



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

2

2023

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор **ДЕМИДЧИК В. В.** – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, доцент; декан биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: dzemidchyk@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** **ФИЛИПЦОВА Г. Г.** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: filiptsova@bsu.by

- Адамович Б. В.* Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Валентович Л. Н. Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Гельтман Д. В. Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Гурин А. В. Университетский колледж Лондона, Лондон, Великобритания.
Кильчевский А. В. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Костюк В. А. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А. Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Лермонтова И. Н. Институт генетики и исследования сельскохозяйственных растений им. Г. В. Лейбница, Гатерслебен, Германия.
Медведев С. С. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Мороз Л. Л. Флоридский университет, Гейнсвилл, США.
Семак И. В. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Стржалка К. Ягеллонский университет, Краков, Польша.
Тихомиров В. Н. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Чубанов В. С. Институт фармакологии и токсикологии им. Вальтера Штрауба Мюнхенского университета им. Людвига и Максимилиана, Мюнхен, Германия.
Шабала С. Н. Университет Тасмании, Хобарт, Австралия.
Ю Мин Международный исследовательский центр экологической биологии мембран Фошаньского университета, Фошань, Китай.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief **DEMIDCHIK V. V.**, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, docent; dean of the faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: dzemidchyk@bsu.by

Deputy editor-in-chief **SIDOROV A. V.**, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: sidorov@bsu.by

Executive secretary **FILIPTSOVA G. G.**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: filiptsova@bsu.by

- Adamovich B. V.* Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Chubanov V. S. Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany.
Geltman D. V. V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Gourine A. V. University College of London, London, United Kingdom.
Kilchevsky A. V. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kostyuk V. A. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Kulchitsky V. A. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Lermontova I. N. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany.
Medvedev S. S. Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Moroz L. L. University of Florida, Gainesville, USA.
Semak I. V. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Shabala S. N. University of Tasmania, Hobart, Australia.
Strzalka K. Jagiellonian University, Kraków, Poland.
Tikhomirov V. N. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Valentovich L. N. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Yu Min International Research Centre for Environmental Membrane Biology, Foshan University, Foshan, China.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

REVIEWS

УДК 577.352.46

МЕХАНИЗМ ТРАНСМЕМБРАННОГО И ДАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА НИКЕЛЯ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

В. С. МАЦКЕВИЧ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

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

Никель (Ni^{2+}) – незаменимый элемент минерального питания растений, который необходим для нормального протекания физиологических процессов в очень небольших количествах. В высоких концентрациях данный тяжелый металл негативно влияет на метаболизм и оказывает выраженное токсическое действие. В последние годы появился ряд работ, посвященных изучению накопления, распределения и транслокации Ni^{2+} в тканях высших растений. Установлено, что поглощение Ni^{2+} может осуществляться путем пассивного либо активного переноса через плазматическую мембрану клеток корня. Пассивный транспорт обеспечивается посредством неселективных катионных каналов, при этом наибольший вклад, вероятно, вносят члены семейства каналов, активируемых циклическими нуклеотидами (CNGC). Активный транспорт идет с участием специальных белков-переносчиков, в первую очередь ZIP (Zn-регулируемые, Fe-регулируемые белки-транспортеры), что экспериментально продемонстрировано пока для IRT1 (Fe-регулируемые белки-транспортеры). Загрузка Ni^{2+} в ксилему и его перераспределение по различным органам и тканям растения осуществляется активными транспортерами ZIP, HMA (АТФазы тяжелых металлов P_{1B}-типа) и NRAMP (белки макрофагов, ассоциированные с естественной резистентностью). На данный процесс оказывают влияние синтез и концентрация комплексобразователей, таких как гистидин, никотинамин, глутатион, фитохелатины, фенолы и органические кислоты. Дальнейшие исследования в области транспорта Ni^{2+} , вероятно, будут фокусироваться на установлении субъединиц неселективных катионных каналов, ответственных за вход никеля в клетки корневой системы растений, выявлении взаимосвязи между транспортными процессами и их регуляцией на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях.

Образец цитирования:

Мацкевич ВС, Демидчик ВВ. Механизм трансмембранного и дальнего транспорта никеля в высших растениях. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:4–29. EDN: YUVQVD

For citation:

Mackievic VS, Demidchik VV. Mechanism of transmembrane and long-distance transport of nickel in higher plants. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:4–29. Russian. EDN: YUVQVD

Авторы:

Вера Сергеевна Мацкевич – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений, старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, доцент; декан биологического факультета.

Authors:

Viera S. Mackievic, researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology and senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

v.mackievic@gmail.com

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, docent; dean of the faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

Ключевые слова: никель; катионные каналы; активный транспорт; высшие растения.

Благодарность. Работа выполнена в рамках задания «Исследование функционального взаимодействия сигнально-регуляторных и антиоксидантных систем при стрессе с целью повышения общей стрессоустойчивости высших растений и создания новых биотехнологий» (№ гос. регистрации 20211222) подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии – 2» государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг.

MECHANISM OF TRANSMEMBRANE AND LONG-DISTANCE TRANSPORT OF NICKEL IN HIGHER PLANTS

V. S. MACKIEVIC^a, V. V. DEMIDCHIK^a

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

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

Nickel (Ni^{2+}) is an indispensable element of mineral nutrition in plants, which is needed for the normal course of physiological processes in very small quantities. In high concentrations, this heavy metal is harmful to metabolism and causes a pronounced toxic effect. In recent years, a number of works have appeared devoted to the study of Ni^{2+} accumulation, distribution and translocation in the tissues of higher plants. It has been established that Ni^{2+} uptake can be carried out by passive or active transfer through the plasma membrane of root cells. Passive transport is mediated through non-selective cation channels, with members of the cyclic nucleotide-gated channel (CNGC) family probably contributing the most. Active transport occurs with the participation of special transporter proteins, primarily ZIP (zinc-regulated, iron-regulated transporter-like proteins), which has so far been experimentally demonstrated for IRT1 (iron-regulated transporter-like proteins). Ni^{2+} is loaded into the xylem and redistributed to various plant organs and tissues by active transporters ZIP, HMA ($\text{P}_{1\text{B}}$ -type heavy metal ATPases) and NRAMP (natural resistance-associated macrophage proteins). This process is influenced by the synthesis and concentration of complexing agents such as histidine, nicotinamine, glutathione, phytochelatins, phenols and organic acids. Further studies in the field of Ni^{2+} transport will probably focus on the identification of subunits of non-selective cation channels responsible for the entry of nickel into the plant root cells, and the identification of the relations between transport processes and their regulation at the posttranscriptional and posttranslational levels.

Keywords: nickel; cation channels; active transport; higher plants.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the assignment «Study of the functional interaction of signal-regulatory and antioxidant systems under stress in order to increase the overall stress resistance of higher plants and create new biotechnologies» (state registration No. 20211222) of the subprogramme «Molecular and cellular biotechnologies – 2» of the state programme of scientific research «Biotechnologies-2» for 2021–2025.

Введение

Никель является химическим элементом 10-й группы (ранее – группа VIIIВ) периодической системы с атомным номером 28 и атомной массой 58,69 [1]. В природе данный металл представлен смесью 5 стабильных изотопов – ^{58}Ni (68,08 %), ^{60}Ni (26,22 %), ^{61}Ni (1,14 %), ^{62}Ni (3,63 %) и ^{64}Ni (0,93 %). Также имеются искусственно созданные изотопы никеля, самые стабильные из которых – ^{59}Ni (период полураспада 10^5 лет), ^{63}Ni (период полураспада 100 лет) и ^{56}Ni (период полураспада 6 сут). Атомы никеля имеют внешнюю электронную конфигурацию $[\text{Ar}]3d^84s^2$. Наиболее устойчивым для никеля является состояние окисления 0 или +2, тем не менее также встречаются степени окисления +1, +3 и +4 [2]. По своим химическим свойствам никель схож с другими металлами, такими как железо, кобальт и медь. Однако, в отличие от кобальта и железа, в водном растворе никель стабилен только в степени окисления +2 [3], при этом стабильность Ni^{2+} сохраняется в широком диапазоне pH и редокс-условий почвенных растворов [4]. Основные физические характеристики иона никеля(II) в сравнении с характеристиками ионов других металлов приведены в таблице. По величине кристаллического радиуса (0,70 Å) Ni^{2+} наиболее близок к Co^{2+} (0,72 Å), Zn^{2+} (0,74 Å), Fe^{2+} (0,75 Å) и Mg^{2+} (0,65 Å) [5–9], а по величине гидратированного радиуса (4,04 Å) – к Ba^{2+} (4,04 Å), Pb^{2+} (4,01 Å), Ca^{2+} (4,12 Å) и Sr^{2+} (4,12 Å) [5].

Сравнительная характеристика некоторых физических параметров ионов металлов при температуре 25 °С
 Characteristics of some physical parameters of metal ions at temperature of 25 °С

Ион	Координационное число	Энергия гидратации ионов, кДж/моль	Кристаллический радиус, Å					Радиус Стокса – Эйнштейна, Å	Гидратированный радиус, Å
			По Полингу	По Мелвин-Хьюзу	По Гольдшмидту	По Ингольду	По Бокио		
Al ³⁺	4, 5, 6*	–4665	0,50	0,550	0,57	0,72	0,57	4,39	4,75
Ba ²⁺	6, 7, 8*, 9, 10, 11, 12	–1305	1,35	1,395	1,34	1,53	1,38	2,90	4,04
Ca ²⁺	6*, 7, 8, 9, 10, 12	–1577	0,99	1,051	0,99	1,18	1,04	3,10	4,12
Cd ²⁺	4, 5, 6*, 7, 8, 12	–1807	0,97	0,990	0,97	1,14	0,99	3,41	4,26
Co ²⁺	4, 5, 6*, 8	–1996	0,72	0,780	0,72	–	0,78	3,35	4,23
Cs ⁺	6, 8*, 9, 10, 11, 12	–264	1,69	1,678	1,67	1,69	1,65	1,19	3,29
Cu ²⁺	4, 5*, 6*	–2100	–	0,470	0,72	0,96	0,80	3,25	4,19
Fe ²⁺	4, 5, 6*, 8	–1946	0,75	0,800	0,71	–	0,80	3,44	4,28
Fe ³⁺	4, 5, 6*, 8	–4430	0,60	0,670	0,74	–	0,67	4,05	4,57
K ⁺	4, 6*, 7, 8, 9, 10, 12	–322	1,33	1,341	1,33	1,33	1,33	1,25	3,31
Mg ²⁺	4, 5, 6*, 8	–1921	0,65	0,780	0,66	0,82	0,74	3,47	4,28
Mn ²⁺	4, 5, 6*, 7, 8	–1841	0,80	0,830	0,80	–	0,91	3,68	4,38
Na ⁺	4, 5*, 6, 7, 8, 9, 12	–406	0,95	1,012	0,97	0,95	–	1,84	3,58
Ni ²⁺	4, 5, 6*	–2105	0,70	0,740	0,69	–	0,74	2,92	4,04
Pb ²⁺	4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	–1481	–	1,280	1,20	–	1,25	2,83	4,01
Sr ²⁺	6*, 7, 8, 9, 10, 12	–1443	1,13	1,175	1,12	1,32	1,20	3,10	4,12
Zn ²⁺	4, 5, 6*, 8	–2046	0,74	0,566	0,74	0,88	0,83	3,49	4,19

Примечания: 1. Составлено на основе данных источников [5–9]. 2. Звездочкой отмечено наиболее типичное координационное число для каждого иона.

Никель является пятым по распространенности элементом на Земле после железа, кислорода, кремния и магния [10]. Доля никеля в верхней части литосферы, где он сосредоточен в магматических породах в виде свободного металла или комплексов с железом, составляет 3% [11]. Никель и его соединения естественным образом присутствуют в земной коре и в относительно больших количествах выбрасываются в атмосферу при извержении вулканов, лесных пожарах, образовании метеорной пыли и т. д. [1; 10–12]. В последние 100 лет значительная часть выбросов никеля в атмосферу имеет антропогенную природу, т. е. обуславливается добычей полезных ископаемых, выплавкой и переработкой нержавеющей стали и других никельсодержащих сплавов, использованием никеля в качестве катализатора и различного рода покрытий, сжиганием ископаемого топлива и переработкой отходов [1].

Для растений никель является важным микроэлементом, в первую очередь как компонент ряда ферментов (уреаза, глиоксалаза, пептидная деформилаза, метил-КоМ-редуктаза, некоторые супероксид-дисмутазы и гидрогеназы) [12; 13]. Следовательно, он играет значимую роль в различных метаболических процессах, включая уреолитиз, водородный обмен, биогенез метана и ацетогенез [13]. Тем не менее потребность растений в данном металле невысока. Для большинства видов концентрация Ni²⁺ свыше 10–50 мкмоль/л в почвенном растворе вызывает токсические эффекты: ингибирует прорастание семян, тормозит ростовые процессы, подавляет фотосинтез и клеточное дыхание, нарушает транспорт сахаров и микроэлементов, индуцирует хлороз, некроз и увядание [12–14]. Кроме того, Ni²⁺ способен накапливаться в тканях растения, что обеспечивает возможность попадания больших доз никеля по пищевым цепям в организм животных и человека.

В последние годы появился ряд работ, посвященных изучению накопления, распределения и транслокации никеля в тканях высших растений [15–22]. В первую очередь с использованием гистохимических методов определяется содержание никеля в различных частях растений и анализируется влияние на этот параметр эндогенных лигандов. Также большой пласт исследований проводится на растениях-гипераккумуляторах в связи с высоким потенциалом изучения физиологических процессов в данной группе растений для повышения эффективности усвоения микроэлементов и продуктивности сельскохозяйственных культур, а также для разработки различных приложений в области фиторемедиации, фитомайнинга, биофортификации и питательной безопасности сельскохозяйственных культур. Тем не менее на основе упомянутых работ пока не сформировано общепринятое мнение о механизмах трансмембранного и дальнего транспорта никеля в растениях. В настоящей статье была предпринята попытка определить потенциальные белковые комплексы, вовлеченные в транспорт никеля в высших растениях, основываясь на экспериментальных данных о поступлении и распределении Ni^{2+} и других металлов, имеющих схожие физико-химические характеристики.

Биодоступность никеля и его поступление в растительный организм

Под биологической доступностью (или биодоступностью) химических элементов понимают ту часть от общего количества данного элемента в среде, которая потенциально может быть поглощена организмами [23]. Биодоступность тяжелых металлов в наземных экосистемах зависит от их физико-химической формы [24], характеристик почвы [25] и биологических особенностей организмов [26]. Также важным фактором является наличие в среде металлов-микроэлементов [27]. Недавно было отмечено, что внесение оксида кальция из расчета 5 % от массы почвы на 15-е сутки увеличивает pH среды и снижает биодоступность никеля в 2,5 раза (с 93,8 % (для необработанной почвы) до 36,7 %) [28]. Другим неконкурентным ингибитором поступления Ni^{2+} является Mg^{2+} , что продемонстрировано в исследованиях на корнях *Berkheya coddii* [29] и *Hordeum vulgare* [30]. В отсеченных корнях ячменя ингибирование входа Ni^{2+} показано для ионов Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} , при этом Zn^{2+} и Cu^{2+} были сильноконкурентными, Co^{2+} – слабоконкурентным, а Cd^{2+} и Pb^{2+} – неконкурентными ингибиторами Ni^{2+} . В то же время Mn^{2+} не влиял на поглощение Ni^{2+} [30]. Кроме того, важный вклад в доступность металлов и их подвижность в ризосфере вносят корневые экссудаты и микроорганизмы [31]. В частности, на поступление и транслокацию никеля влияют S-содержащие лиганды (например, глутатион и фитохелатины), N-содержащие лиганды (например, никотинамин, производные S-аденозил-L-метионина, гистидина и других аминокислот) и O-содержащие лиганды (например, фенолы и органические кислоты) [17].

Поступление металлов в растительный организм происходит преимущественно за счет поглощения корнями, но может осуществляться и за счет поглощения листьями [32]. Поглощение тяжелых металлов корневой системой представляет собой сложный процесс переноса металла из почвенного раствора внутрь клеток ризодермы [31]. Предполагается, что поглощение никеля соответствует кинетике Михаэлиса – Ментен со значениями константы Михаэлиса – Ментен (K_m) в диапазоне 0,51–379,0 мкмоль/л [33]. Наблюдаемая вариабельность K_m в зависимости от диапазона концентраций Ni^{2+} в почвенном растворе свидетельствует о многофазности данного процесса. Относительно высокие значения кажущейся K_m при увеличении содержания никеля во внешнем растворе более 50 мкмоль/л указывают на переход от высокоаффинных к низкоаффинным транспортным системам. Поступление никеля и других тяжелых металлов в корни может осуществляться по двум механизмам: путем пассивного транспорта ионов в клетку по градиенту электрохимического потенциала (через ионные каналы) без затрат энергии либо путем активного транспорта ионов специализированными белками-переносчиками с затратами энергии [34–36].

Ионные каналы мембран растений, проницаемые для двухвалентных катионов, как потенциальный механизм транспорта никеля у высших растений

Пассивный транспорт металлов в клетку потенциально может осуществляться посредством неспецифических катионных каналов: деполаризационно-активируемых Ca^{2+} -проницаемых каналов, гиперполяризационно-активируемых Ca^{2+} -проницаемых каналов и потенциалнезависимых Ca^{2+} -проницаемых каналов [37–39]. Деполаризационно-активируемые и потенциалнезависимые Ca^{2+} -проницаемые каналы «физиологически» обнаруживаются в клетках корня, ксилемы, замыкающих клетках устьиц. Гиперполяризационно-активируемые Ca^{2+} -проницаемые каналы преимущественно локализованы в корневых волосках и клетках корня в зоне роста растяжением [2; 40]. Вероятно, эти каналы кодируются следующими семействами генов: *CNGC* (гены, которые кодируют каналы, активируемые циклическими нуклеотидами) [41–45];

GLR (гены, которые кодируют каналы, подобные глутаматным рецепторам) [46–51]; *ANN* (гены, которые кодируют аннексины) [52–55]; *MSL* (гены, которые кодируют каналы, похожие на механочувствительные каналы малой проводимости) [56–58]; *MCA* (гены, которые кодируют каналы Mid1-комплементарной активности) [56; 59; 60]; *Piezo* (гены, которые кодируют пьезоканалы) [61; 62]; *OSCA* (гены, которые кодируют каналы, индуцируемые гиперосмоляльностью) [63–68].

Каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (*cyclic nucleotide-gated channels, CNGC*). Каналы CNGC представляют собой большое семейство неселективных катионных каналов растений, которое разделено на 6 филогенетических ветвей, схожих по структуре с каналами CNGC животных [41]. Они имеют тетрамерное строение [42]. Каждая субъединица канала включает 6 трансмембранных доменов, а на С-конце содержит домен связывания циклических нуклеотидов, имеющий стандартную структуру β-сэндвича (нуклеотид связывается внутри кармана между β-слоями) [39]. Первый представитель семейства генов *CNGC* – ген *HvCMT1* – был охарактеризован в ячмене [69]. В настоящее время с помощью биоинформационных методов идентифицированы 16 генов *OsCNGC* в рисе, 18 генов *SICNGC* в томате, 26 генов *BoCNGC* в капусте [44].

Геном *Arabidopsis thaliana* содержит 20 представителей семейства генов *CNGC*, которые можно разделить на 5 групп (I, II, III, IV-A и IV-B) на основе сходства их нуклеотидных последовательностей [42]. Группа I включает 6 генов (*AtCNGC1, AtCNGC3, AtCNGC10–AtCNGC13*). Кодируемые ими каналы участвуют в защитных реакциях на биотический стресс, формировании гиперчувствительного ответа, индукции запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ) и гормональной регуляции [45; 70; 71]. Группа II насчитывает 5 генов (*AtCNGC5–AtCNGC9*). Кодируемые ими каналы ответственны за рост корневых волосков, мужскую фертильность, ответ на тепловой шок и т. д. [72]. Группа III включает 5 генов (*AtCNGC14–AtCNGC18*). Они кодируют белки, которые требуются для нормального роста пыльцевых трубок и кончиков корневых волосков [45; 73]. Группа IV-A содержит 2 гена (*AtCNGC19* и *AtCNGC20*). Кодируемые ими каналы локализованы в тонопласте и обеспечивают транспорт катионов между цитоплазмой и центральной вакуолью в ответ на биотические либо абиотические стресс-факторы, а также потенциально участвуют в формировании солеустойчивости [42]. Группа IV-B насчитывает 2 гена (*AtCNGC2* и *AtCNGC4*). Они кодируют каналы, участвующие в транспорте моновалентных катионов и стресс-ответе на патогены [42]. Гены группы IV-B являются эволюционными предками генов *CNGC* и в основном экспрессируются в зародыше и семенах после опыления, что позволяет предположить, что они играют значительную роль в развитии зародыша [44]. Кроме того, было показано, что происхождение всех генов группы IV-B связано с дупликацией генов и они имеют схожий паттерн экспрессии в разных тканях. Это указывает на то, что их функция заключается в повышении адаптивности в процессе эволюции генов.

В работе [74] проанализировано изменение роста основного корня у мутантов арабидопсиса по генам *CNGC* в ответ на тяжелометаллический стресс. В результате показано, что каналы CNGC1, CNGC10, CNGC13 и CNGC19 играют важную роль в проявлении токсичности Pb²⁺, а каналы CNGC11, CNGC13, CNGC16 и CNGC20 – в проявлении токсичности Cd²⁺. Мутации в генах *CNGC1* и *CNGC13* снижали поступление Pb²⁺ в растения, в то время как мутации в генах *CNGC11, CNGC15* и *CNGC19* уменьшали аккумуляцию как Pb²⁺, так и Cd²⁺. Также следует отметить, что сверхэкспрессия гена *NtCBP4* (гомолога гена *AtCNGC1*) в трансгенных линиях табака повышала устойчивость растений к Ni²⁺ и гиперчувствительность к Pb²⁺ [75]. При кадмиевом стрессе активировались 18 генов *CNGC* табака (*NtCNGC2, NtCNGC3, NtCNGC5–NtCNGC7, NtCNGC14, NtCNGC16–NtCNGC21* и *NtCNGC29–NtCNGC34*) [76], при этом самый высокий уровень экспрессии в листьях был отмечен для *NtCNGC6*, а в корнях – для *NtCNGC7* (оба гена являются представителями группы I). В работе [77] показано, что каналы CNGC1, CNGC3, CNGC9, CNGC11, CNGC12 и CNGC17 вовлечены в процессы накопления Sr²⁺, а канал CNGC1 ответствен за аккумуляцию Cs⁺ в листьях *A. thaliana*. Таким образом, отдельные члены семейства генов *CNGC*, в частности представители групп I и III, потенциально могут быть вовлечены в поступление Ni²⁺ в клетки растений.

Каналы, подобные глутаматным рецепторам (*glutamate receptor-like channels, GLR*). Каналы GLR растений являются гомологами iGluR – лигандуправляемых ионных каналов, опосредующих передачу сигналов между нейронами у млекопитающих [39; 48]. У растений они принимают участие в таких процессах, как половое размножение, прорастание семян, пролиферация меристемы корня, рост пыльцевых трубок, удлинение клеток междоузлий, регуляция открытия устьиц, индукция Ca²⁺-сигнализации в ответ на засуху, засоление и биотический стресс [48; 49; 78].

За последние несколько десятилетий гены, кодирующие каналы GLR, были идентифицированы в геноме многих видов растений. Так, у модельного объекта *A. thaliana* были обнаружены 20 генов *AtGLR* [46; 49; 79], у *Oryza sativa* – 24 гена *OsGLR* [80], у *Zea mays* – 16 генов *ZmGLR* [81], у *Solanum lycopersicum* – 13 генов *SlGLR* [82], у *Saccharum spontaneum* – 34 гена *SsGLR* [83], у *Gossypium hirsutum* – 36 генов *GhGLR* [84], у *Malus domestica* – 32 гена *MdGLR* [85], у *Pyrus communis* – 34 гена *PbrGLR* [86],

у *Glycine max* – 35 генов *GmGLR* [87], у *Physcomitrella patens* – только 2 гена *PpGLR* [88]. Белки AtGLR состоят из 800–960 аминокислот и имеют молекулярную массу ~100 кДа. По структуре GLR схожи с iGluR животных и представляют собой тетрамеры, каждая из субъединиц которых состоит из 4 трансмембранных доменов (M1, M2, M3 и M4) и 2 лигандсвязывающих областей (S1 и S2) [46]. Области S1 и S2 претерпевают конформационные изменения при связывании с ними агонистов [89], что способствует прохождению ионов через пору канала [78]. С использованием техники гетерологической экспрессии установлено, что GLR растений опосредуют рост цитоплазматической активности Ca^{2+} и активируются широким спектром аминокислот (13 из 20 протеиногенных аминокислот (глутамат, глицин, аспарагин, аланин, серин, цистеин, глутамин, метионин, триптофан, тирозин, треонин, лейцин, фенилаланин) и ряд непротеиногенных аминокислот (N-метил-D-аспарагиновая кислота и β -метиламино-L-аланин)), глутатионом, кинуреновой кислотой [50; 51]. Также с помощью гетерологической экспрессии и техники пэтч-кламп показано, что наряду с Ca^{2+} каналы GLR способны пропускать Na^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ba^{2+} в присутствии глутамата. Селективность к ионам определяется последовательностью аминокислот в доменах M2 и M3, выстилающих пору [51]. Однако данных о способности каналов GLR транспортировать тяжелые металлы в настоящее время нет.

Аннексины (ANN). Аннексины – широко распространенные у растений и животных цитоплазматические белки, которые способны связываться с фосфолипидами мембран Ca^{2+} -зависимым либо Ca^{2+} -независимым способом [39; 90]. Данное семейство остается малоописанным, тем не менее с помощью биоинформационного анализа геномов гены ANN были идентифицированы у важнейших представителей двудольных растений из семейства капустных (*A. thaliana* (8 генов) и *Brassica rapa* (13 генов)), семейства бобовых (*Arachis hypogaea* (8 генов), *Medicago truncatula* (10 генов) и *Glycine max* (22 гена)), семейства пасленовых (*Solanum lycopersicum* (9 генов) и *S. tuberosum* (9 генов)), семейства ивовых (*Populus trichocarpa* (12 генов)), семейства виноградовых (*Vitis vinifera* (14 генов)), семейства мальвовых (*Gossypium raimondii* (14 генов)), семейства кариковых (*Carica papaya* (12 генов)). Среди злаковых однодольных растений гены ANN были найдены у *Oryza sativa* (10 генов), *Zea mays* (12 генов), *Sorghum bicolor* (10 генов), *Hordeum vulgare* (11 генов), *Brachypodium distachyon* (11 генов) и *Triticum aestivum* (25 генов). Также гены ANN были выявлены у плауна *Selaginella moellendorffii* (5 генов) и мха *Physcomitrella patens* (7 генов) [54]. Аннексины растений состоят из 4 повторяющихся аннексиновых доменов размером около 70 аминокислот, при этом только первый и последний повторы содержат консервативный мотив из 38 аминокислот, обеспечивающий связывание Ca^{2+} [55].

