитарное предприятие «Донарит».
Свидетельство о государственной регистрации
издателя, изготовителя, распространителя
печатных изданий № 1/289 от 17.04.2014.
Ул. Октябрьская, 25, 220030,
г. Минск, Республика Беларусь.

© БГУ, 2022

**Experimental Biology
and Biotechnology.
No. 1. 2022**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

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

E-mail: jbiol@bsu.by

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

«Experimental Biology and Biotechnology»
published since January, 1969.
From 1969 to 2016 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»,
from 2017 to 2021 named «Journal of the Belarusian
State University. Biology».

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

Signed print 28.02.2022.
Edition 100 copies. Order number 1477.

Publishing and printing private
unitary enterprise «Donarit».
Certificate of state registration of the publisher,
manufacturer, distributor of printed publications
No. 1/289 dated 17.04.2014.
25 Kastyryčnickaja Str.,
Minsk 220030, Republic of Belarus.

© BSU, 2022