В экспериментах *in vitro* аннексины демонстрировали ряд функций, в том числе экзоцитоз, связывание актина, АТФазную и ГТФазную активность, пероксидазную активность, регуляцию каллозосинтаз и ионный транспорт [53]. Считается, что они вовлечены в регуляцию процессов роста и развития, а также в ответные реакции на биотический и абиотический стресс [91]. Недавно было показано, что белок ANN1 принимает участие в поглощении кадмия [92]. Сверхэкспрессия гена аннексина-1 тополя (*PeANN1*) в арабидопсисе приводила к торможению роста и снижению жизнеспособности растений после 10-дневного выращивания на среде с 50 мкмоль/л $CdCl_2$ вследствие повышенного накопления металла в корнях. Анализ потока Cd^{2+} в кончиках корня данных растений с помощью неинвазивной микроэлектродной техники показал, что при импульсном (30 мин) и кратковременном (12 ч) стрессировании 50 мкмоль/л $CdCl_2$ трансгенные растения (*PeANN1-OE1* и *PeANN1-OE2*) проявляли повышенную (на 20–40 % по сравнению с природным экотипом и на 55–85 % по сравнению с нокаутной линией *Atann1*) Cd^{2+} -проводимость. Данная проводимость ингибировалась добавлением 0,5 ммоль/л $GdCl_3$ и усиливалась введением 1 ммоль/л H_2O_2 . Это указывает на то, что белок PeANN1, вероятно, способствует обогащению корней кадмием, осуществляя регуляцию его транспорта через Ca^{2+} -проницаемые каналы, внедряясь в мембраны для дестабилизации мембранного бислоя или действуя как АФК-активируемые Ca^{2+} -проницаемые каналы [92]. В работах по изучению влияния двухвалентных ионов на функционирование аннексинов животного происхождения было показано, что не все ионы тяжелых металлов могут вызывать конформационные изменения в молекуле аннексина, достаточные для обеспечения липид-белковых или белок-белковых взаимодействий. Способность ионов металлов вызывать аннексинопосредованную агрегацию липосом уменьшается в ряду $Cd^{2+} \rightarrow Ba^{2+}$, $Sr^{2+} \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow Mn^{2+} \rightarrow Ni^{2+} \rightarrow Co^{2+}$ [93]. Таким образом, вклад аннексинов в поглощение никеля, вероятно, незначителен.

Функционирование нескольких семейств ионных каналов лежит в основе реакции растений на различные механические воздействия (гравитация, вибрация, прикосновение, гиперосмотический стресс). Их часто объединяют в группу *механочувствительных каналов (mechanosensitive ion channels, MS)* [39; 56; 94]. Предыдущие исследования показали, что каналы MS участвуют в широком спектре физиологических процессов растений, таких как рост пыльцевых трубок, появление боковых корней, повреждение клеточной

стенки, регуляция формы и размера пластид, взаимодействие растений и патогенов и т. д. [56]. На сегодняшний день известны 5 семейств генов, кодирующих каналы MS в растениях, – *MSL*, *MCA*, *TRK*, *Piezo* и *OSCA*. Канал TRK (двупоровый калиевый канал) обладает селективностью к K^+ , остальные семейства обеспечивают транспорт Ca^{2+} .

Каналы, похожие на механочувствительные каналы малой проводимости (*small conductance mechanosensitive ion channel-like channels*, MSL). Каналы MSL являются аналогами механочувствительных каналов *Escherichia coli* (EcMscS), ответственных за снижение внутриклеточного осмотического давления для защиты бактерий от лизиса при гипоосмотическом шоке [95]. В результате обширных биоинформационных исследований представители семейства генов *MSL* были идентифицированы в геноме многих сельскохозяйственных культур. Так, 6 генов выявлены у *Oryza sativa*, *Cicer arietinum* и *Sorghum bicolor*, 8 генов – у *Zea mays*, 10 генов – у *Hordeum vulgare*, 11 генов – у *Aegilops tauschii*, 9 и 30 генов – у *Triticum urartu* и *T. aestivum* соответственно [57]. Геном *A. thaliana* кодирует 10 белков AtMSL, которые делятся на 3 группы: митохондриальные каналы (группа I), хлоропластные каналы (группа II) и каналы плазматической мембраны (группа III) [56]. Многочисленные исследования функций ионных каналов MSL относят их либо к осморегуляции, либо к передаче сигналов, включая Ca^{2+} -сигнализацию [58; 95–97]. С помощью РНК-секвенирования была показана избирательная экспрессия генов *TaMSL* у пшеницы в условиях абиотического стресса. Так, большинство генов *TaMSL* усиленно экспрессировались после 6 ч выдерживания растений в условиях засухи, повышенных температур и солевого стресса [57].

Наиболее хорошо изученным представителем семейства является белок AtMSL10. Он позволяет растениям воспринимать колебательные механические раздражения, регулирует процесс ЗКГ, а также участвует в передаче электрических сигналов (Ca^{2+} -волны) на большие расстояния (между органами) при раневом стрессе [96; 98]. С помощью техники гетерологической экспрессии было показано, что канал MSL10 в ооцитах имеет большую селективность к анионам ($P_{Cl^-} : P_{Na^+} = 5,9$), обратимо ингибируется ионами гадолиния (вероятно, косвенно за счет изменения упаковки липидов или увеличения жесткости мембраны) и закрывается при более низком натяжении мембран, чем открывается [99; 100]. Таким образом, при возрастании натяжения мембран, вызванном осмотическим стрессом, повреждением клеточной стенки, изгибом органа или патогенной инвазией, канал MSL10 преимущественно высвобождает анионы из клетки, продолжая деполяризовывать клеточную мембрану до тех пор, пока напряжение не вернется к исходному уровню [99]. Функции других представителей каналов MSL включают поддержание водного и ионного баланса в пыльцевых трубках (MSL8), формирование разности электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий (MSL1), восприятие механических сигналов клетками корня (MSL4 – MSL6, MSL9), контроль объема хлоропластов в нормальных и стрессовых условиях (MSL2 и MSL3) [56]. Регистрируемые одиночные проводимости индивидуально экспрессированных генов *MSL9* и *MSL10* составляли 45 и 140 пСм соответственно [100]. Кодированные ими каналы, вероятно, пропускают анионы лучше, чем катионы, в том числе Ca^{2+} [39; 101]. Другие гомологи EcMscS либо демонстрируют меньшую селективность к анионам ($P_{Cl^-} : P_{K^+} = 1,2–3,0$), либо являются селективными к катионам ($P_{Cl^-} : P_{K^+} = 0,17–0,40$) [100].

Каналы Mid1-комплементарной активности (*Mid1-complementing activity channels*, MCA). Каналы MCA были идентифицированы по комплементации дрожжевого белка Mid1 (механочувствительного канала, участвующего во входе Ca^{2+} в клетку) [56]. У *A. thaliana* имеются 2 гена *MCA* (*AtMCA1* и *AtMCA2*). Оба гена экспрессируются в апикальной меристеме побега, однако имеют дифференцированные паттерны экспрессии в листьях, корневом чехлике и трихобластах. Например, только *AtMCA1* экспрессируется в промеристеме и прилегающей зоне удлинения первичного корня, а *AtMCA2* экспрессируется в клетках мезофилла семядолей и листьев [59]. Белок AtMCA1 опосредует повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме в ответ на холодовой стресс, гипоосмотический шок, обеспечивает восприятие гравитации и тактильную чувствительность в кончиках корней. Белок AtMCA2 действует как Ca^{2+} -проницаемый механочувствительный канал, который непосредственно воспринимает натяжение мембраны для открытия канала [56; 59; 102]. При гипоосмотическом шоке белки MCA гипотетически также могут индуцировать Ca^{2+} -зависимую активацию НАДФН-оксидаз, тем самым стимулируя синтез АФК [39]. Следует отметить, что каналы MCA, по-видимому, имеют общие функции у различных видов растений. Это было продемонстрировано в исследованиях функционирования каналов OsMCA1 в рисе, CNR13 в кукурузе, NtMCA1 и NtMCA2 в табаке [102].

Пьезоканалы (Piezo). Пьезоканалы растений в настоящее время остаются малоизученными. Имеется лишь несколько экспериментальных работ по изучению их функции в модельных растениях *A. thaliana* и *Physcomitrella patens*. У *A. thaliana* был идентифицирован 1 ген *Piezo* (*AtPiezo1*), в основном экспрессирующийся в корневом чехлике [61; 103]. Показано, что белок AtPiezo1 является ключевым элементом иммунного ответа на вирус мозаики огурца и вирус мозаики репы [104]. Кроме того, AtPiezo1

способствует росту корней арабидопсиса в толще агаризованной среды, т. е. играет прямую роль в механосенсорных реакциях в корнях [103; 105]. У *P. patens* были найдены 2 представителя пьезоканалов (PpPiezo1 и PpPiezo2). Оба белка локализуются в тонопласте и, предположительно, участвуют в регуляции формы вакуолей в апикальных каулонемных клетках [106]. Гипотетически данные каналы могут функционировать как система транспортировки Ca^{2+} , хотя экспериментальные данные, подтверждающие функцию или ионселективность растительных пьезобелков, пока не получены.

Каналы, индуцируемые гиперосмоляльностью (*channels responsible for reduced hyperosmolality-induced* [Ca^{2+}]_{цит} increase, OSCA). Каналы OSCA изначально были идентифицированы как осмосенсоры, опосредующие индуцированное гиперосмоляльностью увеличение цитоплазматической активности Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) у *A. thaliana*. В последующем показано, что данное семейство состоит из нескольких членов и играет ключевую роль в восприятии экзогенных и эндогенных осмотических изменений, а также участвует в регуляции роста и развития растений [63]. Имеется гипотеза, что OSCA эволюционировали у предков эуфиллофитов как сенсоры водного дефицита, необходимые для поддержания водного баланса и переноса питательных элементов между различными органами растений [107]. В последние годы появился ряд биоинформационных исследований семейства генов OSCA: по 11 генов было обнаружено у *Oryza sativa* [65], *Solanum habrochaites* [108] и *Liriodendron chinense* [109], 12 генов выявлены у *Zea mays* [66], 13 генов – у *Vigna radiata* [67], 14 генов – у *Hordeum vulgare* [110], 15 генов – у *A. thaliana* [103; 111], 16 генов – у *Pyrus bretschneideri* [112], 17 генов – у *Populus trichocarpa* [103], 35 генов – у *Gossypium hirsutum* [113] и 42 гена – у *Triticum aestivum* [68]. С помощью криоэлектронной микроскопии проанализирована молекулярная структура белков AtOSCA1.1 и AtOSCA1.2 арабидопсиса. Каждая субъединица состоит из 11 трансмембранных доменов, а также цитозольного домена с мотивом узнавания РНК и параллельных мембране вытянутых спиральных ветвей, способствующих детекции изменения латерального натяжения внутреннего липидного бислоя в результате изменения тургорного давления [103; 110]. При активации канал OSCA меняет конформацию трансмембранных доменов M0 и M6, что приводит к увеличению кросс-секционного участка трансмембранной области и открытию ионного канала [64]. Данные каналы пропускают Ca^{2+} , однако детальный анализ показал, что OSCA1.2 также обладает хорошей проницаемостью для таких катионов, как K^+ и Na^+ [114].

Таким образом, среди проанализированных ионных каналов растительной клетки наиболее вероятными участниками транспорта никеля являются каналы семейства CNGC, так как данные системы демонстрируют способность транспорта Pb^{2+} (ион, по величине атомного и гидратированного радиуса близкий к Ni^{2+}), а также Ca^{2+} и других катионов. С учетом особенностей структуры и экспрессии в клетках и тканях также имеется вероятность вовлечения в транспорт ионов никеля каналов OSCA и GLR, однако для этих систем пока не исследованы особенности переноса большинства физиологически значимых двухвалентных катионов металлов, кроме Ca^{2+} .

Активный транспорт никеля

Активный транспорт переходных металлов в клетку происходит с участием специальных белков-переносчиков [115]. Большинство известных белков, которые опосредуют транспорт переходных металлов в растениях, принадлежат к следующим семействам: АТФазам тяжелых металлов P_{1B} -типа (*P_{1B}-type heavy metal ATPases*, HMA) [116; 117]; АТФ-связывающим кассетным транспортерам (*ATP-binding cassette transporters*, ABC) [118–122]; Zn-регулируемым, Fe-регулируемым белкам-транспортерам (*zinc-regulated, iron-regulated transporter-like proteins*, ZIP) [123; 124]; белкам макрофагов, ассоциированным с естественной резистентностью (*natural resistance-associated macrophage proteins*, NRAMP) [125; 126]; ускорителям катионной диффузии (*cation diffusion facilitators*, CDF) [127]; обменникам катионов (*cation/proton exchangers*, CAХ) [128]; Cu-транспортерам (*high-affinity copper transport proteins*, COPT) [129]. Стоит отметить, что HMA и ABC используют энергию АТФ, следовательно, осуществляют первичный активный транспорт, в то время как ZIP, NRAMP, CDF и CAХ обеспечивают вторичный активный транспорт металлов-микроэлементов.

Семейство HMA. Данное семейство также именуется семейством АТФаз СРх-типа от консервативного мотива аминокислот (цистеин-пролин-Х, в котором Х может быть цистеином или любой другой аминокислотой) [130]. Геном *A. thaliana* содержит 8 генов, кодирующих HMA [131]. Функциональные исследования HMA показали, что эти переносчики делятся на 2 группы в зависимости от их специфичности к металлу-субстрату: HMA, специфичные к Zn, Co, Cd и Pb (HMA1–HMA4), и HMA, специфичные к Cu и Ag (HMA5–HMA8) [116]. Представители данного семейства АТФаз помогают перемещать переходные металлы в органеллы, отвечают за дальний транспорт ионов, а также опосредуют устойчивость к металлам и гипераккумуляцию металлов. На примере Cd^{2+} было показано, что HMA3 используется для детоксикации металлов путем депонирования их в вакуоли, HMA4 действует как главный физиологический

переключатель в процессе гипераккумуляции металлов, а НМА2 и НМА4 участвуют в транспорте металлов от корня к побегу [132]. Кроме того, продемонстрирована роль НМА2 и НМА4 в загрузке Zn^{2+} в ксилему и его выгрузке из ксилемы [131]. Отмечено, что НМА5 является транспортером Cu^{2+} , локализованным в плазматической мембране [133; 134], НМА7 (RAN1) в большом количестве сосредоточен в мембране аппарата Гольджи [135], НМА1 и НМА6 обнаружены во внутренней мембране оболочки хлоропласта, а НМА8 – в тилакоидной мембране [117; 136]. Вероятно, НМА также могут влиять на загрузку Ni^{2+} в ксилему для транслокации данного металла из корней в листья и (или) детоксикации Ni^{2+} в корнях [117; 136].

Семейство ABC. Представители семейства ABC широко распространены среди всех царств живых организмов [118–121]. Как и НМА, они принадлежат к первичным активным переносчикам и состоят из 2 доменов – высокогидрофобного трансмембранного домена (TMD) и периферически расположенного АТФ-связывающего домена, или нуклеотидсвязывающей складки (NBF) [118]. Домены TMD образуют путь, по которому субстрат пересекает мембрану, и в некоторых случаях вносят вклад в субстратную специфичность. Домены NBF ориентированы к цитоплазматической стороне плазматической мембраны, они связывают гидролиз АТФ с транспортом [118]. Семейство ABC делится на 9 подсемейств (от ABCA до ABCI) в соответствии с их структурной организацией и филогенетическими отношениями [119]. В растениях представлены все подсемейства, кроме ABCN [120]. Как правило, транспортеры ABCB и ABCG локализованы в плазматической мембране, ABCC – в тонопласте, ABCD – в пероксисомальной мембране, а ABCI – в митохондриях или хлоропластах [121]. Представители семейства ABC способны транспортировать различные субстраты (гормоны, вторичные метаболиты, тяжелые металлы). В отличие от НМА они переносят металлы и металлоиды не в свободной форме, а в виде комплексов с лигандами, такими как глутатион или фитохелатины [130].

У *A. thaliana* идентифицирован 131 ген ABC [122], для некоторых из них показана связь с метаболизмом тяжелых металлов. Установлена четкая положительная корреляция между обилием транскриптов *AtABC36* и устойчивостью к Pb^{2+} и Cd^{2+} [120]. Гены *AtABCC1*, *AtABCC2*, а также, вероятно, *AtABCC3* и *AtABCC6* способствуют толерантности к Cd^{2+} и Hg^{+} [119]. Проведенное в 2009 г. исследование показало, что последовательность размером 2001 пара нуклеотидов выше кодирующей области *AtMRP3* содержит *цис*-элементы, необходимые для индукции репортерного гена после обработки токсичными металлами. При этом промотор реагирует на As, Cd, Ni, Co, Pb, но не на Zn или Fe [137]. В 2019 г. высказано предположение, что ABCI10 и ABCI12 являются частью ААТ энергосвязывающего модуля хлоропластного ABC/ECF-транспортера, который, скорее всего, имеет прокариотическое происхождение и участвует в поглощении переходных металлов. Потеря продуктов данных генов приводит к нарушению регуляции гомеостаза металлов-микроэлементов и, как следствие, ингибированию биосинтеза хлорофилла, нарушению биогенеза хлоропластов и карликовости [138]. Анализ изменения содержания и транспорта металлов, физиологических и транскриптомных модификаций у риса линии *arg1* (нокаут по гену *ARG1*) показал, что ARG1 модулирует транспорт и гомеостаз Co^{2+} и Ni^{2+} в хлоропластах, предотвращая конкуренцию данных металлов с металлическими кофакторами в металлсвязывающих центрах белков, участвующих в фотосинтезе [139].

Семейство ZIP. Белки ZIP играют ключевую роль в транспорте и гомеостазе металлов в растениях [124; 140]. Они располагаются в плазматической мембране и мембранах различных клеточных органелл, регулируют поглощение и реутилизацию Zn^{2+} , а также активно участвуют в адаптации растений к почвам с низким и высоким содержанием данного металла [123]. Сообщается, что, помимо транспорта Zn^{2+} , белки ZIP участвуют в транспорте других катионов, таких как Mn^{2+} , Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} [140]. Выделяют 2 подсемейства белков ZIP: транспортеры, регулируемые цинком (ZRT), и транспортеры, регулируемые железом (IRT) [140; 141]. У *A. thaliana* идентифицированы 15 генов, кодирующих белки ZIP: гены *ZIP1–ZIP12* принадлежат к подсемейству ZRT, гены *IRT1–IRT3* – к подсемейству IRT [124]. Основными переносчиками, расположенными в клеточной мембране и участвующими в транспорте Zn^{2+} , являются ZIP1, ZIP9, ZIP10, ZIP12 и IRT3 [142]. Установлено, что ZIP1, ZIP2, ZIP5–ZIP7 и ZIP9 потенциально могут транспортировать Mn^{2+} [141]. Подсемейство IRT, в первую очередь IRT1, обеспечивает поглощение Fe^{2+} клетками ризодермы и коры [123]. Двудольные и злаковые однодольные растения поглощают железо с вовлечением переносчика IRT1 после восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} с помощью хелатредуктазы трехвалентного железа (FRO2) в плазматической мембране, злаковые растения секретируют мугеневую кислоту, образующую комплекс мугеневая кислота – железо, который, вероятно, может поглощаться клеткой с помощью YS/YSL-транспортеров, принадлежащих к семейству переносчиков олигопептидов (*oligopeptide transporters*, OPT) [143; 144]. Потенциально железо также может выходить из комплекса с фитосидерофором непосредственно вблизи мембраны

и преодолевать ее с использованием еще неидентифицированного механизма. Переносчик IRT1 обладает широкой специфичностью в отношении двухвалентных тяжелых металлов, опосредуя накопление Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} и Cd^{2+} в условиях дефицита железа [123; 145].

Считается, что IRT1 является основным путем поглощения Ni^{2+} корнями *A. thaliana*, по крайней мере при дефиците Fe^{2+} [146]. Доказано, что в условиях гидропоники $NiCl_2$ в концентрации 25 мкмоль/л повышает экспрессию гена *AtIRT1* в корнях арабидопсиса [147]. Накопление Ni^{2+} в условиях дефицита Fe^{2+} у мутантов *irt1-1* было заметно ниже, чем у природного экотипа Col-0. В системе гетерологичной экспрессии гена *AtIRT1* в дрожжах было продемонстрировано активное поглощение Ni^{2+} транспортером IRT1 [147]. Также следует отметить, что белки ZIP играют значительную роль в гипераккумуляции большого перечня тяжелых металлов у растений-гипераккумуляторов [148; 149].

Семейство NRAMP. Белки семейства NRAMP, изначально обнаруженные у макрофагов, участвуют в метаболизме тяжелых металлов и их депонировании в органеллах [130; 150]. Члены семейства действуют как переносчики Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} [125]. Данные транспортеры осуществляют симпорт ионов тяжелых металлов с H^+ , при этом протонный градиент восстанавливается H^+ -АТФазами [130]. В геноме *A. thaliana* выявлены 6 генов, кодирующих белки NRAMP [124]. Считается, что основная функция NRAMP1 заключается в поглощении Fe^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} [126; 151; 152]. Известно, что NRAMP2 играет важную роль в ремобилизации Mn^{2+} из аппарата Гольджи в условиях дефицита Mn^{2+} [153], а также имеет решающее значение для фотосинтеза растений и клеточного редокс-баланса [154], NRAMP3 и NRAMP4 присутствуют в тонопласте и участвуют в ремобилизации Fe^{2+} и Mn^{2+} из вакуоли во время прорастания семян [155], NRAMP6 описан как белок, способный транспортировать Cd^{2+} [156]. Путем экспрессии генов *AtNRAMP1*, *AtNRAMP3* и *AtNRAMP4* в дрожжах было подтверждено, что кодируемые ими транспортеры могут опосредовать поглощение Fe^{2+} , Mn^{2+} и Cd^{2+} [157]. Экспрессия генов *AtNRAMP4* и *NcNRAMP4*, выделенных из арабидопсиса и псевдометаллофита *Noccaea caerulescens* соответственно, приводила к значительному снижению скорости роста дрожжей при обработке Ni^{2+} (400 мкмоль/л $NiSO_4$, 24 ч) по сравнению со скоростью роста дрожжей, трансформированных пустым вектором *pADSL* [158]. Концентрации Ni^{2+} , Fe^{2+} и Mn^{2+} также были значительно выше у линий, экспрессирующих ген *NRAMP4* [158]. Внедрение в геном дрожжей гена *NjNRAMP4*, идентифицированного в гипераккумуляторе никеля *N. japonica*, стимулировало накопление Ni^{2+} и вызывало повышенную чувствительность к данному металлу, что указывает на важную роль NRAMP4 в поддержании гомеостаза никеля [159]. В трансгенных растениях арабидопсиса, трансформированных вектором *p35S::NcNRAMP4*, было зарегистрировано значительное увеличение концентрации Ni^{2+} в корнях при введении 20 мкмоль/л $NiSO_4$ в среду выращивания, однако накопления Ni^{2+} в листьях не наблюдалось [158]. Таким образом, NRAMP4, вероятно, играет значимую роль в аккумуляции Ni^{2+} и обеспечении толерантности к нему в результате изменения общего гомеостаза металлов, а не специфической транспортной активности по отношению к этому металлу. Недавно было показано, что как при недостатке, так и избытке металлов-микроэлементов подавлялась экспрессия гена *NtNRAMP3* в листьях и в меньшей степени в корнях растений табака [160]. Авторы указанной работы предположили, что основная функция *NtNRAMP3* заключается в поддержании перекрестного гомеостаза Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и Ni^{2+} в листьях в нормальных условиях путем контроля разгрузки данных металлов из корня в ксилему.

Семейство CDF. Белки семейства CDF, которые в литературе также встречаются под названием МТР (*metal tolerance proteins* (белки толерантности к металлам)) [161], переносят двухвалентные тяжелые металлы, такие как Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Cd^{2+} , путем антипорта H^+ или K^+ в вакуоль либо за пределы клеток, тем самым снижая концентрацию тяжелых металлов в цитоплазме [162–164]. У *A. thaliana* идентифицированы 12 генов *CDF* [127]. Белок *AtCDF1* (МТР1) представляет собой вакуолярный переносчик цинка, детоксицирующий Zn^{2+} и обеспечивающий накопление Zn^{2+} в листьях [165; 166]. На растениях риса продемонстрировано, что экспрессия гена *OsMTP1* повышается при воздействии Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} [167]. Гетерологичная сверхэкспрессия гена *OsMTP1* в дрожжах и табаке приводит к повышенной толерантности данных объектов к Cd^{2+} [167; 168]. Таким образом, МТР1 транспортирует Zn^{2+} , а также Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} и Ni^{2+} , но, вероятно, с меньшей степенью аффинности. Другие представители семейства CDF идентифицированы как транспортеры Zn^{2+} и Co^{2+} (МТР3), Mn^{2+} и Cu^{2+} (МТР8 и МТР11) [127]. Ген *AtMTP11* был описан как критически важный для толерантности к Mn^{2+} у *A. thaliana* [127; 169]. Гистохимический анализ с использованием зеленого флуоресцентного белка (GFP) или желтого флуоресцентного белка (YFP), прикрепленного к МТР11, выявил, что данный белок локализуется в вакуоли или гольджи-подобных структурах, обеспечивающих секреторный путь [169], а значит, МТР11 может снижать концентрацию Mn^{2+} в цитоплазме, обеспечивая механизм толерантности к Mn^{2+} и, возможно, другим металлам, включая Ni^{2+} . Следовательно, белки CDF главным образом участвуют в «секвестрации» (связывании, устраниении или изоляции) избытка тяжелых металлов.

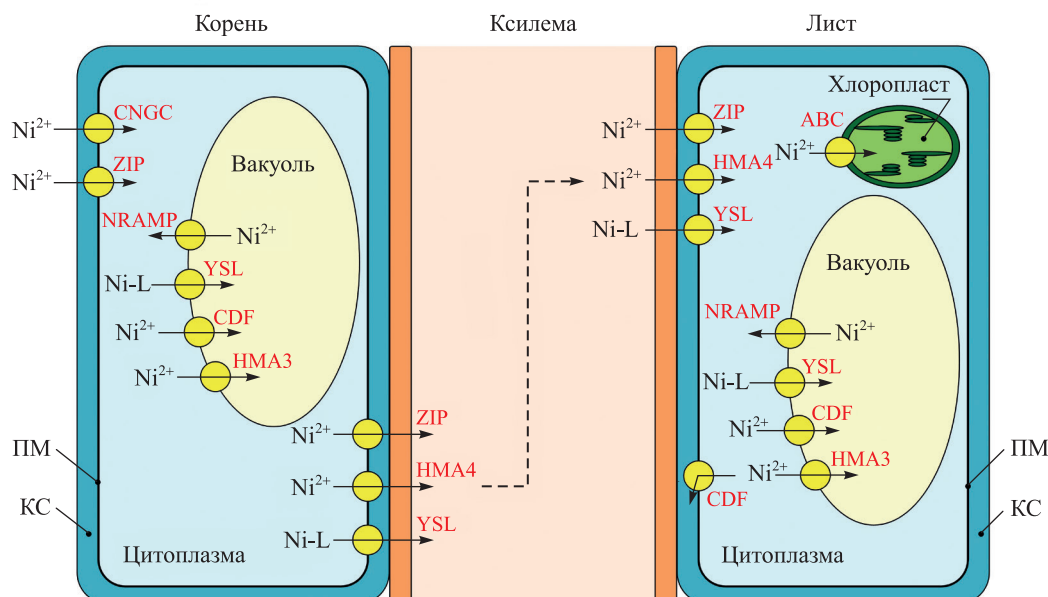
Семейство САХ. Представители семейства САХ в основном осуществляют антипорт катионов и протонов через эндомембраны растительных клеток [130]. У растений САХ относятся к так называемым САХ типа I, которые, в свою очередь, можно разделить на 2 подгруппы: САХ типа I-A и САХ типа I-B [128]. Представители типа I-A преимущественно участвуют в транспорте Ca^{2+} , тогда как представители типа I-B в дополнение к Ca^{2+} могут осуществлять транспорт еще нескольких ионов, таких как Cd^{2+} , Zn^{2+} и Mn^{2+} . В среднем у однодольных и двудольных растений присутствуют 5–6 генов САХ, а некоторые виды, например *Glycine max*, имеют 14 генов САХ [170].

По-видимому, САХ являются ключевым компонентом при модуляции ионного гомеостаза, рН и окислительно-восстановительного потенциала в растительных клетках [171]. В первую очередь САХ транспортируют Ca^{2+} , однако некоторые изоформы обладают широкой субстратной специфичностью и могут транспортировать ионы следовых металлов, такие как Mn^{2+} (САХ2 и САХ5), Cd^{2+} (САХ2–САХ4) и Zn^{2+} (САХ2) [170]. Экспрессия генов САХ, показанная на примере гена *AhCAH1* у гипераккумулятора металлов *Arabidopsis halleri*, вероятно, ослабляет тяжелометаллический стресс [172]. Предположительно, отдельные представители САХ способны уменьшать негативное воздействие АФК, образовавшихся в ответ на повышенные уровни металлов и другие абиотические стресс-факторы. Прогнозирование сети взаимодействия белков выявило несколько белков (SOS2, CXIP1, MNX, NRAM3 и MTP8), которые могут взаимодействовать с САХ и играть важную роль в реакциях растений на стресс [128]. Таким образом, САХ опосредуют гомеостаз металлов, обеспечивая их транспорт внутри клетки, а также участвуют в передаче Ca^{2+} -сигналов.

Семейство СОРТ. Белки семейства СОРТ (в литературе также встречается название СТР) у эукариот ответственны за поступление меди в цитоплазму через плазматическую мембрану и мобилизацию $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ из внутриклеточных органелл в случаях, когда биодоступность металла снижается [173]. Интересно отметить, что белки СОРТ высокоспецифичны ($K_m = 1\text{--}5$ мкмоль/л) для Cu^+ , но не для Cu^{2+} . У *A. thaliana* известны 6 генов данного семейства (*COPT1–COPT6*). Уровень экспрессии генов *COPT* зависит от органов растения, а также от степени дефицита меди. Так, например, было показано, что возрастание уровня транскриптов *AtCOPT1*, *AtCOPT2* и *AtCOPT6* приводило к увеличению содержания меди в корнях арабидопсиса, более того, мутантная линия *copt1/copt2/copt6*, лишенная соответствующих транспортеров, оказалась менее устойчивой к Cd^{2+} по сравнению с природным экотипом [174].

Семейство ОПТ. Как было отмечено выше, семейство ОПТ включает подсемейство YSL-транспортеров (*yellow stripe-like transporters*, т. е. желто-полосато-подобные транспортеры). Белки YSL встречаются у однодольных и двудольных, а также голосеменных растений, папоротников и мхов [175]. Известно, что YSL участвуют в транспорте комплексов металлов с азотсодержащими лигандами и играют важную роль в детоксикации и ремобилизации металлов [176–178]. У *A. thaliana* обнаружены 8 белков-транспортеров, относящихся к подсемейству YSL [179]. В первую очередь отмечено высокое сродство YSL к комплексам металлов с никотином. С использованием соответствующих нокаутных линий было показано, что YSL4 и YSL6, локализованные на мембранах вакуолей, эндоплазматического ретикула и пластид, принимают участие во внутриклеточном транспорте комплексов металлов с никотином [175; 177]. Переносчик YSL1 арабидопсиса транспортирует железо, связанное в комплексы специфическим хелатором Fe^{3+} растительной природы – фитосидерофором, YSL2 транспортирует железо и медь, когда эти металлы хелатируются никотином [180]. Вероятно, YSL1 и YSL3 опосредуют повторную мобилизацию Fe, Zn и Cu в форме комплексов металлов с никотином из стареющих листьев и загрузку этих металлов в соцветия и семена [180]. Имеются данные о роли YSL-транспортеров в гипераккумуляции Zn^{2+} и Ni^{2+} *Noccaea* (= *Thlaspi*) *caerulescens*, в частности, в нее вовлечены гены *TcYSL3*, *TcYSL5* и *TcYSL7*, которые экспрессируются в ксилемной паренхиме и флоэме [181; 182].

Соотношение поглощения тяжелых металлов через пассивные и активные транспортные механизмы сильно различается в зависимости от вида растений, формы присутствия металла и его концентрации в почвенном растворе [183]. Например, Ni^{2+} , вероятно, предпочтительно поглощается через систему неселективных катионных каналов, хелатные соединения ионов никеля попадают в клетки с использованием механизма вторичного активного транспорта, поскольку некоторые транспортные белки (например, пермеазы) специфически связывают никель, в то время как нерастворимые соединения никеля проникают в растительные клетки главным образом путем эндоцитоза [183]. И. В. Серегин и А. Д. Кожевникова в 2006 г. отметили, что механизм поглощения никеля в большой степени зависит от концентрации ионов в окружающей среде. При низком уровне Ni^{2+} (менее 30–40 мкмоль/л) преобладает метаболический (активный) транспорт, а при высоком содержании Ni^{2+} в среде поглощение происходит неметаболическим путем вследствие повреждения под действием Ni^{2+} мембран клеток корня [184]. Схематически транспорт никеля представлен на рисунке.



Поступление и транслокация никеля в высших растениях:

CNGC – каналы, активируемые циклическими нуклеотидами; ZIP – Zn-регулируемые, Fe-регулируемые белки-транспортеры; NRAMP – белки макрофагов, ассоциированные с естественной резистентностью; CDF – ускорители катионной диффузии; YSL – желто-полосато-подобные транспортеры, относящиеся к семейству переносчиков олигопептидов (OPT); HMA – АТФазы тяжелых металлов P_{1B}-типа; ABC – АТФ-связывающие кассетные транспортеры; Ni²⁺ – никель в свободной ионной форме;

Ni-L – никель, хелатированный органическими лигандами;

ПМ – плазматическая мембрана; КС – клеточная стенка

Intake and translocation of nickel in higher plants:

CNGC – cyclic nucleotide-gated channels; ZIP – zinc-regulated, iron-regulated transporter-like proteins;

NRAMP – natural resistance-associated macrophage proteins; CDF – cation diffusion facilitators;

YSL – yellow stripe-like transporters, a subfamily of the oligopeptide transporters (OPT);

HMA – P_{1B}-type heavy metal ATPases; ABC – ATP-binding cassette transporters;

Ni²⁺ – nickel in free ionic form; Ni-L – chelated nickel complexes with organic ligands;

ПМ – plasma membrane; КС – cell wall

Поглощение никеля надземными частями растений и его перераспределение по различным органам растительного организма

Поглощение тяжелых металлов поверхностью листьев происходит через устьица, кутикулярные трещины, чечевички, эктодесмы и водные поры [185]. При этом считается, что адсорбция тяжелых металлов в листьях идет главным образом через эктодесмы, которые представляют собой неплазматические каналы, расположенные в основном между вспомогательными клетками и замыкающими клетками в кутикулярной мембране или эпидермальной клеточной стенке. М. В. Козлов и соавторы показали, что твердые частицы меди и никеля также могут проникать внутрь листьев березы через устьица [186]. Доля внекорневого поступления тяжелых металлов зависит от содержания металла в атмосфере, размера частиц, их физико-химических свойств, а также морфологических и физиологических особенностей видов растений [187]. Способность листьев адсорбировать и поглощать осажденные из атмосферы тяжелые металлы в значительной степени определяется такими параметрами, как площадь листовой пластинки, плотность устьиц, шероховатость поверхности листа, наличие трихом и эпикутикулярных восков [188]. Показано, что ограничивающим фактором также выступает возраст растений: молодые листья лучше поглощают металлы из атмосферы [185].

Принимая во внимание работы, указывающие на определенную роль некорневого поглощения никеля в аккумуляции данного металла растениями, следует отметить, что большая его часть накапливается за счет поступления через корневую систему [185; 189]. Поглощение корнями, загрузка в ксилему, акропетальный транспорт к побегу с транспирационным потоком и дальнейшее перераспределение во флоэме имеют решающее значение для распределения данного металла в надземных частях растений [189]. Ряд исследований подтверждают хорошую подвижность никеля во флоэме и ксилеме растений [146; 189–191]. Загрузка в ксилему, вероятно, осуществляется транспортерами семейств ZIP, HMA и NRAMP [192]. Установлено, что у *Alyssum lesbiacum* и *Brassica juncea* поступление Ni²⁺ в ксилему

происходит без участия апопластического пути и зависит от одновременного высвобождения гистидина из увеличенного пула свободного гистидина корней [193]. Транслокация Ni^{2+} у другого гипераккумулятора – *Lepidium ruderale* – может лимитироваться концентрацией свободного гистидина в корнях, в то время как у *A. thaliana* предварительная обработка L-гистидином не вызывала увеличения загрузки ксилемы Ni^{2+} , концентрации Ni^{2+} в экссудате, корневого давления или общего количества экссудата [17]. Важность взаимодействия с гистидином и значимость симпластического пути для загрузки Ni^{2+} в ксилему были продемонстрированы для пшеницы [194]. После высвобождения в ксилему корня свободные или хелатированные ионы никеля поступают с соком ксилемы вверх. При кислом pH ксилемного сока (pH 5–6) у растений-гипераккумуляторов большая часть Ni^{2+} присутствует в виде гидратированного катиона Ni^{2+} , т. е. гистидин, малат или цитрат (классические хелаторы Ni^{2+}) не играют значительной роли в переносе Ni^{2+} ксилемным соком у таких видов [195; 196].

Кроме того, показано, что некоторые тяжелые металлы, в том числе никель, цинк, кобальт и кадмий, могут перемещаться из ксилемы во флоэму [189]. Это способствует транспорту данных металлов в молодые растущие органы. Также флоэмный ток представляет собой дополнительный механизм контроля содержания тяжелых металлов в формирующихся органах, созревающих плодах и семенах [189]. Транслокация тяжелых металлов во флоэме имеет два направления и включает в себя как нисходящие, так и восходящие потоки [33]. Флоэмный сок обладает слабощелочной реакцией (pH 7–8) и обогащен органическими соединениями (сахара, аминокислоты и органические кислоты) [191]. Щелочная среда способствует связыванию ионов металлов, например Ni^{2+} и Zn^{2+} , в органические комплексы [197]. Во флоэмном соке никель в основном связан с органическими соединениями с молекулярной массой в пределах 1000–5000 г/моль, а также обильно присутствующими карбоновыми кислотами и аминокислотами [33]. В первую очередь лигандами выступают гистидин и никотинамин [191; 198]. Таким образом, наличие комплексообразователей в растительной клетке может иметь значение для удержания в ней никеля (например, транспорт через тонопласт и хранение в вакуоли), его переноса в соседние клетки через плазмодесмы и высвобождения в апопласт для дальнейшей загрузки в ксилему или флоэму.

Заключение

Механизм поступления и транспорта никеля в растениях остается не до конца понятным. Известно, что поглощение Ni^{2+} осуществляется преимущественно корнями и может проходить путем пассивного либо активного транспорта. Пассивный транспорт обеспечивается посредством неселективных катионных каналов, при этом наибольший вклад, вероятно, вносят каналы семейства CNGC, в частности представители групп I и III данного семейства. Активный транспорт происходит с участием специальных белков-переносчиков, в первую очередь белков ZIP. Экспериментально это было показано для белков IRT1. Загрузка в ксилему, вероятно, осуществляется представителями семейств активных транспортеров ZIP, HMA и NRAMP. Кроме того, большое влияние на данный процесс оказывают синтез и концентрация комплексообразователей. В частности, на поступление и транслокацию никеля влияют S-содержащие лиганды (глутатион и фитохелатины), N-содержащие лиганды (производные S-аденозил-L-метионина, гистидина и других аминокислот) и O-содержащие лиганды (фенолы и органические кислоты).

Библиографические ссылки

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *A review of human carcinogens. Part C, Arsenic, metals, fibres, and dusts*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. 501 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; volume 100, part C).
2. Tundermann JH, Tien JK, Howson TE. Nickel and nickel alloys. In: *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. Volume 17* [Internet]. 5th edition. [S. l.]: John Wiley & Sons; 2005 [cited 2023 February 20]. p. 1–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471238961.1409031120211404.a01.pub2>.
3. Kerfoot DGE. Nickel. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Volume 27*. 7th edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2012. p. 37–101. DOI: 10.1002/14356007.a17_157.
4. Ma Y, Hooda PS. Chromium, nickel and cobalt. In: Hooda PS, editor. *Trace elements in soils*. [S. l.]: Blackwell Publishing; 2010. p. 461–479. DOI: 10.1002/9781444319477.ch19.
5. Nightingale ER. Phenomenological theory of ion solvation. Effective radii of hydrated ions. *The Journal of Physical Chemistry*. 1959;63(9):1381–1387. DOI: 10.1021/j150579a011.
6. Барон НМ, Пономарева АМ, Равдель АА, Тимофеева ЗН, составители. *Краткий справочник физико-химических величин*. 10-е издание. Равдель АА, Пономарева АМ, редакторы. Санкт-Петербург: Иван Федоров; 2003. 240 с.
7. Shannon RD. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*. 1976;32(5):751–767. DOI: 10.1107/S0567739476001551.
8. Martelli F, Abadie S, Simonin J-P, Vuilleumier R, Spezia R. Lanthanoids(III) and actinoids(III) in water: diffusion coefficients and hydration enthalpies from polarizable molecular dynamics simulations. *Pure and Applied Chemistry*. 2013;85(1):237–246. DOI: 10.1351/pac-con-12-02-08.

9. Cotton FA, Wilkinson G, Murillo CA, Bochmann M. *Advanced inorganic chemistry*. 6th edition. New York: John Wiley & Sons; 1999. XV, 1355 p.
10. Harasim P, Filipek T. Nickel in the environment. *Journal of Elementology*. 2015;20(2):525–534. DOI: 10.5601/jelem.2014.19.3.651.
11. Cempel M, Nikel G. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2006;15(3):375–382.
12. Yadav N, Sharma S. An account of nickel requirement, toxicity and oxidative stress in plants. *Biological Forum – An International Journal*. 2016;8(1):414–419.
13. Chen Cuiyun, Huang Dejun, Liu Jianquan. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean – Soil, Air, Water*. 2009;37(4–5):304–313. DOI: 10.1002/clen.200800199.
14. 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.
15. Seregin IV, Kozhevnikova AD. Histochemical methods for detection of heavy metals and strontium in the tissues of higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011;58(4):721–727. DOI: 10.1134/s1021443711040133.
16. Seregin IV, Kozhevnikova AD. Low-molecular-weight ligands in plants: role in metal homeostasis and hyperaccumulation. *Photosynthesis Research*. 2021;150(1–3):51–96. DOI: 10.1007/s11120-020-00768-1.
17. Seregin IV, Kozhevnikova AD, Schat H. Histidine-mediated nickel and zinc translocation in *Arabidopsis thaliana* and *Lepidium ruderales*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2022;69(1):13. DOI: 10.1134/S1021443722010186.
18. Seregin IV, Kozhevnikova AD, Schat H. Nickel tolerance and accumulation capacities in different populations of the hyperaccumulator *Noccaea caerulea*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2022;69(4):70. DOI: 10.1134/S1021443722040148.
19. Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011;86(1):1–17. DOI: 10.1007/s00128-010-0171-1.
20. Nie Jing, Pan Yuqiang, Shi Jing, Guo Yan, Yan Zengguang, Duan Xiaoli, et al. A comparative study on the uptake and toxicity of nickel added in the form of different salts to maize seedlings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015;12(12):15075–15087. DOI: 10.3390/ijerph121214972.
21. He S, He Z, Yang X, Baligar VC. Mechanisms of nickel uptake and hyperaccumulation by plants and implications for soil remediation. Sparks DL, editor. *Advances in agronomy. Volume 117*. Amsterdam: Academic Press; 2012. p. 117–189. DOI: 10.1016/b978-0-12-394278-4.00003-9.
22. Antonkiewicz J, Jasiewicz C, Koncewicz-Baran M, Sendor R. Nickel bioaccumulation by the chosen plant species. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016;38(2):40. DOI: 10.1007/s11738-016-2062-5.
23. Krishnamurti GSR, Subashchandrabose SR, Megharaj M, Naidu R. Assessment of bioavailability of heavy metal pollutants using soil isolates of *Chlorella* sp. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013;22(12):8826–8832. DOI: 10.1007/s11356-013-1799-2.
24. Blanco P, Tomé FV, Lozano JC. Sequential extraction for radionuclide fractionation in soil samples: a comparative study. *Applied Radiation and Isotopes*. 2004;61(2–3):345–350. DOI: 10.1016/j.apradiso.2004.03.006.
25. Mortvedt JJ. Plant and soil relationships of uranium and thorium decay series radionuclides – a review. *Journal of Environmental Quality*. 1994;23(4):643–650. DOI: 10.2134/jeq1994.00472425002300040004x.
26. Viehweger K, Geipel G. Uranium accumulation and tolerance in *Arabidopsis halleri* under native versus hydroponic conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 2010;69(1):39–46. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.03.001.
27. Viehweger K. How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*. 2014;55:35. DOI: 10.1186/1999-3110-55-35.
28. Xiang Zhen-Li, Gao Huan-Fang, Yan Huan, Li Ya-Ling, Diao Zhi-Long, Zhang En-Zhi, et al. Study on the treatment of nickel-contaminated soil using calcium oxide. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2020;231(5):188. DOI: 10.1007/s11270-020-04569-z.
29. Robinson BH, Brooks RR, Clothier BE. Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: potential use for phytomining and phytoremediation. *Annals of Botany*. 1999;84(6):689–694. DOI: 10.1006/anbo.1999.0970.
30. Körner LE, Møller LM, Jensen P. Effects of Ca²⁺ and other divalent cations on uptake of Ni²⁺ by excised barley roots. *Physiologia Plantarum*. 1987;71(1):49–54. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04615.x.
31. Jan S, Parray JA. *Approaches to heavy metal tolerance in plants*. Singapore: Springer Science + Business Media; 2016. Chapter 1, Heavy metal uptake in plants; p. 1–18. DOI: 10.1007/978-981-10-1693-6_1.
32. Nagajyothi PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2010;8(3):199–216. DOI: 10.1007/s10311-010-0297-8.
33. Deng T-H-B, van der Ent A, Tang Y-T, Sterckeman T, Echevarria G, Morel J-L, et al. Nickel hyperaccumulation mechanisms: a review on the current state of knowledge. *Plant and Soil*. 2018;423(1–2):1–11. DOI: 10.1007/s11104-017-3539-8.
34. Costa G, Morel JL. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. *Journal of Plant Nutrition*. 1993;16(10):1921–1929. DOI: 10.1080/01904169309364661.
35. Lux A, Martinka M, Vaculik M, White PJ. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*. 2011;62(1):21–37. DOI: 10.1093/jxb/erq281.
36. Казнина НМ, Батова ЮВ, Титов АФ, Лайдинен ГФ. Роль отдельных компонентов антиоксидантной системы в адаптации растений *Elytrigia repens* (L.) Nevski к кадмию. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук. Серия: Экспериментальная биология*. 2016;11:17–26. DOI: 10.17076/eb365.
37. Swarbreck SM, Colaço R, Davies JM. Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiology*. 2013;163(2):514–522. DOI: 10.1104/pp.113.220855.
38. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS-Ca²⁺ Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):9–27. DOI: 10.1071/fp16420.
39. Мацкевич ВС, Самохина ВВ, Гриусевич ПВ, Войтехович МА, Соколик АИ, Демидчик ВВ. Са²⁺-проницаемые катионные каналы плазматической мембраны клеток высших растений. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;2:11–26.
40. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175(3):387–404. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
41. Zelman AK, Dawe A, Gehring C, Berkowitz GA. Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Frontiers in Plant Science*. 2012;3:95. DOI: 10.3389/fpls.2012.00095.

42. Dietrich P, Moeder W, Yoshioka K. Plant cyclic nucleotide-gated channels: new insights on their functions and regulation. *Plant Physiology*. 2020;184(1):27–38. DOI: 10.1104/pp.20.00425.
43. Chin K, Moeder W, Yoshioka K. Biological roles of cyclic-nucleotide-gated ion channels in plants: what we know and don't know about this 20 member ion channel family. *Botany*. 2009;87(7):668–677. DOI: 10.1139/b08-147.
44. Hao Lidong, Qiao Xiuli. Genome-wide identification and analysis of the CNGC gene family in maize. *PeerJ*. 2018;6:e5816. DOI: 10.7717/peerj.5816.
45. Duszyn M, Świeżawska B, Szmidi-Jaworska A, Jaworski K. Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling – current knowledge and perspectives. *Journal of Plant Physiology*. 2019;241:153035. DOI: 10.1016/j.jplph.2019.153035.
46. Lam H-M, Chiu J, Hsieh M-H, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, et al. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*. 1998;396(6707):125–126. DOI: 10.1038/24066.
47. Tapken D, Hollmann M. *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *Journal of Molecular Biology*. 2008;383(1):36–48. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.06.076.
48. Yu Bo, Liu Nian, Tang Siqi, Qin Tian, Huang Junli. Roles of glutamate receptor-like channels (GLRs) in plant growth and response to environmental stimuli. *Plants*. 2022;11(24):3450. DOI: 10.3390/plants11243450.
49. Davenport R. Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany*. 2002;90(5):549–557. DOI: 10.1093/aob/mcf228.
50. Weiland M, Mancuso S, Baluska F. Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*. 2016;43(1):1–25. DOI: 10.1071/FP15109.
51. Alfieri A, Doccula FG, Pederzoli R, Grenzi M, Bonza MC, Luoni L, et al. The structural bases for agonist diversity in an *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor-like channel. *PNAS*. 2019;117(1):752–760. DOI: 10.1073/pnas.1905142117.
52. Delmer DP, Potikha TS. Structures and functions of annexins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1997;53(6):546–553. DOI: 10.1007/s000180050070.
53. Baucher M, Pérez-Morga D, El Jaziri M. Insight into plant annexin function: from shoot to root signaling. *Plant Signaling & Behavior*. 2012;7(4):524–528. DOI: 10.4161/psb.19647.
54. He Xin, Liao Li, Xie Sai, Yao Min, Xie Pan, Liu Wei, et al. Comprehensive analyses of the annexin (*ANN*) gene family in *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* and *Brassica napus* reveals their roles in stress response. *Scientific Reports*. 2020;10:4295. DOI: 10.1038/s41598-020-59953-w.
55. Zhang Zhongbao, Li Xianglong, Han Meng, Wu Zhongyi. Genome-wide analysis and functional identification of the annexin gene family in maize (*Zea mays* L.). *Plant Omics Journal*. 2015;8(5):420–428.
56. Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES. United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2015;66:113–137. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114700.
57. Kaur A, Taneja M, Tyagi S, Sharma A, Singh K, Upadhyay SK. Genome-wide characterization and expression analysis suggested diverse functions of the mechanosensitive channel of small conductance-like (*MSL*) genes in cereal crops. *Scientific Reports*. 2020;10:16583. DOI: 10.1038/s41598-020-73627-7.
58. Haswell ES, Meyerowitz EM. MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 2006;16(1):1–11. DOI: 10.1016/j.cub.2005.11.044.
59. Yoshimura K, Iida K, Iida H. MCAs in *Arabidopsis* are Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels inherently sensitive to membrane tension. *Nature Communications*. 2021;12:6074. DOI: 10.1038/s41467-021-26363-z.
60. Kurusu T, Yamanaka T, Nakano M, Takiguchi A, Ogasawara Y, Hayashi T, et al. Involvement of the putative Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in Ca²⁺ uptake, Ca²⁺-dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *Journal of Plant Research*. 2012;125(4):555–568. DOI: 10.1007/s10265-011-0462-6.
61. Mousavi SAR, Dubin AE, Zeng W-Z, Coombs AM, Do K, Ghadiri DA, et al. Piezo ion channel is required for root mechanotransduction in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*. 2021;118(20):e2102188118. DOI: 10.1073/pnas.2102188118.
62. Fang Xianming, Zhang Yang, Cheng Bo, Luan Sheng, He Kai. Evidence for the involvement of *AtPiezo* in mechanical responses. *Plant Signaling & Behavior*. 2021;16(5):1889252. DOI: 10.1080/15592324.2021.1889252.
63. Yuan Fang, Yang Huimin, Xue Yan, Kong Dongdong, Ye Rui, Li Chijun, et al. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*. 2014;514(7522):367–371. DOI: 10.1038/nature13593.
64. Zhang Mingfeng, Wang Dali, Kang Yunlu, Wu Jing-Xiang, Yao Fuqiang, Pan Chengfang, et al. Structure of the mechanosensitive OSCA channels. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2018;25(9):850–858. DOI: 10.1038/s41594-018-0117-6.
65. Li Yunshuang, Yuan Fang, Wen Zhaozhong, Li Yihao, Wang Fang, Zhu Tao, et al. Genome-wide survey and expression analysis of the *OSCA* gene family in rice. *BMC Plant Biology*. 2015;15:261. DOI: 10.1186/s12870-015-0653-8.
66. Li Yuanyang, Zhang Yubin, Li Bin, Hou Liyuan, Yu Jianing, Jia Chengguo, et al. Preliminary expression analysis of the *OSCA* gene family in maize and their involvement in temperature stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13658. DOI: 10.3390/ijms232113658.
67. Yin Lili, Zhang Meiling, Wu Ruigang, Chen Xiaoliang, Liu Fei, Xing Baolong. Genome-wide analysis of *OSCA* gene family members in *Vigna radiata* and their involvement in the osmotic response. *BMC Plant Biology*. 2021;21:408. DOI: 10.1186/s12870-021-03184-2.
68. Tong Kai, Wu Xinyang, He Long, Qiu Shiyou, Liu Shuang, Cai Linna, et al. Genome-wide identification and expression profile of *OSCA* gene family members in *Triticum aestivum* L. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(1):469. DOI: 10.3390/ijms23010469.
69. Schuurink RC, Shartzter SF, Fath A, Jones RL. Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *PNAS*. 1998;95(4):1944–1949. DOI: 10.1073/pnas.95.4.1944.
70. Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D, Maathuis FJM. *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(4):791–800. DOI: 10.1093/jxb/erj064.
71. DeFalco TA, Marshall CB, Munro K, Kang H-G, Moeder W, Ikura M, et al. Multiple calmodulin-binding sites positively and negatively regulate *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated channel 12. *The Plant Cell*. 2016;28(7):1738–1751. DOI: 10.1105/tpc.15.00870.
72. Tan Yan-Qiu, Yang Yang, Zhang An, Fei Cui-Fang, Gu Li-Li, Sun Shu-Jing, et al. Three CNGC family members, CNGC5, CNGC6, and CNGC9, are required for constitutive growth of *Arabidopsis* root hairs as Ca²⁺-permeable channels. *Plant Communications*. 2020;1(1):100001. DOI: 10.1016/j.xplc.2019.100001.

73. Li Qingqing, Yang Siqiang, Ren Jie, Ye Xueling, Jiang Xin, Liu Zhiyong. Genome-wide identification and functional analysis of the cyclic nucleotide-gated channel gene family in Chinese cabbage. *3 Biotech*. 2019;9(3):114. DOI: 10.1007/s13205-019-1647-2.
74. Moon JY, Belloeil C, Ianna ML, Shin R. *Arabidopsis* CNGC family members contribute to heavy metal ion uptake in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2):413. DOI: 10.3390/ijms20020413.
75. Sunkar R, Kaplan B, Bouché N, Arazi T, Dolev D, Talke IN, et al. Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb²⁺ tolerance. *The Plant Journal*. 2000;24(4):533–542. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2000.00901.x.
76. Nawaz Z, Kakar KU, Ullah R, Yu S, Zhang J, Shu Q-Y, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of cyclic nucleotide-gated channels in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Genomics*. 2019;111(2):142–158. DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.01.010.
77. Kanter U, Hauser A, Michalke B, Dräxl S, Schäffner AR. Caesium and strontium accumulation in shoots of *Arabidopsis thaliana*: genetic and physiological aspects. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61(14):3995–4009. DOI: 10.1093/jxb/erq213.
78. Naz R, Khan A, Alghamdi BS, Ashraf GM, Alghanmi M, Ahmad A, et al. An insight into animal glutamate receptors homolog of *Arabidopsis thaliana* and their potential applications – a review. *Plants*. 2022;11(19):2580. DOI: 10.3390/plants11192580.
79. Chiu JC, Brenner ED, DeSalle R, Nitabach MN, Holmes TC, Coruzzi GM. Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*. 2002;19(7):1066–1082. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004165.
80. Singh A, Kanwar P, Yadav AK, Mishra M, Jha SK, Baranwal V, et al. Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *The FEBS Journal*. 2014;281(3):894–915. DOI: 10.1111/febs.12656.
81. Zhou Sheng-Hui, Zhang Lei, Lü Xin-Ze, Huang Jin-Guang. [Identification and analysis of *GLR* family genes in maize]. *Journal of Maize Sciences*. 2021;29(2):35–42. Chinese. DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20210206.
82. Aouini A, Matsukura C, Ezura H, Asamizu E. Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*. 2012;493(1):36–43. DOI: 10.1016/j.gene.2011.11.037.
83. Zhang Jing, Cui Tianzhen, Su Yachun, Zang Shoujian, Zhao Zhennan, Zhang Chang, et al. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of glutamate receptor-like gene (*GLR*) family in sugarcane. *Plants*. 2022;11(18):2440. DOI: 10.3390/plants11182440.
84. Liu Shiming, Zhang Xiaojun, Xiao Shenghua, Ma Jun, Shi Weijun, Qin Tao, et al. A single-nucleotide mutation in a glutamate receptor-like gene confers resistance to *Fusarium* wilt in *Gossypium hirsutum*. *Advanced Science*. 2021;8(7):2002723. DOI: 10.1002/advs.202002723.
85. Luo Hua, Hu Da-Gang, Zhang Lian-Zhong, Hao Yu-Jin. [Bioinformatics and expression analysis of apple MdGLRs genes family]. *Acta Horticulturae Sinica*. 2012;39(3):425–435. Chinese.
86. Chen Jianqing, Jing Yinghui, Zhang Xinyue, Li Leiting, Wang Peng, Zhang Shaoling, et al. Evolutionary and expression analysis provides evidence for the plant glutamate-like receptors family is involved in woody growth-related function. *Scientific Reports*. 2016;6:32013. DOI: 10.1038/srep32013.
87. Zeng Houqing, Zhao Bingqian, Wu Haicheng, Zhu Yiyong, Chen Huatao. Comprehensive *in silico* characterization and expression profiling of nine gene families associated with calcium transport in soybean. *Agronomy*. 2020;10(10):1539. DOI: 10.3390/agronomy10101539.
88. Ortiz-Ramírez C, Michard E, Simon AA, Damineli DSC, Hernández-Coronado M, Becker JD, et al. Glutamate receptor-like channels are essential for chemotaxis and reproduction in mosses. *Nature*. 2017;549(7670):91–95. DOI: 10.1038/nature23478.
89. Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*. 2009;462(7274):745–756. DOI: 10.1038/nature08624.
90. Dabitz N, Hu N-J, Yusof AM, Tranter N, Winter A, Daley M, et al. Structural determinants for plant annexin – membrane interactions. *Biochemistry*. 2005;44(49):16292–16300. DOI: 10.1021/bi0516226.
91. Wu Xiaoxia, Wang Yan, Bian Yuhao, Ren Yan, Xu Xiaoying, Zhou Fucui, et al. A critical review on plant annexin: structure, function, and mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2022;190:81–89. DOI: 10.1016/j.plaphy.2022.08.019.
92. Zhang Yinan, Sa Gang, Zhang Ying, Hou Siyuan, Wu Xia, Zhao Nan, et al. *Populus euphratica* annexin1 facilitates cadmium enrichment in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Hazardous Materials*. 2021;405:124063. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124063.
93. Mel'gunov VI, Akimova EI, Krasavchenko KS. Effect of divalent metal ions on annexin-mediated aggregation of asolectin liposomes. *Acta Biochimica Polonica*. 2000;47(3):675–683. DOI: 10.18388/abp.2000_3988.
94. Kaur A, Madhu, Upadhyay SK. Mechanosensitive ion channels in plants. In: Upadhyay SK, editor. *Calcium transport elements in plants*. [S. l.]: Academic Press; 2021. p. 267–279. DOI: 10.1016/B978-0-12-821792-4.00005-9.
95. Lee JS, Wilson ME, Richardson RA, Haswell ES. Genetic and physical interactions between the organellar mechanosensitive ion channel homologs MSL1, MSL2, and MSL3 reveal a role for inter-organellar communication in plant development. *Plant Direct*. 2019;3(3):e00124. DOI: 10.1002/pld3.124.
96. Guichard M, Thomine S, Frachisse J-M. Mechanotransduction in the spotlight of mechano-sensitive channels. *Current Opinion in Plant Biology*. 2022;68:102252. DOI: 10.1016/j.pbi.2022.102252.
97. Tran D, Girault T, Guichard M, Thomine S, Leblanc-Fournier N, Moulia B, et al. Cellular transduction of mechanical oscillations in plants by the plasma-membrane mechanosensitive channel MSL10. *PNAS*. 2021;118(1):e1919402118. DOI: 10.1073/pnas.1919402118.
98. Velez KM, Maksaev G, Frick EM, January E, Kloepper SC, Haswell ES. *Arabidopsis* MSL10 has a regulated cell death signaling activity that is separable from its mechanosensitive ion channel activity. *The Plant Cell*. 2014;26(7):3115–3131. DOI: 10.1105/tpc.114.128082.
99. Maksaev G, Haswell ES. Recent characterizations of MscS and its homologs provide insight into the basis of ion selectivity in mechanosensitive channels. *Channels*. 2013;7(3):215–220. DOI: 10.4161/chan.24505.
100. Maksaev G, Haswell ES. MscS-like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *PNAS*. 2012;109(46):19015–19020. DOI: 10.1073/pnas.1213931109.
101. Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*. 2018;220(1):49–69. DOI: 10.1111/nph.15266.

102. Nishii K, Möller M, Iida H. Mix and match: patchwork domain evolution of the land plant-specific Ca²⁺-permeable mechanosensitive channel MCA. *PLoS ONE*. 2021;16(4):e0249735. DOI: 10.1371/journal.pone.0249735.
103. Hartmann FP, Tinturier E, Julien J-L, Leblanc-Fournier N. Between stress and response: function and localization of mechanosensitive Ca²⁺ channels in herbaceous and perennial plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(20):11043. DOI: 10.3390/ijms222011043.
104. Zhang Zhen, Tong Xin, Liu Song-Yu, Chai Long-Xiang, Zhu Fei-Fan, Zhang Xiao-Peng, et al. Genetic analysis of a Piezo-like protein suppressing systemic movement of plant viruses in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*. 2019;9:3187. DOI: 10.1038/s41598-019-39436-3.
105. Fang Xianming, Liu Beibei, Shao Qianshuo, Huang Xuemei, Li Jia, Luan Sheng, et al. AtPiezo plays an important role in root cap mechanotransduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(1):467. DOI: 10.3390/ijms22010467.
106. Radin I, Richardson RA, Haswell ES. Moss Piezo homologs have a conserved structure, are ubiquitously expressed, and do not affect general vacuole function. *Plant Signaling & Behavior*. 2022;17(1):2015893. DOI: 10.1080/15592324.2021.2015893.
107. Wu Xiaomei, Yuan Fang, Wang Xuewen, Zhu Shan, Pei Zhen-Ming. Evolution of osmosensing *OSCA1* Ca²⁺ channel family coincident with plant transition from water to land. *Plant Genome*. 2022;15(2):e20198. DOI: 10.1002/tpg2.20198.
108. Miao Shuang, Li Fengshuo, Han Yang, Yao Zhongtong, Xu Zeqian, Chen Xiuling, et al. Identification of *OSCA* gene family in *Solanum habrochaites* and its function analysis under stress. *BMC Genomics*. 2022;23(1):547. DOI: 10.1186/s12864-022-08675-6.
109. Ke Y, Xu M, Hwarari D, Ahmad B, Li R, Guan Y, et al. *OSCA* genes in *Liriodendron chinense*: characterization, evolution and response to abiotic stress. *Forests*. 2022;13(11):1835. DOI: 10.3390/f13111835.
110. She Kuijun, Pan Wenqiu, Yan Ying, Shi Tingrui, Chu Yingqi, Cheng Yue, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of *OSCA* gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13027. DOI: 10.3390/ijms232113027.
111. Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, et al. *OSCA/TMEM63* are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *eLife*. 2018;7:e41844. DOI: 10.7554/eLife.41844.
112. Gu Xiaoyu, Wang Peng, Liu Zhe, Wang Li, Huang Zhi, Zhang Shaoling, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *OSCA* gene family in *Pyrus bretschneideri*. *Canadian Journal of Plant Science*. 2018;98(4):918–929. DOI: 10.1139/cjps-2017-0115.
113. Yang X, Xu Y, Yang F, Magwanga RO, Cai X, Wang X, et al. Genome-wide identification of *OSCA* gene family and their potential function in the regulation of dehydration and salt stress in *Gossypium hirsutum*. *Journal of Cotton Research*. 2019;2:11. DOI: 10.1186/s42397-019-0028-z.
114. Hou C, Tian W, Kleist T, He K, Garcia V, Bai F, et al. DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Research*. 2014;24(5):632–635. DOI: 10.1038/cr.2014.14.
115. Reid RJ. Mechanisms of micronutrient uptake in plants. *Australian Journal of Plant Biology*. 2001;28(7):661–668. DOI: 10.1071/pp01037.
116. Takahashi R, Bashir K, Ishimaru Y, Nishizawa NK, Nakanishi H. The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. *Plant Signaling & Behavior*. 2012;7(12):1605–1607. DOI: 10.4161/psb.22454.
117. Fan Wei, Liu Changying, Cao Boning, Qin Meiling, Long Dingpei, Xiang Zhonghuai, et al. Genome-wide identification and characterization of four gene families putatively involved in cadmium uptake, translocation and sequestration in mulberry. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:879. DOI: 10.3389/fpls.2018.00879.
118. Theodoulou FL. Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2000;1465(1–2):79–103. DOI: 10.1016/s0005-2736(00)00132-2.
119. Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, et al. Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*. 2011;9:e0153. DOI: 10.1199/tab.0153.
120. Kretzschmar T, Burla B, Lee Y, Martinoia E, Nagy R. Functions of ABC transporters in plants. *Essays in Biochemistry*. 2011;50:145–160. DOI: 10.1042/bse0500145.
121. Pierman B, Boutry M, Lefèvre F. The ABC of ABC transporters. In: Maurel C, editor. *Membrane transport in plants*. [S. l.]: Academic Press; 2018. p. 1–23 (Jacquot J-P, editor. *Advances in botanical research*; volume 87). DOI: 10.1016/bs.abr.2018.09.005.
122. Wang X, Wang C, Sheng H, Wang Y, Zeng J, Kang H, et al. Transcriptome-wide identification and expression analyses of ABC transporters in dwarf polish wheat under metal stresses. *Biologia Plantarum*. 2016;61(2):293–304. DOI: 10.1007/s10535-016-0697-0.
123. Krishna TPA, Maharajan T, Roch GV, Ignacimuthu S, Ceasar SA. Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:662. DOI: 10.3389/fpls.2020.00662.
124. Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2001;126(4):1646–1667. DOI: 10.1104/pp.126.4.1646.
125. Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2006;1763(7):609–620. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.007.
126. Qin L, Han P, Chen L, Walk TC, Li Y, Hu X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *NRAMP* family genes in soybean (*Glycine max* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:1436. DOI: 10.3389/fpls.2017.01436.
127. Ricachenevsky FK, Menguer PK, Sperotto RA, Williams LE, Fett JP. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:144. DOI: 10.3389/fpls.2013.00144.
128. Mao Ke, Yang Jie, Wang Min, Liu Huayu, Guo Xin, Zhao Shuang, et al. Genome-wide analysis of the apple CaCA superfamily reveals that MdCAX proteins are involved in the abiotic stress response as calcium transporters. *BMC Plant Biology*. 2021;21:81. DOI: 10.1186/s12870-021-02866-1.
129. Thakur M, Praveen S, Divte PR, Mitra R, Kumar M, Gupta CK, et al. Metal tolerance in plants: molecular and physicochemical interface determines the «not so heavy effect» of heavy metals. *Chemosphere*. 2022;287(part 1):131957. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131957.
130. Andresen E, Peiter E, Küpper H. Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(5):909–954. DOI: 10.1093/jxb/erx465.
131. Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2004;16(5):1327–1339. DOI: 10.1105/tpc.020487.

132. Chaudhary K, Agarwal S, Khan S. Role of phytochelatin (PCs), metallothioneins (MTs), and heavy metal ATPase (HMA) genes in heavy metal tolerance. In: Prasad R, editor. *Mycoremediation and environmental sustainability. Volume 2*. Cham: Springer; 2018. p. 39–60 (Gupta VK, Tuohy MG, editors. Fungal biology). DOI: 10.1007/978-3-319-77386-5_2.
133. Shin Lung-Jiun, Lo Jing-Chi, Yeh Kuo-Chen. Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiology*. 2012;159(3):1099–1110. DOI: 10.1104/pp.112.195974.
134. Deng F, Yamaji N, Xia J, Ma JF. A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiology*. 2013;163(3):1353–1362. DOI: 10.1104/pp.113.226225.
135. Nikolovski N, Shliha PV, Gatto L, Dupree P, Lilley KS. Label-free protein quantification for plant golgi protein localization and abundance. *Plant Physiology*. 2014;166(2):1033–1043. DOI: 10.1104/pp.114.245589.
136. Mayerhofer H, Sautron E, Rolland N, Catty P, Seigneurin-Berny D, Pebay-Peyroula E, et al. Structural insights into the nucleotide-binding domains of the P_{1B}-type ATPases HMA6 and HMA8 from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0165666. DOI: 10.1371/journal.pone.0165666.
137. Zientara K, Wawrzyńska A, Łukomska J, López-Moya JR, Liszewska F, Assunção AGL, et al. Activity of the *AtMRP3* promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants is increased by cadmium, nickel, arsenic, cobalt and lead but not by zinc and iron. *Journal of Biotechnology*. 2009;139(3):258–263. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.12.001.
138. Voith von Voithenberg L, Park J, Stübe R, Lux C, Lee Y, Philippar K. A novel prokaryote-type ECF/ABC transporter module in chloroplast metal homeostasis. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1264. DOI: 10.3389/fpls.2019.01264.
139. Li Haixiu, Liu Yuan, Qin Huihui, Lin Xuelei, Tang Ding, Wu Zhengjing, et al. A rice chloroplast-localized ABC transporter ARG1 modulates cobalt and nickel homeostasis and contributes to photosynthetic capacity. *New Phytologist*. 2020;228(1):163–178. DOI: 10.1111/nph.16708.
140. Pedas P, Husted S. Zinc transport mediated by barley ZIP proteins are induced by low pH. *Plant Signaling & Behavior*. 2009;4(9):842–845. DOI: 10.4161/psb.4.9.9375.
141. Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian LV. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(1):369–381. DOI: 10.1093/jxb/ers315.
142. Claus J, Bohmann A, Chavarría-Krauser A. Zinc uptake and radial transport in roots of *Arabidopsis thaliana*: a modelling approach to understand accumulation. *Annals of Botany*. 2012;112(2):369–380. DOI: 10.1093/aob/mcs263.
143. Pinto E, Ferreira IMPLVO. Cation transporters/channels in plants: tools for nutrient biofortification. *Journal of Plant Physiology*. 2015;179:64–82. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.02.010.
144. Mani A, Sankaranarayanan K. Heavy metal and mineral element-induced abiotic stress in rice plant. In: Shah F, Khan Z, Iqbal A. *Rice crop: current developments*. London: IntechOpen; 2018. p. 149–179. DOI: 10.5772/intechopen.76080.
145. Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G. Metal sensing by the IRT1 transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition. *Molecular Cell*. 2018;69(6):953–964. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.02.009.
146. Van der Pas L, Ingole RA. Towards an understanding of the molecular basis of nickel hyperaccumulation in plants. *Plants*. 2019;8(1):11. DOI: 10.3390/plants8010011.
147. Nishida S, Tsuzuki C, Kato A, Aisu A, Yoshida J, Mizuno T. AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*. 2011;52(8):1433–1442. DOI: 10.1093/pcp/pcr089.
148. Filatov V, Dowdle J, Smirnov N, Ford-Lloyd B, Newbury HJ, Macnair MR. Comparison of gene expression in segregating families identifies genes and genomic regions involved in a novel adaptation, zinc hyperaccumulation. *Molecular Ecology*. 2006;15(10):3045–3059. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02981.x.
149. Enomoto T, Yoshida J, Mizuno T, Watanabe T, Nishida S. Differences in mineral accumulation and gene expression profiles between two metal hyperaccumulators, *Noccaea japonica* and *Noccaea caerulea* ecotype Ganges, under excess nickel condition. *Plant Signaling & Behavior*. 2021;16(10):1945212. DOI: 10.1080/15592324.2021.1945212.
150. Krämer U, Talke IN, Hanikenne M. Transition metal transport. *FEBS Letters*. 2007;581(12):2263–2272. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.010.
151. Castaings L, Alcon C, Kosuth T, Correia D, Curie C. Manganese triggers phosphorylation-mediated endocytosis of the *Arabidopsis* metal transporter NRAMP1. *The Plant Journal*. 2021;106(5):1328–1337. DOI: 10.1111/tpj.15239.
152. Wang Nanqi, Qiu Wei, Dai Jing, Guo Xiaotong, Lu Qiaofang, Wang Tianqi, et al. AhNRAMP1 enhances manganese and zinc uptake in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:415. DOI: 10.3389/fpls.2019.00415.
153. Gao Huiling, Xie Wenxiang, Yang Changhong, Xu Jingyi, Li Jingjun, Wang Hua, et al. NRAMP2, a trans-Golgi network-localized manganese transporter, is required for *Arabidopsis* root growth under manganese deficiency. *New Phytologist*. 2018;217(1):179–193. DOI: 10.1111/nph.14783.
154. Alejandro S, Cailliatte R, Alcon C, Dirick L, Domergue F, Correia D, et al. Intracellular distribution of manganese by the trans-Golgi network transporter NRAMP2 is critical for photosynthesis and cellular redox homeostasis. *The Plant Cell*. 2017;29(12):3068–3084. DOI: 10.1105/tpc.17.00578.
155. Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal*. 2005;24(23):4041–4051. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600864.
156. Cailliatte R, Lapeyre B, Briat J-F, Mari S, Curie C. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal*. 2009;422(2):217–228. DOI: 10.1042/BJ20090655.
157. Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes. *PNAS*. 2000;97(9):4991–4996. DOI: 10.1073/pnas.97.9.4991.
158. Fasani E, DalCorso G, Zorzi G, Agrimonti C, Fagnoli R, Visioli G, et al. Overexpression of ZNT1 and NRAMP4 from the Ni hyperaccumulator *Noccaea caerulea* population Monte Prinzera in *Arabidopsis thaliana* perturbs Fe, Mn, and Ni accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(21):11896. DOI: 10.3390/ijms222111896.
159. Mizuno T, Usui K, Horie K, Nosaka S, Mizuno N, Obata H. Cloning of three ZIP/NRAMP transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005;43(8):793–801. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.07.006.
160. Kozak K, Papierniak-Wygladala A, Palusińska M, Barabasz A, Antosiewicz DM. Regulation and function of metal uptake transporter NtNRAMP3 in tobacco. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:867967. DOI: 10.3389/fpls.2022.867967.

161. Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*. 2007;8:107. DOI: 10.1186/1471-2164-8-107.
162. Chao Yang, Fu Dax. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):12043–12050. DOI: 10.1074/jbc.M313510200.
163. Репкина НС, Таланова ВВ, Титов АФ. Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов у растений. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук. Серия: Экспериментальная биология*. 2013;3:31–45.
164. Ovečka M, Takáč T. Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnology Advances*. 2014;32(1):73–86. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.011.
165. Arrivault S, Senger T, Krämer U. The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*. 2006;46(5):861–879. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2006.02746.x.
166. Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M. Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(13):8374–8383. DOI: 10.1074/jbc.M707646200.
167. Yuan Lianyu, Yang Songguang, Liu Baoxiu, Zhang Mei, Wu Keqiang. Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1. *Plant Cell Reports*. 2012;31(1):67–79. DOI: 10.1007/s00299-011-1140-9.
168. Das N, Bhattacharya S, Maiti MK. Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco overexpressing rice metal tolerance protein gene *OsMTP1* is promising for phytoremediation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016;105:297–309. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.049.
169. Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pendas P, Husted S, Maathuis FJM, et al. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *PNAS*. 2007;104(20):8532–8537. DOI: 10.1073/pnas.0609507104.
170. Pittman JK, Hirschi KD. CAX-ing a wide net: cation/H⁺ transporters in metal remediation and abiotic stress signalling. *Plant Biology*. 2016;18(5):741–749. DOI: 10.1111/plb.12460.
171. Conn SJ, Gilliham M, Athman A, Schreiber AW, Baumann U, Moller I, et al. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2011;23(1):240–257. DOI: 10.1105/tpc.109.072769.
172. Baliardini C, Meyer C-L, Salis P, Saumitou-Laprade P, Verbruggen N. Cation exchanger1 cosegregates with cadmium tolerance in the metal hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and plays a role in limiting oxidative stress in *Arabidopsis* spp. *Plant Physiology*. 2015;169(1):549–559. DOI: 10.1104/pp.15.01037.
173. Puig S. Function and regulation of the plant COPT family of high-affinity copper transport proteins. *Advances in Botany*. 2014;476917. DOI: 10.1155/2014/476917.
174. Gayomba SR, Watkins JM, Muday GK. Flavonols regulate plant growth and development through regulation of auxin transport and cellular redox status. In: Yoshida K, Cheyner V, Quideau S, editors. *Recent advances in polyphenol research. Volume 5*. [S. l.]: John Wiley & Sons; 2017. p. 143–170. DOI: 10.1002/9781118883303.ch7.
175. Conte SS, Chu HH, Chan-Rodriguez D, Punshon T, Vasques KA, Salt DE, et al. *Arabidopsis thaliana* yellow stripe1-like4 and yellow stripe1-like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:283. DOI: 10.3389/fpls.2013.00283.
176. Verbruggen N, Hermans C, Schat H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*. 2009;181(4):759–776. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x.
177. Divol F, Couch D, Conéjéro G, Roschzttardtz H, Mari S, Curie C. The *Arabidopsis* yellow stripe like4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *The Plant Cell*. 2013;25(3):1040–1055. DOI: 10.1105/tpc.112.107672.
178. Islam MA, Guo J, Peng H, Tian S, Bai X, Zhu H, et al. *TaYSLA*, a yellow stripe-like transporter gene, is required for wheat resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Genes*. 2020;11(12):1452. DOI: 10.3390/genes11121452.
179. Colangelo EP, Guerinot ML. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2006;9(3):322–330. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.03.015.
180. DiDonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Eisley RB, Walker EL. *Arabidopsis* yellow stripe-like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine – metal complexes. *The Plant Journal*. 2004;39(3):403–414. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2004.02128.x.
181. Chen Chyi-Chuann, Chien Wei-Fu, Lin Nai-Chun, Yeh Kuo-Chen. Alternative functions of *Arabidopsis* yellow stripe-like3: from metal translocation to pathogen defense. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e98008. DOI: 10.1371/journal.pone.0098008.
182. Rascio N, Navari-Izzo F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*. 2011;180(2):169–181. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.08.016.
183. Ahmad MSA, Ashraf M. Essential roles and hazardous effects of nickel in plants. In: Whitacre DM, editor. *Reviews of environmental contamination and toxicology. Volume 214*. New York: Springer; 2011. p. 125–167. DOI: 10.1007/978-1-4614-0668-6_6.
184. Seregin IV, Kozhevnikova AD. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2006;53(2):257–277. DOI: 10.1134/s1021443706020178.
185. Shahid M, Dumat C, Khalid S, Schreck E, Xiong T, Niazi NK. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: a comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of Hazardous Materials*. 2017;325:36–58. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.11.063.
186. Kozlov MV, Haukioja E, Bakhtiarov AV, Stroganov DN, Zimina SN. Root versus canopy uptake of heavy metals by birch in an industrially polluted area: contrasting behaviour of nickel and copper. *Environmental Pollution*. 2000;107(3):413–420. DOI: 10.1016/S0269-7491(99)00159-1.
187. Титов АФ, Казнина НМ, Таланова ВВ. *Тяжелые металлы и растения*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН; 2014. 194 с.
188. Ataabadi M, Hoodaji M, Najafi P. Biomonitoring of some heavy metal contaminations from a steel plant by above ground plants tissue. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(20):4127–4132. DOI: 10.5897/AJB10.2452.
189. Page V, Feller U. Heavy metals in crop plants: transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*. 2015;5(3):447–463. DOI: 10.3390/agronomy5030447.
190. Page V, Weisskopf L, Feller U. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytologist*. 2006;171(2):329–341. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01756.x.

191. Deng T-H-B, Chen J-Q, Geng K-R, van der Ent A, Tang Y-T, Wen D, et al. Quantification of nickel and cobalt mobility and accumulation via the phloem in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* (Brassicaceae). *Metallomics*. 2021;13(4):mfab012. DOI: 10.1093/mtomcs/mfab012.
192. Kozhevnikova AD, Seregin IV, Schat H. Accumulation of nickel by excluder *Thlaspi arvense* and hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* upon short-term and long-term exposure. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2020;67(2):303–311. DOI: 10.1134/s1021443720020089.
193. Kerkeb L, Krämer U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*. 2003;131(2):716–724. DOI: 10.1104/pp102.010686.
194. Dalir N, Khoshgoftarmansh AH. Root uptake and translocation of nickel in wheat as affected by histidine. *Journal of Plant Physiology*. 2015;184:8–14. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.05.017.
195. Alves S, Nabais C, Simões Gonçalves MDL, Correia dos Santos MM. Nickel speciation in the xylem sap of the hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* ssp. *lusitanicum* growing on serpentine soils of northeast Portugal. *Journal of Plant Physiology*. 2011;168(15):1715–1722. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.04.004.
196. Centofanti T, Sayers Z, Cabello-Conejo MI, Kidd P, Nishizawa NK, Kakei Y, et al. Xylem exudate composition and root-to-shoot nickel translocation in *Alyssum* species. *Plant and Soil*. 2013;373(1–2):59–75. DOI: 10.1007/s11104-013-1782-1.
197. Harris WR, Sammons RD, Grabiak RC. A speciation model of essential trace metal ions in phloem. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;116:140–150. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.07.011.
198. Мацкевич ВС, Шикер АА, Звонарев СН, Лицкевич КС, Туровец ОА, Смолич ИИ и др. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистидиновых комплексов. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;1:11–19. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-11-19.

References

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *A review of human carcinogens. Part C, Arsenic, metals, fibres, and dusts*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. 501 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; volume 100, part C).
2. Tundermann JH, Tien JK, Howson TE. Nickel and nickel alloys. In: *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. Volume 17* [Internet]. 5th edition. [S. l.]: John Wiley & Sons; 2005 [cited 2023 February 20]. p. 1–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471238961.1409031120211404.a01.pub2>.
3. Kerfoot DGE. Nickel. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Volume 27*. 7th edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2012. p. 37–101. DOI: 10.1002/14356007.a17_157.
4. Ma Y, Hooda PS. Chromium, nickel and cobalt. In: Hooda PS, editor. *Trace elements in soils*. [S. l.]: Blackwell Publishing; 2010. p. 461–479. DOI: 10.1002/9781444319477.ch19.
5. Nightingale ER. Phenomenological theory of ion solvation. Effective radii of hydrated ions. *The Journal of Physical Chemistry*. 1959;63(9):1381–1387. DOI: 10.1021/j150579a011.
6. Baron NM, Ponomareva AM, Ravdel' AA, Timofeeva ZN, compilers. *Kratkii spravochnik fiziko-khimicheskikh velichin* [Brief reference book of physical and chemical quantities]. 10th edition. Ravdel' AA, Ponomareva AM, editors. Saint Petersburg: Ivan Fedorov; 2003. 240 p. Russian.
7. Shannon RD. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*. 1976;32(5):751–767. DOI: 10.1107/S0567739476001551.
8. Martelli F, Abadie S, Simonin J-P, Vuilleumier R, Spezia R. Lanthanoids(III) and actinoids(III) in water: diffusion coefficients and hydration enthalpies from polarizable molecular dynamics simulations. *Pure and Applied Chemistry*. 2013;85(1):237–246. DOI: 10.1351/pac-con-12-02-08.
9. Cotton FA, Wilkinson G, Murillo CA, Bochmann M. *Advanced inorganic chemistry*. 6th edition. New York: John Wiley & Sons; 1999. XV, 1355 p.
10. Harasim P, Filipek T. Nickel in the environment. *Journal of Elementology*. 2015;20(2):525–534. DOI: 10.5601/jelem.2014.19.3.651.
11. Cempel M, Nikel G. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2006;15(3):375–382.
12. Yadav N, Sharma S. An account of nickel requirement, toxicity and oxidative stress in plants. *Biological Forum – An International Journal*. 2016;8(1):414–419.
13. Chen Cuiyun, Huang Dejun, Liu Jianquan. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean – Soil, Air, Water*. 2009;37(4–5):304–313. DOI: 10.1002/clen.200800199.
14. 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.
15. Seregin IV, Kozhevnikova AD. Histochemical methods for detection of heavy metals and strontium in the tissues of higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011;58(4):721–727. DOI: 10.1134/s1021443711040133.
16. Seregin IV, Kozhevnikova AD. Low-molecular-weight ligands in plants: role in metal homeostasis and hyperaccumulation. *Photosynthesis Research*. 2021;150(1–3):51–96. DOI: 10.1007/s11120-020-00768-1.
17. Seregin IV, Kozhevnikova AD, Schat H. Histidine-mediated nickel and zinc translocation in *Arabidopsis thaliana* and *Lepidium ruderale*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2022;69(1):13. DOI: 10.1134/S1021443722010186.
18. Seregin IV, Kozhevnikova AD, Schat H. Nickel tolerance and accumulation capacities in different populations of the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2022;69(4):70. DOI: 10.1134/S1021443722040148.
19. Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011;86(1):1–17. DOI: 10.1007/s00128-010-0171-1.
20. Nie Jing, Pan Yuqiang, Shi Jing, Guo Yan, Yan Zengguang, Duan Xiaoli, et al. A comparative study on the uptake and toxicity of nickel added in the form of different salts to maize seedlings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015;12(12):15075–15087. DOI: 10.3390/ijerph121214972.

21. He S, He Z, Yang X, Baligar VC. Mechanisms of nickel uptake and hyperaccumulation by plants and implications for soil remediation. Sparks DL, editor. *Advances in agronomy*. Volume 117. Amsterdam: Academic Press; 2012. p. 117–189. DOI: 10.1016/b978-0-12-394278-4.00003-9.
22. Antonkiewicz J, Jasiewicz C, Koncewicz-Baran M, Sendor R. Nickel bioaccumulation by the chosen plant species. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016;38(2):40. DOI: 10.1007/s11738-016-2062-5.
23. Krishnamurti GSR, Subashchandrabose SR, Megharaj M, Naidu R. Assessment of bioavailability of heavy metal pollutants using soil isolates of *Chlorella* sp. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013;22(12):8826–8832. DOI: 10.1007/s11356-013-1799-2.
24. Blanco P, Tomé FV, Lozano JC. Sequential extraction for radionuclide fractionation in soil samples: a comparative study. *Applied Radiation and Isotopes*. 2004;61(2–3):345–350. DOI: 10.1016/j.apradiso.2004.03.006.
25. Mortvedt JJ. Plant and soil relationships of uranium and thorium decay series radionuclides – a review. *Journal of Environmental Quality*. 1994;23(4):643–650. DOI: 10.2134/jeq1994.00472425002300040004x.
26. Viehweger K, Geipel G. Uranium accumulation and tolerance in *Arabidopsis halleri* under native versus hydroponic conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 2010;69(1):39–46. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.03.001.
27. Viehweger K. How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*. 2014;55:35. DOI: 10.1186/1999-3110-55-35.
28. Xiang Zhen-Li, Gao Huan-Fang, Yan Huan, Li Ya-Ling, Diao Zhi-Long, Zhang En-Zhi, et al. Study on the treatment of nickel-contaminated soil using calcium oxide. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2020;231(5):188. DOI: 10.1007/s11270-020-04569-z.
29. Robinson BH, Brooks RR, Clothier BE. Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: potential use for phytomining and phytoremediation. *Annals of Botany*. 1999;84(6):689–694. DOI: 10.1006/anbo.1999.0970.
30. Körner LE, Möller LM, Jensén P. Effects of Ca²⁺ and other divalent cations on uptake of Ni²⁺ by excised barley roots. *Physiologia Plantarum*. 1987;71(1):49–54. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04615.x.
31. Jan S, Parray JA. *Approaches to heavy metal tolerance in plants*. Singapore: Springer Science + Business Media; 2016. Chapter 1, Heavy metal uptake in plants; p. 1–18. DOI: 10.1007/978-981-10-1693-6_1.
32. Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2010;8(3):199–216. DOI: 10.1007/s10311-010-0297-8.
33. Deng T-H-B, van der Ent A, Tang Y-T, Sterckeman T, Echevarria G, Morel J-L, et al. Nickel hyperaccumulation mechanisms: a review on the current state of knowledge. *Plant and Soil*. 2018;423(1–2):1–11. DOI: 10.1007/s11104-017-3539-8.
34. Costa G, Morel JL. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. *Journal of Plant Nutrition*. 1993;16(10):1921–1929. DOI: 10.1080/01904169309364661.
35. Lux A, Martinka M, Vaculik M, White PJ. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*. 2011;62(1):21–37. DOI: 10.1093/jxb/erq281.
36. Kaznina NM, Batova YuV, Titov AF, Laidinen GF. Role of antioxidant system components in adaptation of *Elytrigia repens* (L.) Nevski to cadmium. *Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. Experimental Biology Series*. 2016;11:17–26. Russian. DOI: 10.17076/eb365.
37. Swarbreck SM, Colaço R, Davies JM. Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiology*. 2013;163(2):514–522. DOI: 10.1104/pp.113.220855.
38. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS-Ca²⁺ Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):9–27. DOI: 10.1071/fp16420.
39. Mackievic VS, Samokhina VV, Hryvusevich PV, Vaitiakhovich MA, Sokolik AI, Demidchik VV. Ca²⁺-permeable cation channels of the plasma membrane of higher plant cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:11–26. Russian.
40. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175(3):387–404. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
41. Zelman AK, Dawe A, Gehring C, Berkowitz GA. Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Frontiers in Plant Science*. 2012;3:95. DOI: 10.3389/fpls.2012.00095.
42. Dietrich P, Moeder W, Yoshioka K. Plant cyclic nucleotide-gated channels: new insights on their functions and regulation. *Plant Physiology*. 2020;184(1):27–38. DOI: 10.1104/pp.20.00425.
43. Chin K, Moeder W, Yoshioka K. Biological roles of cyclic-nucleotide-gated ion channels in plants: what we know and don't know about this 20 member ion channel family. *Botany*. 2009;87(7):668–677. DOI: 10.1139/b08-147.
44. Hao Lidong, Qiao Xiuli. Genome-wide identification and analysis of the *CNGC* gene family in maize. *PeerJ*. 2018;6:e5816. DOI: 10.7717/peerj.5816.
45. Duszyn M, Świeżawska B, Szmidt-Jaworska A, Jaworski K. Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling – current knowledge and perspectives. *Journal of Plant Physiology*. 2019;241:153035. DOI: 10.1016/j.jplph.2019.153035.
46. Lam H-M, Chiu J, Hsieh M-H, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, et al. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*. 1998;396(6707):125–126. DOI: 10.1038/24066.
47. Tapken D, Hollmann M. *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *Journal of Molecular Biology*. 2008;383(1):36–48. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.06.076.
48. Yu Bo, Liu Nian, Tang Siqi, Qin Tian, Huang Junli. Roles of glutamate receptor-like channels (GLRs) in plant growth and response to environmental stimuli. *Plants*. 2022;11(24):3450. DOI: 10.3390/plants11243450.
49. Davenport R. Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany*. 2002;90(5):549–557. DOI: 10.1093/aob/mcf228.
50. Weiland M, Mancuso S, Baluska F. Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*. 2016;43(1):1–25. DOI: 10.1071/FP15109.
51. Alfieri A, Doccula FG, Pederzoli R, Grenzi M, Bonza MC, Luoni L, et al. The structural bases for agonist diversity in an *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor-like channel. *PNAS*. 2019;117(1):752–760. DOI: 10.1073/pnas.1905142117.
52. Delmer DP, Potikha TS. Structures and functions of annexins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1997;53(6):546–553. DOI: 10.1007/s000180050070.
53. Baucher M, Pérez-Morga D, El Jaziri M. Insight into plant annexin function: from shoot to root signaling. *Plant Signaling & Behavior*. 2012;7(4):524–528. DOI: 10.4161/psb.19647.
54. He Xin, Liao Li, Xie Sai, Yao Min, Xie Pan, Liu Wei, et al. Comprehensive analyses of the annexin (*ANN*) gene family in *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* and *Brassica napus* reveals their roles in stress response. *Scientific Reports*. 2020;10:4295. DOI: 10.1038/s41598-020-59953-w.

55. Zhang Zhongbao, Li Xianglong, Han Meng, Wu Zhongyi. Genome-wide analysis and functional identification of the annexin gene family in maize (*Zea mays* L.). *Plant Omics Journal*. 2015;8(5):420–428.
56. Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES. United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2015;66:113–137. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114700.
57. Kaur A, Taneja M, Tyagi S, Sharma A, Singh K, Upadhyay SK. Genome-wide characterization and expression analysis suggested diverse functions of the mechanosensitive channel of small conductance-like (*MSL*) genes in cereal crops. *Scientific Reports*. 2020;10:16583. DOI: 10.1038/s41598-020-73627-7.
58. Haswell ES, Meyerowitz EM. MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 2006;16(1):1–11. DOI: 10.1016/j.cub.2005.11.044.
59. Yoshimura K, Iida K, Iida H. MCAs in *Arabidopsis* are Ca^{2+} -permeable mechanosensitive channels inherently sensitive to membrane tension. *Nature Communications*. 2021;12:6074. DOI: 10.1038/s41467-021-26363-z.
60. Kurusu T, Yamanaka T, Nakano M, Takiguchi A, Ogasawara Y, Hayashi T, et al. Involvement of the putative Ca^{2+} -permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in Ca^{2+} uptake, Ca^{2+} -dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *Journal of Plant Research*. 2012;125(4):555–568. DOI: 10.1007/s10265-011-0462-6.
61. Mousavi SAR, Dubin AE, Zeng W-Z, Coombs AM, Do K, Ghadiri DA, et al. Piezo ion channel is required for root mechanotransduction in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*. 2021;118(20):e2102188118. DOI: 10.1073/pnas.2102188118.
62. Fang Xianming, Zhang Yang, Cheng Bo, Luan Sheng, He Kai. Evidence for the involvement of *AtPiezo* in mechanical responses. *Plant Signaling & Behavior*. 2021;16(5):1889252. DOI: 10.1080/15592324.2021.1889252.
63. Yuan Fang, Yang Huimin, Xue Yan, Kong Dongdong, Ye Rui, Li Chijun, et al. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*. 2014;514(7522):367–371. DOI: 10.1038/nature13593.
64. Zhang Mingfeng, Wang Dali, Kang Yunlu, Wu Jing-Xiang, Yao Fuqiang, Pan Chengfang, et al. Structure of the mechanosensitive OSCA channels. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2018;25(9):850–858. DOI: 10.1038/s41594-018-0117-6.
65. Li Yunshuang, Yuan Fang, Wen Zhaohong, Li Yihao, Wang Fang, Zhu Tao, et al. Genome-wide survey and expression analysis of the *OSCA* gene family in rice. *BMC Plant Biology*. 2015;15:261. DOI: 10.1186/s12870-015-0653-8.
66. Li Yuanyang, Zhang Yubin, Li Bin, Hou Liyuan, Yu Jianing, Jia Chengguo, et al. Preliminary expression analysis of the *OSCA* gene family in maize and their involvement in temperature stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13658. DOI: 10.3390/ijms232113658.
67. Yin Lili, Zhang Meiling, Wu Ruigang, Chen Xiaoliang, Liu Fei, Xing Baolong. Genome-wide analysis of *OSCA* gene family members in *Vigna radiata* and their involvement in the osmotic response. *BMC Plant Biology*. 2021;21:408. DOI: 10.1186/s12870-021-03184-2.
68. Tong Kai, Wu Xinyang, He Long, Qiu Shiyong, Liu Shuang, Cai Linna, et al. Genome-wide identification and expression profile of *OSCA* gene family members in *Triticum aestivum* L. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(1):469. DOI: 10.3390/ijms23010469.
69. Schuurink RC, Shartzler SF, Fath A, Jones RL. Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *PNAS*. 1998;95(4):1944–1949. DOI: 10.1073/pnas.95.4.1944.
70. Gobert A, Park G, Amtmann A, Sanders D, Maathuis FJM. *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57(4):791–800. DOI: 10.1093/jxb/erj064.
71. DeFalco TA, Marshall CB, Munro K, Kang H-G, Moeder W, Ikura M, et al. Multiple calmodulin-binding sites positively and negatively regulate *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated channel 12. *The Plant Cell*. 2016;28(7):1738–1751. DOI: 10.1105/tpc.15.00870.
72. Tan Yan-Qiu, Yang Yang, Zhang An, Fei Cui-Fang, Gu Li-Li, Sun Shu-Jing, et al. Three CNGC family members, CNGC5, CNGC6, and CNGC9, are required for constitutive growth of *Arabidopsis* root hairs as Ca^{2+} -permeable channels. *Plant Communications*. 2020;1(1):100001. DOI: 10.1016/j.xplc.2019.100001.
73. Li Qingqing, Yang Siqiang, Ren Jie, Ye Xueling, Jiang Xin, Liu Zhiyong. Genome-wide identification and functional analysis of the cyclic nucleotide-gated channel gene family in Chinese cabbage. *3 Biotech*. 2019;9(3):114. DOI: 10.1007/s13205-019-1647-2.
74. Moon JY, Belloeil C, Ianna ML, Shin R. *Arabidopsis* CNGC family members contribute to heavy metal ion uptake in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2):413. DOI: 10.3390/ijms20020413.
75. Sunkar R, Kaplan B, Bouché N, Arazi T, Dolev D, Talke IN, et al. Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* *CNGC1* gene confer Pb^{2+} tolerance. *The Plant Journal*. 2000;24(4):533–542. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2000.00901.x.
76. Nawaz Z, Kakar KU, Ullah R, Yu S, Zhang J, Shu Q-Y, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of cyclic nucleotide-gated channels in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Genomics*. 2019;111(2):142–158. DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.01.010.
77. Kanter U, Hauser A, Michalke B, Dräxl S, Schäffner AR. Caesium and strontium accumulation in shoots of *Arabidopsis thaliana*: genetic and physiological aspects. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61(14):3995–4009. DOI: 10.1093/jxb/erq213.
78. Naz R, Khan A, Alghamdi BS, Ashraf GM, Alghanmi M, Ahmad A, et al. An insight into animal glutamate receptors homolog of *Arabidopsis thaliana* and their potential applications – a review. *Plants*. 2022;11(19):2580. DOI: 10.3390/plants11192580.
79. Chiu JC, Brenner ED, DeSalle R, Nitabach MN, Holmes TC, Coruzzi GM. Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*. 2002;19(7):1066–1082. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004165.
80. Singh A, Kanwar P, Yadav AK, Mishra M, Jha SK, Baranwal V, et al. Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *The FEBS Journal*. 2014;281(3):894–915. DOI: 10.1111/febs.12656.
81. Zhou Sheng-Hui, Zhang Lei, Lü Xin-Ze, Huang Jin-Guang. [Identification and analysis of *GLR* family genes in maize]. *Journal of Maize Sciences*. 2021;29(2):35–42. Chinese. DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20210206.
82. Aouini A, Matsukura C, Ezura H, Asamizu E. Characterisation of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure, phylogeny and expression profiles. *Gene*. 2012;493(1):36–43. DOI: 10.1016/j.gene.2011.11.037.
83. Zhang Jing, Cui Tianzhen, Su Yachun, Zang Shoujian, Zhao Zhennan, Zhang Chang, et al. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of glutamate receptor-like gene (*GLR*) family in sugarcane. *Plants*. 2022;11(18):2440. DOI: 10.3390/plants11182440.

84. Liu Shiming, Zhang Xiaojun, Xiao Shenghua, Ma Jun, Shi Weijun, Qin Tao, et al. A single-nucleotide mutation in a glutamate receptor-like gene confers resistance to *Fusarium* wilt in *Gossypium hirsutum*. *Advanced Science*. 2021;8(7):2002723. DOI: 10.1002/advs.202002723.
85. Luo Hua, Hu Da-Gang, Zhang Lian-Zhong, Hao Yu-Jin. [Bioinformatics and expression analysis of apple MdGLRs genes family]. *Acta Horticulturae Sinica*. 2012;39(3):425–435. Chinese.
86. Chen Jianqing, Jing Yinghui, Zhang Xinyue, Li Leiting, Wang Peng, Zhang Shaoling, et al. Evolutionary and expression analysis provides evidence for the plant glutamate-like receptors family is involved in woody growth-related function. *Scientific Reports*. 2016;6:32013. DOI: 10.1038/srep32013.
87. Zeng Houqing, Zhao Bingqian, Wu Haicheng, Zhu Yiyong, Chen Huatao. Comprehensive *in silico* characterization and expression profiling of nine gene families associated with calcium transport in soybean. *Agronomy*. 2020;10(10):1539. DOI: 10.3390/agronomy10101539.
88. Ortiz-Ramírez C, Michard E, Simon AA, Damineli DSC, Hernández-Coronado M, Becker JD, et al. Glutamate receptor-like channels are essential for chemotaxis and reproduction in mosses. *Nature*. 2017;549(7670):91–95. DOI: 10.1038/nature23478.
89. Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*. 2009;462(7274):745–756. DOI: 10.1038/nature08624.
90. Dabitz N, Hu N-J, Yusof AM, Tranter N, Winter A, Daley M, et al. Structural determinants for plant annexin – membrane interactions. *Biochemistry*. 2005;44(49):16292–16300. DOI: 10.1021/bi0516226.
91. Wu Xiaoxia, Wang Yan, Bian Yuhao, Ren Yan, Xu Xiaoying, Zhou Fucai, et al. A critical review on plant annexin: structure, function, and mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2022;190:81–89. DOI: 10.1016/j.plaphy.2022.08.019.
92. Zhang Yinan, Sa Gang, Zhang Ying, Hou Siyuan, Wu Xia, Zhao Nan, et al. *Populus euphratica* annexin1 facilitates cadmium enrichment in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Hazardous Materials*. 2021;405:124063. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124063.
93. Mel'gunov VI, Akimova EI, Krasavchenko KS. Effect of divalent metal ions on annexin-mediated aggregation of asolectin liposomes. *Acta Biochimica Polonica*. 2000;47(3):675–683. DOI: 10.18388/abp.2000_3988.
94. Kaur A, Madhu, Upadhyay SK. Mechanosensitive ion channels in plants. In: Upadhyay SK, editor. *Calcium transport elements in plants*. [S. l.]: Academic Press; 2021. p. 267–279. DOI: 10.1016/B978-0-12-821792-4.00005-9.
95. Lee JS, Wilson ME, Richardson RA, Haswell ES. Genetic and physical interactions between the organellar mechanosensitive ion channel homologs MSL1, MSL2, and MSL3 reveal a role for inter-organellar communication in plant development. *Plant Direct*. 2019;3(3):e00124. DOI: 10.1002/pld3.124.
96. Guichard M, Thomine S, Frachisse J-M. Mechanotransduction in the spotlight of mechano-sensitive channels. *Current Opinion in Plant Biology*. 2022;68:102252. DOI: 10.1016/j.pbi.2022.102252.
97. Tran D, Girault T, Guichard M, Thomine S, Leblanc-Fournier N, Moulia B, et al. Cellular transduction of mechanical oscillations in plants by the plasma-membrane mechanosensitive channel MSL10. *PNAS*. 2021;118(1):e1919402118. DOI: 10.1073/pnas.1919402118.
98. Veley KM, Maksaev G, Frick EM, January E, Kloepper SC, Haswell ES. *Arabidopsis* MSL10 has a regulated cell death signaling activity that is separable from its mechanosensitive ion channel activity. *The Plant Cell*. 2014;26(7):3115–3131. DOI: 10.1105/tpc.114.128082.
99. Maksaev G, Haswell ES. Recent characterizations of MscS and its homologs provide insight into the basis of ion selectivity in mechanosensitive channels. *Channels*. 2013;7(3):215–220. DOI: 10.4161/chan.24505.
100. Maksaev G, Haswell ES. MscS-like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *PNAS*. 2012;109(46):19015–19020. DOI: 10.1073/pnas.1213931109.
101. Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*. 2018;220(1):49–69. DOI: 10.1111/nph.15266.
102. Nishii K, Möller M, Iida H. Mix and match: patchwork domain evolution of the land plant-specific Ca²⁺-permeable mechanosensitive channel MCA. *PLoS ONE*. 2021;16(4):e0249735. DOI: 10.1371/journal.pone.0249735.
103. Hartmann FP, Tinturier E, Julien J-L, Leblanc-Fournier N. Between stress and response: function and localization of mechanosensitive Ca²⁺ channels in herbaceous and perennial plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(20):11043. DOI: 10.3390/ijms222011043.
104. Zhang Zhen, Tong Xin, Liu Song-Yu, Chai Long-Xiang, Zhu Fei-Fan, Zhang Xiao-Peng, et al. Genetic analysis of a Piezo-like protein suppressing systemic movement of plant viruses in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*. 2019;9:3187. DOI: 10.1038/s41598-019-39436-3.
105. Fang Xianming, Liu Beibei, Shao Qianshuo, Huang Xuemei, Li Jia, Luan Sheng, et al. AtPiezo plays an important role in root cap mechanotransduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(1):467. DOI: 10.3390/ijms22010467.
106. Radin I, Richardson RA, Haswell ES. Moss Piezo homologs have a conserved structure, are ubiquitously expressed, and do not affect general vacuole function. *Plant Signaling & Behavior*. 2022;17(1):2015893. DOI: 10.1080/15592324.2021.2015893.
107. Wu Xiaomei, Yuan Fang, Wang Xuewen, Zhu Shan, Pei Zhen-Ming. Evolution of osmosensing *OSCA1* Ca²⁺ channel family coincident with plant transition from water to land. *Plant Genome*. 2022;15(2):e20198. DOI: 10.1002/tpg2.20198.
108. Miao Shuang, Li Fengshuo, Han Yang, Yao Zhongtong, Xu Zeqian, Chen Xiuling, et al. Identification of *OSCA* gene family in *Solanum habrochaites* and its function analysis under stress. *BMC Genomics*. 2022;23(1):547. DOI: 10.1186/s12864-022-08675-6.
109. Ke Y, Xu M, Hwarari D, Ahmad B, Li R, Guan Y, et al. *OSCA* genes in *Liriodendron chinense*: characterization, evolution and response to abiotic stress. *Forests*. 2022;13(11):1835. DOI: 10.3390/f13111835.
110. She Kuijun, Pan Wenqiu, Yan Ying, Shi Tingrui, Chu Yingqi, Cheng Yue, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of *OSCA* gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13027. DOI: 10.3390/ijms232113027.
111. Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, et al. *OSCA/TMEM63* are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *eLife*. 2018;7:e41844. DOI: 10.7554/eLife.41844.
112. Gu Xiaoyu, Wang Peng, Liu Zhe, Wang Li, Huang Zhi, Zhang Shaoling, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *OSCA* gene family in *Pyrus bretschneideri*. *Canadian Journal of Plant Science*. 2018;98(4):918–929. DOI: 10.1139/cjps-2017-0115.

113. Yang X, Xu Y, Yang F, Magwanga RO, Cai X, Wang X, et al. Genome-wide identification of *OSCA* gene family and their potential function in the regulation of dehydration and salt stress in *Gossypium hirsutum*. *Journal of Cotton Research*. 2019;2:11. DOI: 10.1186/s42397-019-0028-z.
114. Hou C, Tian W, Kleist T, He K, Garcia V, Bai F, et al. DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Research*. 2014;24(5):632–635. DOI: 10.1038/cr.2014.14.
115. Reid RJ. Mechanisms of micronutrient uptake in plants. *Australian Journal of Plant Biology*. 2001;28(7):661–668. DOI: 10.1071/pp01037.
116. Takahashi R, Bashir K, Ishimaru Y, Nishizawa NK, Nakanishi H. The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. *Plant Signaling & Behavior*. 2012;7(12):1605–1607. DOI: 10.4161/psb.22454.
117. Fan Wei, Liu Changying, Cao Boning, Qin Meiling, Long Dingpei, Xiang Zhonghuai, et al. Genome-wide identification and characterization of four gene families putatively involved in cadmium uptake, translocation and sequestration in mulberry. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:879. DOI: 10.3389/fpls.2018.00879.
118. Theodoulou FL. Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2000;1465(1–2):79–103. DOI: 10.1016/s0005-2736(00)00132-2.
119. Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, et al. Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*. 2011;9:e0153. DOI: 10.1199/tab.0153.
120. Kretzschmar T, Burla B, Lee Y, Martinoia E, Nagy R. Functions of ABC transporters in plants. *Essays in Biochemistry*. 2011;50:145–160. DOI: 10.1042/bse0500145.
121. Pierman B, Boutry M, Lefèvre F. The ABC of ABC transporters. In: Maurel C, editor. *Membrane transport in plants*. [S. l.]: Academic Press; 2018. p. 1–23 (Jacquot J-P, editor. Advances in botanical research; volume 87). DOI: 10.1016/bs.abr.2018.09.005.
122. Wang X, Wang C, Sheng H, Wang Y, Zeng J, Kang H, et al. Transcriptome-wide identification and expression analyses of ABC transporters in dwarf polish wheat under metal stresses. *Biologia Plantarum*. 2016;61(2):293–304. DOI: 10.1007/s10535-016-0697-0.
123. Krishna TPA, Maharajan T, Roch GV, Ignacimuthu S, Ceasar SA. Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:662. DOI: 10.3389/fpls.2020.00662.
124. Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2001;126(4):1646–1667. DOI: 10.1104/pp.126.4.1646.
125. Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2006;1763(7):609–620. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.007.
126. Qin L, Han P, Chen L, Walk TC, Li Y, Hu X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *NRAMP* family genes in soybean (*Glycine max* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:1436. DOI: 10.3389/fpls.2017.01436.
127. Ricachenevsky FK, Menguer PK, Sperotto RA, Williams LE, Fett JP. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:144. DOI: 10.3389/fpls.2013.00144.
128. Mao Ke, Yang Jie, Wang Min, Liu Huayu, Guo Xin, Zhao Shuang, et al. Genome-wide analysis of the apple CaCA superfamily reveals that MdCAX proteins are involved in the abiotic stress response as calcium transporters. *BMC Plant Biology*. 2021;21:81. DOI: 10.1186/s12870-021-02866-1.
129. Thakur M, Praveen S, Divte PR, Mitra R, Kumar M, Gupta CK, et al. Metal tolerance in plants: molecular and physicochemical interface determines the «not so heavy effect» of heavy metals. *Chemosphere*. 2022;287(part 1):131957. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131957.
130. Andresen E, Peiter E, Küpper H. Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(5):909–954. DOI: 10.1093/jxb/erx465.
131. Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2004;16(5):1327–1339. DOI: 10.1105/tpc.020487.
132. Chaudhary K, Agarwal S, Khan S. Role of phytochelatin (PCs), metallothioneins (MTs), and heavy metal ATPase (HMA) genes in heavy metal tolerance. In: Prasad R, editor. *Mycoremediation and environmental sustainability. Volume 2*. Cham: Springer; 2018. p. 39–60 (Gupta VK, Tuohy MG, editors. Fungal biology). DOI: 10.1007/978-3-319-77386-5_2.
133. Shin Lung-Jiun, Lo Jing-Chi, Yeh Kuo-Chen. Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiology*. 2012;159(3):1099–1110. DOI: 10.1104/pp.112.195974.
134. Deng F, Yamaji N, Xia J, Ma JF. A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiology*. 2013;163(3):1353–1362. DOI: 10.1104/pp.113.226225.
135. Nikolovski N, Shliaha PV, Gatto L, Dupree P, Lilley KS. Label-free protein quantification for plant golgi protein localization and abundance. *Plant Physiology*. 2014;166(2):1033–1043. DOI: 10.1104/pp.114.245589.
136. Mayerhofer H, Sautron E, Rolland N, Catty P, Seigneurin-Berny D, Pebay-Peyroula E, et al. Structural insights into the nucleotide-binding domains of the P_{1B}-type ATPases HMA6 and HMA8 from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0165666. DOI: 10.1371/journal.pone.0165666.
137. Zientara K, Wawrzyńska A, Łukomska J, López-Moya JR, Liszewska F, Assunção AGL, et al. Activity of the *AtMRP3* promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants is increased by cadmium, nickel, arsenic, cobalt and lead but not by zinc and iron. *Journal of Biotechnology*. 2009;139(3):258–263. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.12.001.
138. Voith von Voithenberg L, Park J, Stübe R, Lux C, Lee Y, Philippar K. A novel prokaryote-type ECF/ABC transporter module in chloroplast metal homeostasis. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1264. DOI: 10.3389/fpls.2019.01264.
139. Li Haixiu, Liu Yuan, Qin Huihui, Lin Xuelei, Tang Ding, Wu Zhengjing, et al. A rice chloroplast-localized ABC transporter ARG1 modulates cobalt and nickel homeostasis and contributes to photosynthetic capacity. *New Phytologist*. 2020;228(1):163–178. DOI: 10.1111/nph.16708.
140. Pedas P, Husted S. Zinc transport mediated by barley ZIP proteins are induced by low pH. *Plant Signaling & Behavior*. 2009;4(9):842–845. DOI: 10.4161/psb.4.9.9375.
141. Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian LV. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(1):369–381. DOI: 10.1093/jxb/ers315.
142. Claus J, Bohmann A, Chavarría-Krauser A. Zinc uptake and radial transport in roots of *Arabidopsis thaliana*: a modelling approach to understand accumulation. *Annals of Botany*. 2012;112(2):369–380. DOI: 10.1093/aob/mcs263.

143. Pinto E, Ferreira IMPLVO. Cation transporters/channels in plants: tools for nutrient biofortification. *Journal of Plant Physiology*. 2015;179:64–82. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.02.010.
144. Mani A, Sankaranarayanan K. Heavy metal and mineral element-induced abiotic stress in rice plant. In: Shah F, Khan Z, Iqbal A. *Rice crop: current developments*. London: IntechOpen; 2018. p. 149–179. DOI: 10.5772/intechopen.76080.
145. Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G. Metal sensing by the IRT1 transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition. *Molecular Cell*. 2018;69(6):953–964. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.02.009.
146. Van der Pas L, Ingle RA. Towards an understanding of the molecular basis of nickel hyperaccumulation in plants. *Plants*. 2019;8(1):11. DOI: 10.3390/plants8010011.
147. Nishida S, Tsuzuki C, Kato A, Aisu A, Yoshida J, Mizuno T. AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*. 2011;52(8):1433–1442. DOI: 10.1093/pcp/pcr089.
148. Filatov V, Dowdle J, Smirnov N, Ford-Lloyd B, Newbury HJ, Macnair MR. Comparison of gene expression in segregating families identifies genes and genomic regions involved in a novel adaptation, zinc hyperaccumulation. *Molecular Ecology*. 2006;15(10):3045–3059. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02981.x.
149. Enomoto T, Yoshida J, Mizuno T, Watanabe T, Nishida S. Differences in mineral accumulation and gene expression profiles between two metal hyperaccumulators, *Noccaea japonica* and *Noccaea caerulescens* ecotype Ganges, under excess nickel condition. *Plant Signaling & Behavior*. 2021;16(10):1945212. DOI: 10.1080/15592324.2021.1945212.
150. Krämer U, Talke IN, Hanikenne M. Transition metal transport. *FEBS Letters*. 2007;581(12):2263–2272. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.010.
151. Castaings L, Alcon C, Kosuth T, Correia D, Curie C. Manganese triggers phosphorylation-mediated endocytosis of the *Arabidopsis* metal transporter NRAMP1. *The Plant Journal*. 2021;106(5):1328–1337. DOI: 10.1111/tpj.15239.
152. Wang Nanqi, Qiu Wei, Dai Jing, Guo Xiaotong, Lu Qiaofang, Wang Tianqi, et al. AhNRAMP1 enhances manganese and zinc uptake in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:415. DOI: 10.3389/fpls.2019.00415.
153. Gao Huiling, Xie Wenxiang, Yang Changhong, Xu Jingyi, Li Jingjun, Wang Hua, et al. NRAMP2, a trans-Golgi network-localized manganese transporter, is required for *Arabidopsis* root growth under manganese deficiency. *New Phytologist*. 2018;217(1):179–193. DOI: 10.1111/nph.14783.
154. Alejandro S, Cailliatte R, Alcon C, Dirick L, Domergue F, Correia D, et al. Intracellular distribution of manganese by the trans-Golgi network transporter NRAMP2 is critical for photosynthesis and cellular redox homeostasis. *The Plant Cell*. 2017;29(12):3068–3084. DOI: 10.1105/tpc.17.00578.
155. Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal*. 2005;24(23):4041–4051. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600864.
156. Cailliatte R, Lapeyre B, Briat J-F, Mari S, Curie C. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal*. 2009;422(2):217–228. DOI: 10.1042/BJ20090655.
157. Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes. *PNAS*. 2000;97(9):4991–4996. DOI: 10.1073/pnas.97.9.4991.
158. Fasani E, DalCorso G, Zorzi G, Agrimonti C, Fragni R, Visioli G, et al. Overexpression of ZNT1 and NRAMP4 from the Ni hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* population Monte Prinzera in *Arabidopsis thaliana* perturbs Fe, Mn, and Ni accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(21):11896. DOI: 10.3390/ijms222111896.
159. Mizuno T, Usui K, Horie K, Nosaka S, Mizuno N, Obata H. Cloning of three ZIP/NRAMP transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005;43(8):793–801. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.07.006.
160. Kozak K, Papierniak-Wygladala A, Palusińska M, Barabas A, Antosiewicz DM. Regulation and function of metal uptake transporter NtNRAMP3 in tobacco. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:867967. DOI: 10.3389/fpls.2022.867967.
161. Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*. 2007;8:107. DOI: 10.1186/1471-2164-8-107.
162. Chao Yang, Fu Dax. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):12043–12050. DOI: 10.1074/jbc.M313510200.
163. Replina NS, Talanova VV, Titov AF. Effects of heavy metals on gene expression in plants. *Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. Experimental Biology Series*. 2013;3:31–45. Russian.
164. Ovečka M, Takáč T. Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnology Advances*. 2014;32(1):73–86. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.011.
165. Arrivault S, Senger T, Krämer U. The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*. 2006;46(5):861–879. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02746.x.
166. Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M. Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(13):8374–8383. DOI: 10.1074/jbc.M707646200.
167. Yuan Lianyu, Yang Songguang, Liu Baoxiu, Zhang Mei, Wu Keqiang. Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1. *Plant Cell Reports*. 2012;31(1):67–79. DOI: 10.1007/s00299-011-1140-9.
168. Das N, Bhattacharya S, Maiti MK. Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco overexpressing rice metal tolerance protein gene *OsMTP1* is promising for phytoremediation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016;105:297–309. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.049.
169. Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pedas P, Husted S, Maathuis FJM, et al. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *PNAS*. 2007;104(20):8532–8537. DOI: 10.1073/pnas.0609507104.
170. Pittman JK, Hirschi KD. CAX-ing a wide net: cation/H⁺ transporters in metal remediation and abiotic stress signalling. *Plant Biology*. 2016;18(5):741–749. DOI: 10.1111/plb.12460.
171. Conn SJ, Gilliam M, Athman A, Schreiber AW, Baumann U, Moller I, et al. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2011;23(1):240–257. DOI: 10.1105/tpc.109.072769.

172. Baliardini C, Meyer C-L, Salis P, Saumitou-Laprade P, Verbruggen N. Cation exchanger1 cosegregates with cadmium tolerance in the metal hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and plays a role in limiting oxidative stress in *Arabidopsis* spp. *Plant Physiology*. 2015;169(1):549–559. DOI: 10.1104/pp.15.01037.
173. Puig S. Function and regulation of the plant COPT family of high-affinity copper transport proteins. *Advances in Botany*. 2014;476917. DOI: 10.1155/2014/476917.
174. Gayomba SR, Watkins JM, Muday GK. Flavonols regulate plant growth and development through regulation of auxin transport and cellular redox status. In: Yoshida K, Cheynier V, Quideau S, editors. *Recent advances in polyphenol research. Volume 5*. [S. l.]: John Wiley & Sons; 2017. p. 143–170. DOI: 10.1002/9781118883303.ch7.
175. Conte SS, Chu HH, Chan-Rodriguez D, Punshon T, Vasques KA, Salt DE, et al. *Arabidopsis thaliana* yellow stripe1-like4 and yellow stripe1-like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:283. DOI: 10.3389/fpls.2013.00283.
176. Verbruggen N, Hermans C, Schat H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*. 2009;181(4):759–776. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x.
177. Divol F, Couch D, Conéjéro G, Roschttardt H, Mari S, Curie C. The *Arabidopsis* yellow stripe like4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *The Plant Cell*. 2013;25(3):1040–1055. DOI: 10.1105/tpc.112.107672.
178. Islam MA, Guo J, Peng H, Tian S, Bai X, Zhu H, et al. *TaYS1A*, a yellow stripe-like transporter gene, is required for wheat resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Genes*. 2020;11(12):1452. DOI: 10.3390/genes11121452.
179. Colangelo EP, Guerinet ML. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2006;9(3):322–330. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.03.015.
180. DiDonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Eisleay RB, Walker EL. *Arabidopsis* yellow stripe-like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine – metal complexes. *The Plant Journal*. 2004;39(3):403–414. DOI: 10.1111/j.1365-3113x.2004.02128.x.
181. Chen Chyi-Chuann, Chien Wei-Fu, Lin Nai-Chun, Yeh Kuo-Chen. Alternative functions of *Arabidopsis* yellow stripe-like3: from metal translocation to pathogen defense. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e98008. DOI: 10.1371/journal.pone.0098008.
182. Rascio N, Navari-Izzo F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*. 2011;180(2):169–181. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.08.016.
183. Ahmad MSA, Ashraf M. Essential roles and hazardous effects of nickel in plants. In: Whitacre DM, editor. *Reviews of environmental contamination and toxicology. Volume 214*. New York: Springer; 2011. p. 125–167. DOI: 10.1007/978-1-4614-0668-6_6.
184. Seregin IV, Kozhevnikova AD. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2006;53(2):257–277. DOI: 10.1134/s1021443706020178.
185. Shahid M, Dumat C, Khalid S, Schreck E, Xiong T, Niazi NK. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: a comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of Hazardous Materials*. 2017;325:36–58. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.11.063.
186. Kozlov MV, Haukioja E, Bakhtiarov AV, Stroganov DN, Zimina SN. Root versus canopy uptake of heavy metals by birch in an industrially polluted area: contrasting behaviour of nickel and copper. *Environmental Pollution*. 2000;107(3):413–420. DOI: 10.1016/s0269-7491(99)00159-1.
187. Titov AF, Kaznina NM, Talanova VV. *Tyazhelye metally i rasteniya* [Heavy metals and plants]. Petrozavodsk: Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 2014. 194 p. Russian.
188. Ataabadi M, Hoodaji M, Najafi P. Biomonitoring of some heavy metal contaminations from a steel plant by above ground plants tissue. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(20):4127–4132. DOI: 10.5897/AJB10.2452.
189. Page V, Feller U. Heavy metals in crop plants: transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*. 2015;5(3):447–463. DOI: 10.3390/agronomy5030447.
190. Page V, Weisskopf L, Feller U. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytologist*. 2006;171(2):329–341. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01756.x.
191. Deng T-H-B, Chen J-Q, Geng K-R, van der Ent A, Tang Y-T, Wen D, et al. Quantification of nickel and cobalt mobility and accumulation via the phloem in the hyperaccumulator *Noccaea caerulea* (Brassicaceae). *Metallomics*. 2021;13(4):mfab012. DOI: 10.1093/mtomcs/mfab012.
192. Kozhevnikova AD, Seregin IV, Schat H. Accumulation of nickel by excluder *Thlaspi arvense* and hyperaccumulator *Noccaea caerulea* upon short-term and long-term exposure. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2020;67(2):303–311. DOI: 10.1134/s1021443720020089.
193. Kerkeb L, Krämer U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*. 2003;131(2):716–724. DOI: 10.1104/pp102.010686.
194. Dalir N, Khoshgoftarmanesh AH. Root uptake and translocation of nickel in wheat as affected by histidine. *Journal of Plant Physiology*. 2015;184:8–14. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.05.017.
195. Alves S, Nabais C, Simões Gonçalves MDL, Correia dos Santos MM. Nickel speciation in the xylem sap of the hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* ssp. *lusitanicum* growing on serpentine soils of northeast Portugal. *Journal of Plant Physiology*. 2011;168(15):1715–1722. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.04.004.
196. Centofanti T, Sayers Z, Cabello-Conejo MI, Kidd P, Nishizawa NK, Kakei Y, et al. Xylem exudate composition and root-to-shoot nickel translocation in *Alyssum* species. *Plant and Soil*. 2013;373(1–2):59–75. DOI: 10.1007/s11104-013-1782-1.
197. Harris WR, Sammons RD, Grabiak RC. A speciation model of essential trace metal ions in phloem. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;116:140–150. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.07.011.
198. Mackievic VS, Shyker AA, Zvanarou SM, Litkevich KS, Turovets OA, Smolich II, et al. Growth inhibition and induction of programmed cell death in the root of *Helianthus annuus* L. triggered by nickel ions and nickel-histidine complexes. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:11–19. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-11-19.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 547.327:547.295.9:612.884

ОЦЕНКА АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЕ РЕЦЕПТОРОВ PPAR α В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

А. С. ДОРОНЬКИНА¹⁾, И. П. ЖАВОРОНОК¹⁾, А. Л. МИХАЛЬЧУК²⁾, В. Г. БОГДАН³⁾

¹⁾Институт физиологии НАН Беларуси,

ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт биоорганической химии НАН Беларуси,

ул. Академика Купревича, 5, корп. 2, 220084, г. Минск, Беларусь

³⁾Национальная академия наук Беларуси,

пр. Независимости, 66, 220072, г. Минск, Беларусь

Изучено влияние амидов жирных кислот в условиях блокады ядерных рецепторов PPAR α на ноцицептивную чувствительность и параметры походки у крыс в норме и при экспериментальной периферической нейропатии. Установлено, что у животных с лигированием седалищного нерва введение амидов жирных кислот на фоне блокады

Образец цитирования:

Доронькина АС, Жаворонок ИП, Михальчук АЛ, Богдан ВГ. Оценка антиноцицептивного действия амидов жирных кислот при фармакологической блокаде рецепторов PPAR α в условиях экспериментальной периферической нейропатии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:30–43. EDN: VETILJ

For citation:

Doronkina AS, Zhavoronok IP, Mikhal'chuk AL, Bogdan VG. Assessment of antinociceptive actions of fatty acid amides in pharacological blockade of PPAR α receptors in experimental peripheral neuropathy. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:30–43. Russian. EDN: VETILJ

Авторы:

Анастасия Сергеевна Доронькина – младший научный сотрудник лаборатории биологического моделирования.

Ирина Петровна Жаворонок – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией биологического моделирования.

Александр Леонидович Михальчук – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего лабораторией химии липидов.

Василий Генрихович Богдан – доктор медицинских наук, профессор; академик-секретарь Отделения медицинских наук.

Authors:

Anastasya S. Doronkina, junior researcher at the laboratory of biological modelling.

doronkina_nastasya1995@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-8914-5166>

Irina P. Zhavoronok, PhD (biology); head of the laboratory of biological modelling.

iri8308@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9982-0719>

Alexander L. Mikhal'chuk, PhD (chemistry); leading researcher and acting head of the laboratory of lipid chemistry.

lipmal@iboch.by

<https://orcid.org/0000-0003-4344-4616>

Vasily G. Bogdan, doctor of science (medicine), full professor; academician-secretary at the Department of Medical Sciences.

medic@presidium.bas-net.by

<https://orcid.org/0000-0003-4344-4616>

рецепторов PPAR α приводит к достоверному снижению выраженности ноцицептивной реакции на механический и термический стимулы. При регистрации паттернов походки отмечено увеличение интенсивности и площади отпечатка, а также скорости переноса конечности.

Ключевые слова: пальмитоилэтаноламид; стеароилэтаноламид; пальмитоилглицинамид; паттерны походки; ноцицепция; нейропатия; анальгетический эффект; амиды жирных кислот; ядерные рецепторы.

ASSESSMENT OF ANTINOCICEPTIVE ACTIONS OF FATTY ACID AMIDES IN PHARMACOLOGICAL BLOCKADE OF PPAR α RECEPTORS IN EXPERIMENTAL PERIPHERAL NEUROPATHY

A. S. DORONKINA^a, I. P. ZHAVORONOK^a, A. L. MIKHAL'CHUK^b, V. G. BOGDAN^c

^a*Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,
28 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus*

^b*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Akademika Kuprevicha Street, 2 building, Minsk 220084, Belarus*

^c*National Academy of Sciences of Belarus,
66 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220072, Belarus*

Corresponding author: A. S. Doronkina (doronkina_nastasya1995@mail.ru)

The effect of fatty acid amides during the blockade of PPAR α nuclear receptors on nociceptive sensitivity and gait parameters in rats with normal and experimental peripheral neuropathy was studied. It was found that in rats with ligation of the sciatic nerve, the introduction of fatty acid amides against the background of PPAR α receptor blockade led to a significant decrease in the severity of the nociceptive response to mechanical and thermal stimuli. When registering gait patterns, an increase in the intensity and area of the limb imprint, as well as in limb transfer rate was noted.

Keywords: palmitoylethanolamide; stearoylethanolamide; palmitoylglucosylamide; gait patterns; nociception; neuropathy; analgesic effect; fatty acid amides; nuclear receptors.

Введение

От нейропатической боли страдает около 10 % населения земного шара, и ежегодно количество пациентов с этим недугом увеличивается. Нейропатия – патология нервной системы, которая возникает на фоне поражения периферических нервов вследствие компрессии или травмы. Наиболее распространенными причинами периферической нейропатии являются сахарный диабет, онкологические заболевания и химиотерапия, токсические поражения, герпетическая инфекция, травмы и др. [1]. Хроническая боль существенно ухудшает качество жизни пациентов вплоть до развития психических расстройств, таких как депрессия. Сложности при лечении пациентов с нейропатической болью обусловлены неоднородностью ее этиологии, симптомов и основных механизмов возникновения. К сожалению, нейропатическая боль обычно трудно поддается лечению с помощью существующих терапевтических средств. Стандартная фармакотерапия данной патологии включает антидепрессанты (трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина), противоэпилептические (противосудорожные) препараты, опиоидные анальгетики и местные анестетики, которые ингибируют обратный захват биогенных аминов серотонина, норадреналина и гамма-аминомасляной кислоты, что, в свою очередь, снижает болевую чувствительность. Применение всех этих средств, помимо потенциальных преимуществ, сопряжено с риском развития различных побочных эффектов, среди которых – атаксия, нарушение концентрации внимания, ухудшение памяти, тремор, дизартрия, парестезия, спутанность сознания, синдром беспокойных ног, тахикардия и др. Однако более важно то, что перечисленные лекарственные препараты оказывают лишь симптоматическое действие, но не устраняют причину болевых ощущений. Вследствие этого актуальной задачей выступает поиск путей патогенетического лечения нейропатии и связанных с ней болевых синдромов, которые были бы эффективны и в то же время характеризовались отсутствием побочных эффектов [2; 3].

Одним из трендов медико-биологических исследований последних лет являются исследования в области физиологии и биохимии липидных аутокоидов – амидов жирных кислот (*fatty acid amides*, FAAs). Эта весьма обширная, непрерывно обновляющаяся и пополняющаяся группа биогенных веществ к настоящему времени насчитывает сотни представителей. Амиды жирных кислот (эндогенные этаноламиды и амиды с аминокислотами) являются естественными регуляторами гомеостаза живых организмов (от протобактерий

до человека) в норме и при патологии и рассматриваются в качестве основы препаратов, способствующих поддержанию здоровья, ускоряющих выздоровление и улучшающих качество жизни [2; 4; 5]. Кроме того, FAAs считаются потенциальными фармакологическими агентами модуляции активности мембранных рецепторов, сопряженных с G-белком орфанных рецепторов GPR18, GPR55, ядерных рецепторов PPARs, каннабиноидных рецепторов CBR1, CBR2 и ванилоидных рецепторов TRPV1 [6; 7].

В свою очередь, PPARs (рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором) входят в семейство факторов транскрипции ядерных гормонов и выступают важными модуляторами боли, а следовательно, потенциальной терапевтической мишенью для ее купирования. В более ранних исследованиях сообщалось о нацеливании рецепторов PPAR α на периферическую нейропатию с помощью экзогенных агонистов, таких как фенофибрат. Однако их потенциал в качестве мишени для антиноцицептивного действия эндогенных этаноламидов не изучался [8; 9].

В связи с этим настоящее исследование было направлено на анализ антиноцицептивного действия наиболее изученных FAAs, а именно пальмитоилэтаноламида (*palmitoylethanolamide*, PEA), стеароилэтаноламида (*stearoylethanolamide*, SEA) и пальмитоилглицинамида (*palmitoylglycinamide*, PGlyA), на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α у здоровых животных, а также у животных с экспериментальной периферической нейропатией.

Цель работы – изучить влияние FAAs при блокаде ядерных рецепторов PPAR α на ноцицептивную чувствительность и параметры походки у крыс с периферической нейропатией.

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные. Экспериментальные исследования выполнены на 93 крысах-самцах линии Wistar массой 200–220 г, содержащихся в условиях вивария Института физиологии НАН Беларуси при температуре (22 ± 1) °C и цикле освещения 12 ч день и 12 ч ночь с доступом к воде и пище *ad libitum*. Серии экспериментов выполняли в утреннее время. Все манипуляции с лабораторными животными проводили с соблюдением законодательства¹ и принципов биоэтики в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Протоколы экспериментов одобрены комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 2 февраля 2022 г.).

Исследуемые вещества. Объектом исследования выступали FAAs (PEA, SEA, PGlyA), синтезированные в лаборатории химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, а также GW6471 – антагонист ядерных рецепторов PPAR α (*Cayman Chemical*, США). Поскольку и FAAs, и GW6471 являются труднорастворимыми соединениями, то для их введения использовали комплексный растворитель, содержащий Tween-80 (*Sigma-Aldrich*, США), этанол и апирогенный физиологический раствор в соотношении 1 : 1 : 8. Сначала осуществляли внутрибрюшинное введение GW6471 в дозе 1 мг/кг в 1 мл растворителя, а через 10 мин – внутрибрюшинное введение одного из FAAs (PEA, SEA, PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг в 1 мл растворителя.

В исследовании крыс разделили на следующие группы:

- здоровые животные + растворитель (контроль 1) ($n = 7$);
- здоровые животные + GW6471 ($n = 7$);
- нейропатия без лечения (контроль 2) ($n = 10$);
- ложнооперированные животные (контроль 3) ($n = 7$);
- нейропатия + растворитель (контроль 4) ($n = 7$);
- нейропатия + PEA ($n = 10$);
- нейропатия + SEA ($n = 10$);
- нейропатия + PGlyA ($n = 7$);
- нейропатия + GW6471 ($n = 7$);
- нейропатия + GW6471 + PEA ($n = 7$);
- нейропатия + GW6471 + SEA ($n = 7$);
- нейропатия + GW6471 + PGlyA ($n = 7$).

Моделирование периферической нейропатии. Моделирование данной патологии осуществляли хирургическим путем в асептических условиях. Все хирургические манипуляции проводили под общей анестезией (внутривенное введение тиопентала натрия (ОАО «Синтез», Россия), растворенного в апирогенном физиологическом растворе, в дозе 20 мг/кг). Для местной анестезии использовали 1 % раствор лидокаина гидрохлорида (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь) в расчете 30–40 мкл на

¹Об утверждении Ветеринарно-санитарных правил по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках [Электронный ресурс] : постановление М-ва сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, 21 мая 2010 г., № 36. URL: <https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W210p0118> (дата обращения: 22.09.2022).

крысу. После наркотизации тиопенталом натрия крыс фиксировали в положении лежа на правом боку, выбривали шерсть в области бедра и голени животного и обрабатывали подготовленное поле 5 % спиртовым раствором йода. В проекции прохождения седалищного нерва с наружной стороны бедра выполняли разрез кожи длиной 1 см, раздвигали мышечный слой пинцетом, минимально травмируя мышечные волокна, находили седалищный нерв и накладывали на него три лигатуры на расстоянии 1 мм друг от друга с использованием нити «Сургикрол» (USP 3/0) (ООО «Футберг», Беларусь). Кожу сшивали непрерывным матрачным швом. Готовый шов обрабатывали 1 % раствором бриллиантового зеленого (РУП «Белмед-препараты», Беларусь). Ложнооперированным животным производили только разрез кожи и раздвигали мышцы без лигирования нервных волокон с последующим ушиванием краев раны. Для предупреждения инфицирования крысам подкожно вводили растворенный в воде для инъекций антибиотик «Цефтриаксон» (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов») в дозе 200 мг/кг. До полного пробуждения от наркоза животные находились под постоянным визуальным контролем в индивидуальных боксах [10].

Определение латентного периода ноцицептивной реакции (ЛПНР) (в секундах) проводили с использованием альгезиметра Hot Plate (*Panlab*, Испания). Животных помещали на поверхность металлической пластины альгезиметра, нагретую до 50 °С. Затем с помощью встроенного таймера регистрировали время с момента помещения животного на пластину до момента лизания задней конечности, вокализации либо попытки выпрыгнуть [11].

Для определения порога ноцицептивной реакции (ПНР) (в граммах) применяли тест Рэндалла – Селитто (тест «давление на лапу»), предполагающий измерение силы надавливания пластикового остроконечного конуса на стопу экспериментального животного, при которой отмечается специфическая болевая реакция (отдергивание лапы либо вокализация). Тест проводили поочередно на обеих задних лапах для каждого животного с использованием аппарата фирмы *Panlab* [12].

Измерение параметров походки крыс выполняли с помощью аппаратно-программного комплекса CatWalk XT (*Noldus*, Нидерланды). Данный комплекс состоит из закрытого коридора на стеклянной пластине, по которому крыса перемещается с одной стороны на другую. Зеленый свет, излучаемый внутри коридора, полностью отражается от пластины, за исключением тех мест, где лапа животного соприкасается со стеклом и, как следствие, свет рассеивается [13]. Под стеклянной пластиной была установлена высокоскоростная камера для записи пробега животных. Эксперимент проводился в затемненной и защищенной от шума комнате. Программное обеспечение комплекса CatWalk XT автоматически регистрировало отпечатки лап, когда животное пересекало откалиброванный участок коридора размером 20 × 10 см.

Аналізу подвергались следующие данные, полученные с использованием комплекса CatWalk XT: площадь отпечатка (в квадратных сантиметрах), скорость переноса конечности (в сантиметрах в секунду), интенсивность отпечатка (в абсолютных единицах измерения). Другие показатели, такие как ширина и длина отпечатка (в сантиметрах), продолжительность фазы стойки (в секундах), статистически значимо не изменялись и поэтому не были включены в исследование [13].

Интенсивность 3D-отпечатка показывает интенсивность отпечатка для каждого кадра, в котором лапы соприкасаются со стеклянной пластиной, и варьирует от 0 до 225, т. е. представлена в промежутке от синего до красного цвета.

Пробег считался удачным, когда крыса входила в коридор и плавно перемещалась по пластине к выходу на другом конце коридора, при этом продолжительность пробега была менее 5 с, а максимальное отклонение составляло менее 75 %. Для каждого животного были зарегистрированы три таких пробега [13].

Измерения производили до моделирования нейропатии, а также на 7, 14, 21, 30, 60-е сутки после моделирования патологии трехкратно через 5–7 мин с последующим усреднением индивидуальных показателей.

Для большей графической наглядности значений показателей ноцицептивной чувствительности и параметров походки данные представлены в процентах от фонового значения, принятого за 100 %.

Анализ полученных данных. Статистическую и графическую обработку результатов выполняли с помощью пакетов программ *OriginPro 9.1* (*OriginLab Corporation*, США) и *Statistica 10.0* (*StatSoft*, Россия). Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных показателей осуществляли по критерию Шапиро – Уилка. Статистическую значимость количественных признаков определяли с помощью непараметрических тестов, а именно теста Уилкоксона для зависимых выборок и теста Манна – Уитни для независимых выборок в парных сравнениях. Данные представлены в виде медианы и интервального размаха с указанием 25-го и 75-го процентилей. Для анализа взаимосвязи двух количественных показателей использовали метод ранговой корреляции Спирмена. В процессе обработки данных уровень статистической значимости оценивали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Болевая чувствительность и паттерны походки в условиях экспериментальной нейропатии. На протяжении исследования состояние лабораторных животных было в пределах нормы: не выявлено патологических выделений и изменений шерстяного покрова, слизистых оболочек, а также отмечена

положительная динамика массы тела. Экспериментальные животные, которым моделировали периферическую нейропатию, прихрамывали, подтягивая травмированную лапу, однако при этом их общее состояние не отличалось от состояния здоровых животных.

Лигирование седалищного нерва у крыс контрольной группы приводило к развитию механической гипералгезии на 4-е сутки после операции, что выражалось в снижении ПНР ипсилатеральной (травмированной) конечности на 21,6 % (с 127,5 (123,0–130,8) до 97,0 (94,3–101,0) г; $p = 0,007$) по сравнению с его значением до моделирования патологии. На 7-е сутки данный показатель уменьшился на 29,3 % (до 90,0 (87,0–93,0) г; $p = 0,0002$) относительно исходных значений. В то же время при проведении соответствующего теста на контралатеральной (неповрежденной) конечности, равно как и на обеих задних конечностях в группе ложнооперированных животных, подобного эффекта не обнаружено ($p > 0,05$).

При исследовании ноцицептивной реакции на термический стимул у животных с периферической нейропатией наблюдалось статистически значимое снижение ЛПНР на 34,5 % (с 20,4 (18,8–21,4) до 13,6 (11,9–14,7) с; $p = 0,005$) по сравнению с данными до операции. Механическая и термическая гипералгезия сохранялась по 60-е сутки ($p < 0,05$).

В ходе оценки изменений параметров походки с использованием аппаратно-программного комплекса CatWalk XT у животных с травмой седалищного нерва на 7-е сутки после операции отмечено уменьшение интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности на 17,5 % (с 189,0 (179,0–195,0) до 144,0 (139,0–149,2); $p = 0,02$) и площади отпечатка ипсилатеральной конечности на 30,6 % (с 1,2 (0,9–1,2) до 0,7 (0,7–0,8) см²; $p = 0,005$) по сравнению с фоновыми значениями. Визуализация данных изменений реализована в виде 3D-графиков. При проведении тестов на контралатеральной конечности и обеих задних конечностях в группе ложнооперированных животных схожих изменений паттернов походки не выявлено ($p > 0,05$).

При визуальном сравнении отпечатков лап здоровой крысы и крысы с периферической нейропатией было отмечено, что животное в меньшей степени наступает на травмированную лапу, как следствие, развиваются хромота и постуральная асимметрия, свойственные данной патологии. Дальнейший мониторинг (на 14, 21, 30, 60-е сутки после операции) показал постепенное увеличение площади и интенсивности отпечатка и уменьшение выраженности клинической картины, однако полного восстановления до исходного уровня не происходило (рис. 1).

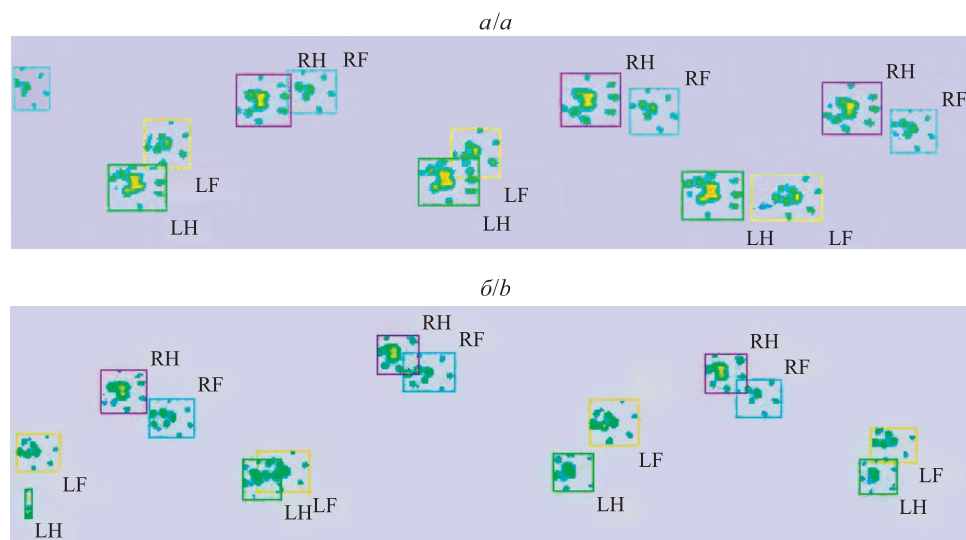


Рис. 1. Отпечатки лап здоровой крысы (а) и крысы с периферической нейропатией на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва (б).

Обозначение лап: RH – правая задняя (контралатеральная); RF – правая передняя; LH – левая задняя (ипсилатеральная); LF – левая передняя

Fig 1. Limb imprints of a healthy rat (a) and a rat with peripheral neuropathy on the 7th day after ligation of the sciatic nerve.

Designation of paws: RH – right hind (contralateral); RF – right front; LH – left hind (ipsilateral); LF – left front

Влияние GW6471 на болевую чувствительность и паттерны походки у здоровых крыс и крыс с экспериментальной нейропатией. Установлено, что однократное внутрибрюшинное введение одной группе здоровых крыс растворителя, а второй группе здоровых крыс антагониста рецепторов PPAR α не вызывало статистически значимого снижения усредненных показателей ПНР и ЛПНР, а также выбранных параметров походки (табл. 1).

Таблица 1

Изменение значений показателей ноцицептивной чувствительности
и параметров походки в группах здоровых животных

Table 1

Change in the values of indicators of nociceptive sensitivity
and gait patterns in healthy rats

Показатели	Значение		Уровень значимости (<i>p</i>)
	До введения веществ	Через 1 ч после введения веществ	
<i>Здоровые животные + растворитель</i>			
ПНР	127 (124–129) г	123 (120–125) г	0,09
ЛПНР	23 (16–32) с	20 (17–28) с	0,62
Интенсивность отпечатка	187 (180–197)	182 (164–185)	0,69
Площадь отпечатка	1,0 (0,7–1,1) см ²	0,9 (0,7–1,0) см ²	0,23
Скорость переноса конечности	90 (88–97) см/с	90 (73–93) см/с	0,14
<i>Здоровые животные + GW6471</i>			
ПНР	131 (123–132) г	114 (108–119) г	0,08
ЛПНР	22 (18–23) с	20 (16–21) с	0,39
Интенсивность отпечатка	193 (180–194)	177 (171–191)	0,61
Площадь отпечатка	1,3 (1,1–1,4) см ²	1,1 (1,0–1,3) см ²	0,79
Скорость переноса конечности	109 (103–116) см/с	108 (93–120) см/с	0,56

При однократном внутрибрюшинном введении GW6471 в дозе 1 мг/кг крысам с периферической нейропатией на 7-е сутки после операции отмечено снижение ПНР ипсилатеральной конечности на 29,9 % (с 128,0 (123,0–132,5) до 83,0 (79,0–87,0) г; $p = 0,05$) и ЛПНР на 35,2 % (с 23,2 (20,1–24,7) до 14,6 (13,8–15,6) с; $p = 0,028$) относительно дооперационных значений (рис. 2 и 3). Внутрибрюшинное введение крысам смеси растворителей на фоне нейропатии (по аналогичной схеме) не влияло на величину ПНР и ЛПНР.

Применение GW6471 приводило к достоверному уменьшению интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности на 20,3 % (с 203,0 (178,1–205,4) до 160,0 (147,2–162,3); $p = 0,002$) и площади отпечатка ипсилатеральной конечности на 26,6 % (с 1,1 (1,0–1,3) до 0,8 (0,6–0,9) см²; $p = 0,05$) относительно значений до операции (рис. 4–6). Также фармакологическая блокада рецепторов PPAR α обуславливала достоверное снижение скорости переноса ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией на 24,3 % (с 93,1 (90,7–103,6) до 77,3 (70,1–80,4) см/с; $p = 0,039$) по сравнению с фоновыми значениями (рис. 7). Данные регистрации паттернов походки для контралатеральной конечности, равно как и для обеих задних конечностей животных, которым вводили растворитель, свидетельствовали об отсутствии достоверных изменений исследуемых показателей.

Влияние сочетанного действия FAAs и GW6471 на болевую чувствительность и паттерны походки в условиях экспериментальной нейропатии. Однократное внутрибрюшинное введение FAAs в дозе 1,5 мг/кг крысам с периферической нейропатией на 7-е сутки после операции существенно ослабляло вызванную лигированием седалищного нерва механическую гипералгезию. Применение PEA обуславливало статистически значимое увеличение ПНР на 22,8 % (с 95,5 (91,3–100,8) до 115,0 (112,3–120,0) г; $p = 0,005$), применение SEA – на 26,2 % (с 88,0 (85,0–98,5) до 115,0 (111,0–117,0) г; $p = 0,007$), применение PGlyA – на 24,7 % (с 88,0 (81,0–93,0) до 110,0 (109,0–113,0) г; $p = 0,02$) по сравнению со значениями ПНР до их инъекции (см. рис. 2).

Введение FAAs на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва также приводило к повышению ПНР независимо от используемого вещества (PEA, SEA, PGlyA). Так, предварительная инъекция GW6471 с последующим применением PEA вызывала увеличение ПНР на 21,6 % (с 85,0 (82,0–91,0) до 105,0 (100,0–114,0) г; $p = 0,027$) по отношению к его значениям до введения указанных веществ (см. рис. 2). Использование SEA на фоне блокады рецепторов PPAR α обуславливало рост исследуемого показателя на 21,4 % (с 87,0 (82,0–91,0) до 108,0 (97,0–112,0) г; $p = 0,018$) (см. рис. 2). У крыс, которым вводили PGlyA в сочетании с антагонистом рецепторов PPAR α , ПНР повышался на 16,6 % (с 86,0 (84,0–90,0) до 103,0 (91,0–111,0) г; $p = 0,018$) (см. рис. 2). Данный эффект был однократным и не обладал пролонгированным действием.

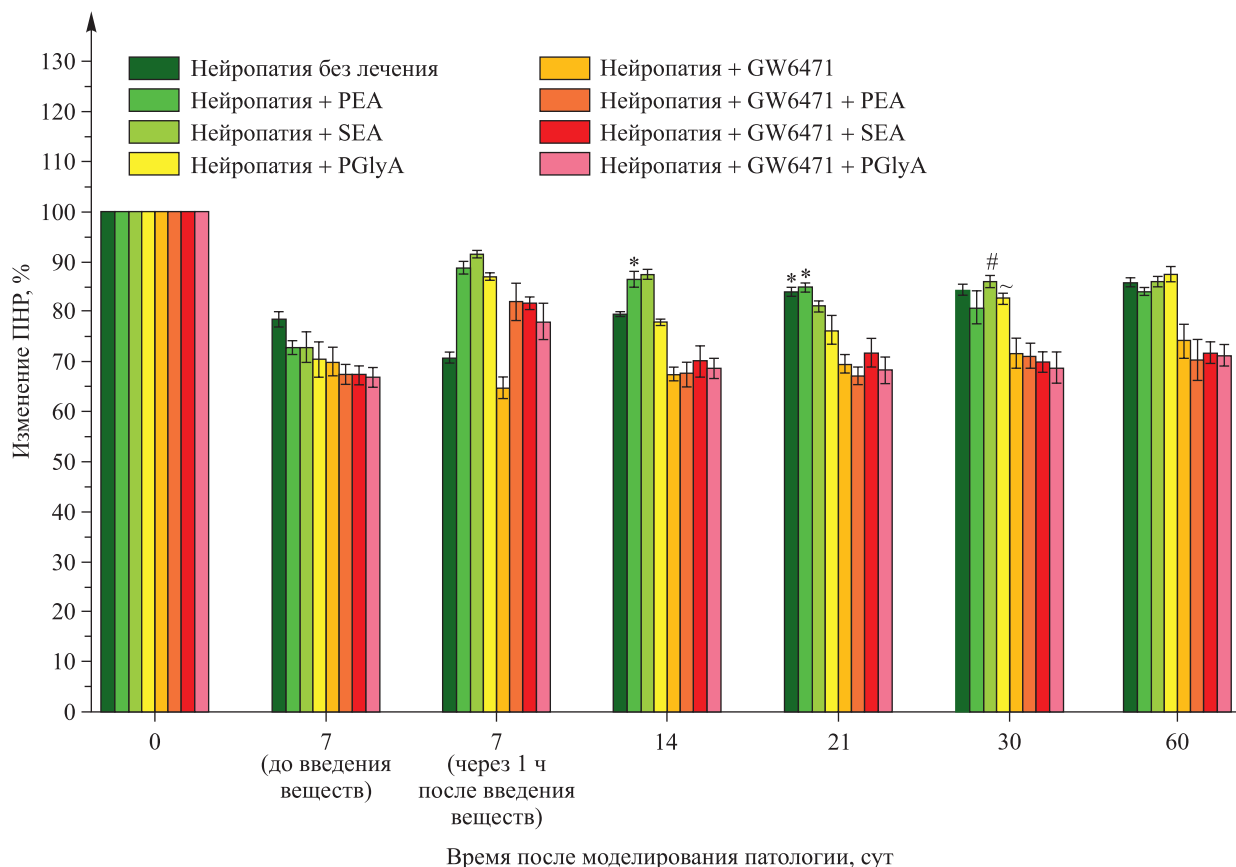


Рис. 2. Изменение ПНР ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией в результате внутривнутрибрюшинного введения GW6471 в дозе 1 мг/кг и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва. Знаком * отмечены статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + PEA», знаком # – статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + SEA», знаком ~ – статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + PGlyA» (во всех случаях $p < 0,05$)

Fig. 2. Change in the nociceptive reaction threshold of the ipsilateral limb in rats with peripheral neuropathy as a result of intraperitoneal injection of GW6471 at a dose of 1 mg/kg and FAAs (PEA, SEA, PGlyA) at a dose of 1.5 mg/kg on the 7th day after ligation of the sciatic nerve.

Sign * marked statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + PEA», sign # – statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + SEA», sign ~ – statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + PGlyA» (in all cases, $p < 0.05$)

При сравнении значений ПНР травмированной конечности у крыс с периферической нейропатией в случае индивидуального введения FAAs и в случае инъекции FAAs на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α отмечены статистически значимые различия между группами «нейропатия + PEA» и «нейропатия + GW6471 + PEA» (31,1 % ($p = 0,018$)) на 14-е сутки после моделирования патологии, а также между группами «нейропатия + SEA» и «нейропатия + GW6471 + SEA» (21,1 % ($p = 0,027$)) на 30-е сутки после операции (см. рис. 2).

Однократное внутривнутрибрюшинное введение FAAs в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва приводило к достоверному снижению термической аллодинии. Инъекция PEA повышала ЛПНР на 31,7 % (с 12,9 (11,3–15,1) до 16,9 (15,5–18,4) с; $p = 0,005$), а инъекция PGlyA – на 17,4 % (с 14,6 (13,8–15,7) до 17,4 (16,3–19,1) с; $p = 0,04$) относительно величины данного показателя до введения указанных веществ (см. рис. 3). Использование SEA вызывало более выраженное увеличение значений ЛПНР – на 53,3 % (с 16,5 (15,3–18,7) до 27,2 (23,7–28,9) с; $p = 0,007$), но только на 7-е сутки мониторинга через 1 ч после введения (см. рис. 3).

Инъекция SEA после введения GW6471 обеспечивала достоверное увеличение ЛПНР на 29,8 % (с 15,6 (15,1–17,8) до 20,7 (19,6–22,9) с; $p = 0,018$) (см. рис. 3). Отмечены статистически значимые различия между группами «нейропатия + SEA» и «нейропатия + GW6471 + SEA» (52,5 % ($p = 0,027$)).

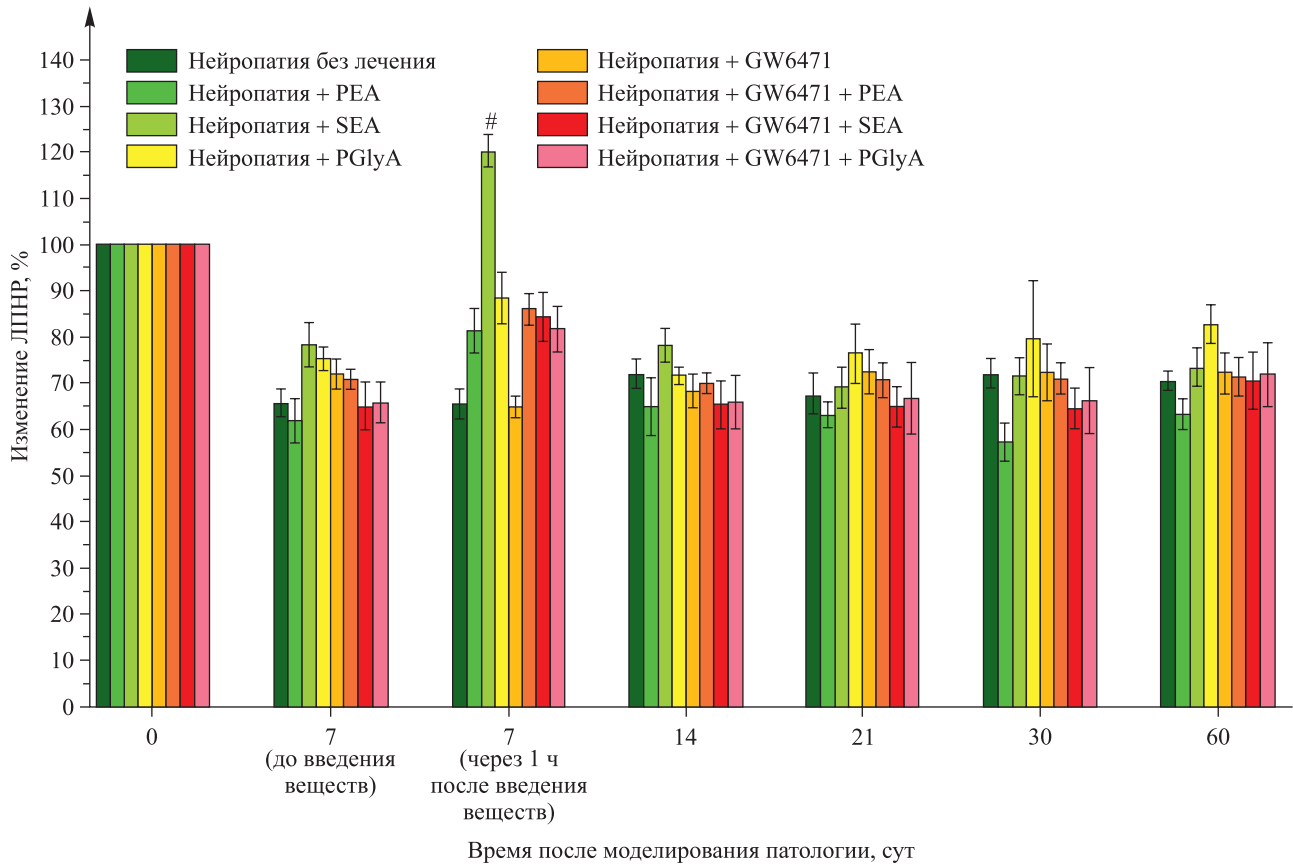


Рис. 3. Изменение ЛПНР у крыс с периферической нейропатией в результате внутрибрюшинного введения GW6471 в дозе 1 мг/кг и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва. Знаком [#] обозначены статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + SEA» ($p < 0,05$)

Fig. 3. Change in the latent period of nociceptive reaction in rats with peripheral neuropathy as a result of intraperitoneal injection of GW6471 at a dose of 1 mg/kg and FAAs (PEA, SEA, PGlyA) at a dose of 1.5 mg/kg on the 7th day after ligation of the sciatic nerve. Sign [#] marked statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + SEA» ($p < 0.05$)

Применение PEA на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α способствовало повышению ЛПНР на 21,6 % (с 16,1(15,4–17,2) до 20,7 (17,4–22,1) с; $p = 0,018$), тогда как использование PGlyA в аналогичных условиях обуславливало рост вышеупомянутого показателя на 24,2 % (с 16,1 (13,9–17,7) до 19,8 (17,5–22,1) с; $p = 0,018$) относительно его значений до инъекций этих веществ (см. рис. 3). Таким образом, анальгетический эффект введения PEA и PGlyA на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α соизмерим с уровнем изменения ЛПНР после введения указанных веществ животным без предварительной блокады рецепторов.

При анализе параметров походки через 1 ч после введения PEA, SEA или PGlyA в дозе 1,5 мг/кг отмечено статистически значимое увеличение интенсивности отпечатка на 16,9 % (с 149,8 (127,9–159,5) до 167,7 (157,8–186,7); $p = 0,02$), 18,5 % (с 139,0 (133,6–147,8) до 176,6 (147,9–187,6); $p = 0,02$) и 12,1 % (с 138,8 (116,5–149,9) до 151,9 (126,9–167,3); $p = 0,02$) по сравнению с исходными значениями соответственно (см. рис. 4).

Однократное введение PEA в сочетании с антагонистом рецепторов PPAR α на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва оказывало антиноцицептивное действие, которое выражалось в повышении интенсивности отпечатка на 17,8 % (с 145,3 (109,2–159,9) до 161,8 (157,6–167,6); $p = 0,23$) по сравнению с таковой до их введения, однако результаты не были статистически значимыми (см. рис. 4). В то же время инъекции SEA и PGlyA на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α в указанный период исследования обеспечивали более выраженное анальгетическое действие, что проявлялось в устранении механической гипералгезии после лигирования седалищного нерва, повышении среднегрупповых значений интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности на 23,1 % (с 145,4 (134,1–174,3) до 199,5 (186,6–202,3); $p = 0,05$) для SEA и 26,3 % (с 156,6 (133,1–164,4) до 200,0 (178,6–201,8); $p = 0,018$) для PGlyA (см. рис. 4).

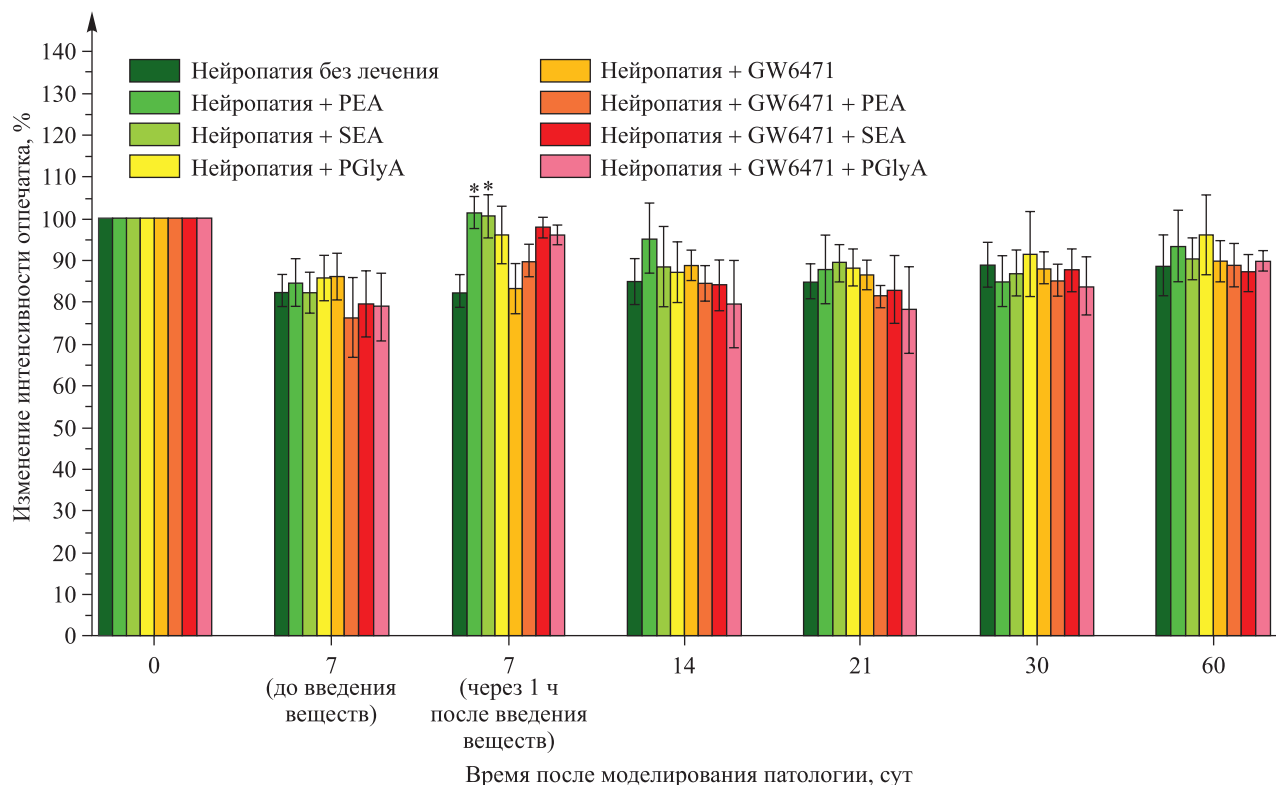


Рис. 4. Изменение интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией в результате внутрибрюшинного введения GW6471 в дозе 1 мг/кг и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва. Знаком * отмечены статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + PEA» ($p < 0,05$)

Fig. 4. Change in intensity of the ipsilateral limb imprint in rats with peripheral neuropathy as a result of intraperitoneal injection of GW6471 at a dose of 1 mg/kg and FAAs (PEA, SEA, PGlyA) at a dose of 1.5 mg/kg on the 7th day after ligation of the sciatic nerve. Sign * marked statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + PEA» ($p < 0.05$)

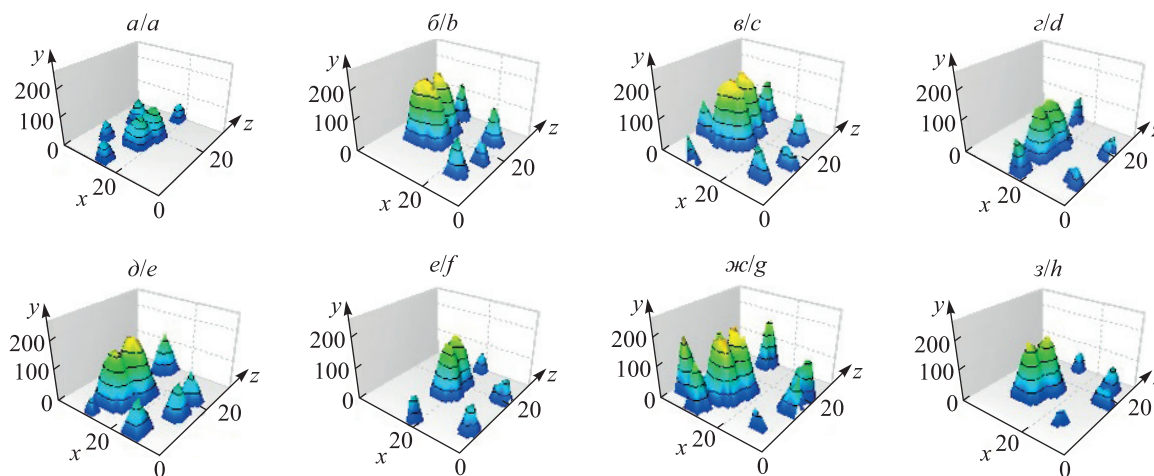


Рис. 5. Интенсивность 3D-отпечатка ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией в результате внутрибрюшинного введения GW6471 в дозе 1 мг/кг и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва: а – нейропатия без лечения; б – нейропатия + PEA; в – нейропатия + SEA; г – нейропатия + PGlyA; д – здоровые животные; е – нейропатия + GW6471 + PEA; ж – нейропатия + GW6471 + SEA; з – нейропатия + GW6471 + PGlyA. Обозначения осей: y – интенсивность отпечатка; x – длина отпечатка, усл. ед.; z – ширина отпечатка, усл. ед.

Fig. 5. Intensity of 3D impression of the ipsilateral limb in rats with peripheral neuropathy as a result of intraperitoneal injection of GW6471 at a dose of 1 mg/kg and FAAs (PEA, SEA, PGlyA) at a dose of 1.5 mg/kg on the 7th day after ligation of the sciatic nerve: а – neuropathy without treatment; б – neuropathy + PEA; в – neuropathy + SEA; г – neuropathy + PGlyA; д – healthy animals; е – neuropathy + GW6471 + PEA; ж – neuropathy + GW6471 + SEA; з – neuropathy + GW6471 + PGlyA. Designation of axes: y – the intensity of the limb imprint; x – the length of the limb imprint, arbitrary units; z – the width of the limb imprint, arbitrary units

На рис. 5 отражена интенсивность 3D-отпечатка, представленная переходом от синего к красному цвету. Как видно из 3D-графиков, при нарастании уровня аллодинии после моделирования нейропатии седалищного нерва наблюдаются снижение силы надавливания на поверхность и изменение положения лапы. Животные наступают на пальцы в меньшей степени, чем на пяtku. При сравнении интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности в группах животных с периферической нейропатией после однократного индивидуального введения FAAs и после инъекции FAAs на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α отмечено равнозначное анальгезирующее действие, которое сопоставимо с данными, полученными для контралатеральной конечности.

При однократном внутрибрюшинном введении FAAs (PEA, SEA, PGlyA) животным с периферической нейропатией на 7-е сутки после моделирования патологии наблюдалось достоверное увеличение площади отпечатка ипсилатеральной конечности на 32,5 % (с 0,6 (0,4–0,7) до 0,9 (0,7–1,0) см²; $p = 0,03$) для PEA, 32,8 % (с 0,8 (0,5–0,9) до 1,1 (1,0–1,3) см²; $p = 0,02$) для SEA и 15,4 % (с 0,5 (0,5–0,6) до 0,6 (0,5–0,8) см²; $p = 0,05$) для PGlyA (см. рис. 6). Антиноцицептивный эффект носил обратимый характер, и на 14-е сутки после операции площадь отпечатка вернулась к уровню до введения FAAs ($p < 0,05$).

В случае применения FAAs на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α отмечалось статистически значимое увеличение площади отпечатка травмированной конечности относительно таковой до их введения. Так, инъекция GW6471 с последующим внутрибрюшинным введением PEA приводила к статистически значимому увеличению площади отпечатка ипсилатеральной конечности на 17,5 % (с 0,8 (0,7–1,1) до 1,0 (0,8–1,0) см²; $p = 0,02$), тогда как использование PGlyA в аналогичных условиях повышало

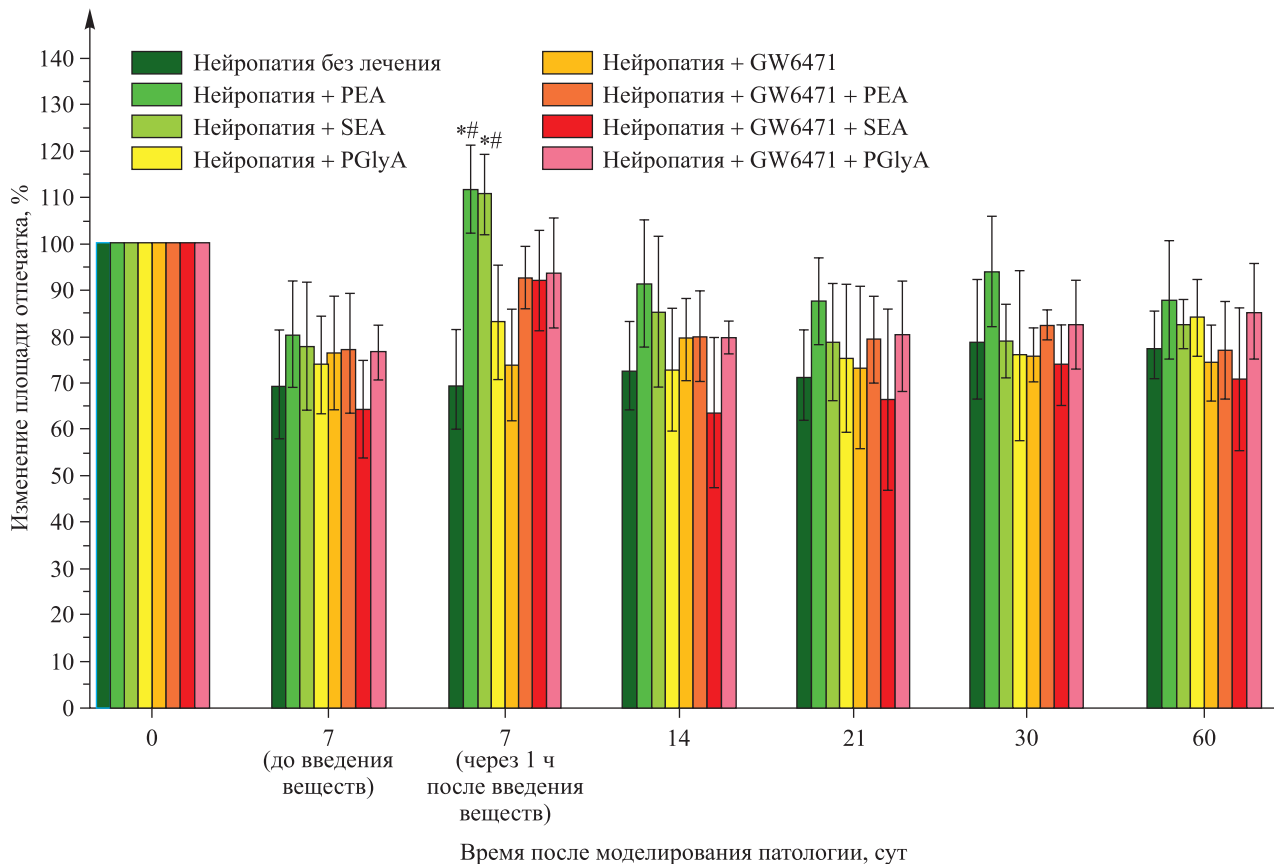


Рис. 6. Изменение площади отпечатка ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией в результате внутрибрюшинного введения GW6471 в дозе 1 мг/кг и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва.

Знаком * отмечены статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + PEA», знаком # – статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + SEA» (в обоих случаях $p < 0,05$)

Fig. 6. Change in area of the ipsilateral limb imprint in rats with peripheral neuropathy as a result of intraperitoneal injection of GW6471 at a dose of 1 mg/kg and FAAs (PEA, SEA, PGlyA) at a dose of 1.5 mg/kg on the 7th day after ligation of the sciatic nerve.

Sign * marked statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + PEA», sign # – statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + SEA» (in both cases, $p < 0.05$)

вышеупомянутый показатель на 19,1 % (с 0,9 (0,8–1,0) до 1,0 (0,9–1,1) см²; $p = 0,039$), а использование SEA – на 31,3 % (с 0,8 (0,7–0,8) до 1,1 (0,8–1,2) см²; $p = 0,04$) (см. рис. 6), при этом восстановления площади отпечатка до исходного уровня не происходило.

Были зарегистрированы достоверные различия между группами «нейропатия + PEA» и «нейропатия + GW6471 + PEA» (18,7 % ($p = 0,03$)), а также между группами «нейропатия + SEA» и «нейропатия + GW6471 + SEA» (19,3 % ($p = 0,02$)) на 7-е сутки после операции (см. рис. 6).

Статистически значимых изменений исследуемых параметров для контралатеральной конечности крыс с периферической нейропатией после введения вышеупомянутых веществ не выявлено.

При анализе скорости переноса конечности у крыс с нейропатией после внутрибрюшинного введения исследуемых FAAs отмечено статистически значимое увеличение данного показателя на 21,1 % (с 85,9 (73,8–91,3) до 104,7 (92,3–117,6) см/с; $p = 0,02$) для PEA, 22,3 % (с 97,1 (81,8–101,9) до 104,9 (100,4–109,1) см/с; $p = 0,04$) для SEA и 24,2 % (с 87,5 (65,8–97,0) до 109,3 (104,2–114,4) см/с; $p = 0,02$) для PGlyA (см. рис. 7). В то же время при анализе выбранных паттернов походки на контралатеральной конечности подобного эффекта не обнаружено.

Внутрибрюшинное введение исследуемых FAAs на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α статистически значимо увеличивало скорость переноса ипсилатеральной конечности у крыс на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва. Инъекция PEA в сочетании с GW6471 повышала данный показатель на 18,2 % (с 145,3 (109,2–159,9) до 161,8 (157,6–167,6) см/с; $p = 0,027$). Введение SEA на фоне фармакологической блокады рецепторов PPAR α увеличивало скорость переноса ипсилатеральной конечности на 23,1 % (с 145,4 (134,1–174,3) до 199,5 (186,6–202,3) см/с; $p = 0,045$), а введение PGlyA – на 26,3 % (с 156,6 (133,1–164,4) до 200,0 (178,6–201,8) см/с; $p = 0,017$) (см. рис. 7).

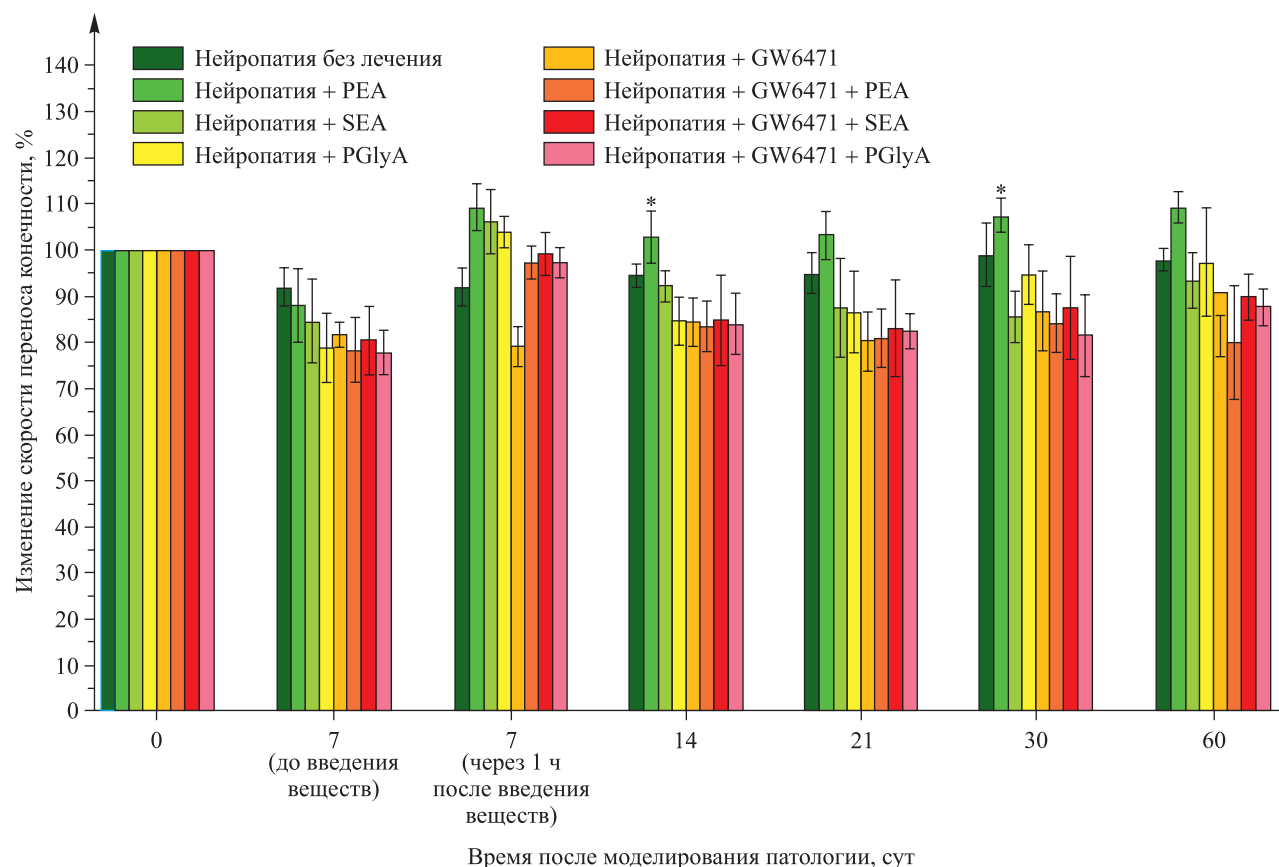


Рис. 7. Изменение скорости переноса ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией в результате внутрибрюшинного введения GW6471 в дозе 1 мг/кг и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки после лигирования седалищного нерва. Знаком * отмечены статистически значимые различия по сравнению с группой «нейропатия + GW6471 + PEA» ($p < 0,05$)

Fig. 7. Change in the transfer speed of the ipsilateral limb in rats with peripheral neuropathy as a result of intraperitoneal injection of GW6471 at a dose of 1 mg/kg and FAAs (PEA, SEA, PGlyA) at a dose of 1.5 mg/kg on the 7th day after ligation of the sciatic nerve. Sign * marked statistically significant differences compared to the group «neuropathy + GW6471 + PEA» ($p < 0.05$)

Отмечены статистически значимые различия между группами «нейропатия + РЕА» и «нейропатия + GW6471 + РЕА» (20,2 % ($p = 0,018$) и 23,3 % ($p = 0,04$)) на 14-е и 30-е сутки после операции (см. рис. 7).

При анализе взаимосвязи параметров ноцицептивной чувствительности и паттернов походки с расчетом коэффициентов корреляции Спирмена (табл. 2) достоверные корреляционные связи выявлены во всех экспериментальных группах.

Таблица 2

**Коэффициенты корреляции ноцицептивной чувствительности
и паттернов походки у групп крыс с периферической нейропатией**

Table 2

**Correlation coefficients of the nociceptive sensitivity
and gait patterns in groups of rats with peripheral neuropathy**

Группы животных	Площадь отпечатка		Интенсивность отпечатка		Скорость переноса конечности	
	Корреляция с ПНР	Корреляция с ЛПНР	Корреляция с ПНР	Корреляция с ЛПНР	Корреляция с ПНР	Корреляция с ЛПНР
Нейропатия + РЕА	0,61	0,42	0,81*	0,80*	0,37	0,02
Нейропатия + SEA	0,73	0,98*	0,87*	0,83*	0,77*	0,91*
Нейропатия + PGlyA	0,95*	0,95*	0,96*	0,92*	0,84*	0,77*
Нейропатия + GW6471 + РЕА	0,96*	0,97*	0,89*	0,86*	0,88*	0,84*
Нейропатия + GW6471 + SEA	0,93*	0,96*	0,88*	0,91*	0,92*	0,87*
Нейропатия + GW6471 + PGlyA	0,93*	0,96*	0,83*	0,88*	0,96*	0,94*

*Достоверная связь между сравниваемыми параметрами ($p < 0,05$).

Паттерны походки статистически значимо коррелировали как с ПНР, так и с ЛПНР. Наименьшие значения коэффициента корреляции отмечены в отношении скорости переноса конечности и ЛПНР у всех экспериментальных групп, что может указывать на слабую взаимосвязь между данными показателями ввиду регистрации ответной реакции на разные по предъявлению стимулы – термический (ЛПНР) и механический (скорость переноса конечности).

Анализ имеющихся литературных данных. Механизмы анальгетического действия FAAs до конца не раскрыты. По известной на сегодняшний день информации, в достаточной мере исследования проведены лишь для РЕА, тогда как способ реализации анальгетических эффектов SEA и PGlyA остается малоизученным. Согласно данным литературы выявлены несколько механизмов действия РЕА. Первый механизм предполагает, что РЕА посредством стимулирования PPAR α снижает активацию тучных клеток на участках травмированных нервов и способствует высвобождению провоспалительных медиаторов [8]. Также имеются доказательства, что тучные клетки находятся в непосредственной близости от нервных окончаний и их дегрануляция может усилить ноцицептивный сигнал. В связи с этим периферические тучные клетки считаются провоспалительными и проноцицептивными. Вторым механизмом является так называемый эффект свиты: РЕА усиливает иммуномодулирующие и анальгетические эффекты анандамида (AEA), повышая его сродство к рецепторам CB1R. Кроме того, РЕА является субстратным конкурентом AEA для гидролизующего фермента FAAH и, таким образом, ингибирует его деградацию [14]. Третий механизм основан на способности РЕА непосредственно стимулировать орфанные рецепторы GPR55 и ядерные рецепторы PPAR α и PPAR γ [3].

В отличие от PPAR α экспрессия PPAR β или PPAR γ в ганглиях дорсальных корешков остается неисследованной. Несмотря на малое количество данных о распределении PPAR α на ноцицептивных первичных афферентах (А δ - и С-волокна), известные анальгетические эффекты агонистов PPAR α , вводимых локально животным с моделями воспалительной и нейропатической боли, предполагают, что активация PPAR α в ганглиях дорсальных корешков приводит к подавлению возбуждения ноцицептивных афферентных волокон [8]. Согласно литературным источникам были проведены исследования, которые отражают роль рецепторов PPAR α в ноцицептивной чувствительности. Так, в работе [15] показано подавление болевых ощущений, вызванных формалином, после введения агониста PPAR α в дозе 0,1–10,0 мкг на 10 мкл швейцарским мышам.

В исследовании [16] установлено, что сочетанное подкожное введение GW7647 (агонист PPAR α) и РЕА в дозах 50 мг/кг снижает гипералгезию в модели нейропатической боли при хроническом ущемлении седалищного нерва.

Авторами статьи [17] отмечено, что у мышей линии C57BL, которые лишены рецепторов PPAR α , наблюдается более высокая чувствительность к термическим и механическим стимулам, а также холодовая и механическая аллодиния и тепловая гипералгезия.

В исследовании [18], посвященном нейропатической аллодинии, вызываемой паклитакселом, показано, что введение РЕА в дозе 30 мг/кг оказывало антиаллодиническое действие, а инъекция GW6471 в дозе 2 мг/кг отменяла данный эффект.

Представленные результаты работы, проводимой в рамках диссертационного исследования, уточняют возможное участие FAAs в условиях фармакологической блокады ядерных рецепторов PPAR α в изменении ноцицептивных реакций и паттернов походки у животных с экспериментальной периферической нейропатией и являются новыми сведениями в этой области.

В ходе анализа экспериментальных данных установлено, что однократное внутривбрюшинное введение здоровым крысам GW6471 в дозе 1 мг/кг не вызывало достоверных изменений ПНР, ЛПНР и паттернов походки. В результате проведенных исследований выявлено, что введение крысам с периферической нейропатией на 7-е сутки после операции FAAs в дозе 1,5 мг/кг на фоне блокады рецепторов PPAR α (GW6471 в дозе 1 мг/кг) приводило к статистически значимому повышению ноцицептивной чувствительности и параметров походки относительно значений указанных показателей у экспериментальных животных со сформированной патологией до инъекции исследуемых веществ.

Поскольку рецепторы PPAR α были заблокированы посредством введения антагониста, а антиаллодиническое действие выявлено при регистрации ноцицептивных реакций и паттернов походки, можно предположить, что данный эффект опосредуется через взаимодействие FAAs с PPAR γ , но возможно вовлечение и других рецепторных систем, отличных от PPARs, в частности орфанных (GPR18, GPR55), каннабиноидных (CBR1 и CBR2) и ванилоидных (TRPV1) рецепторов.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что однократное внутривбрюшинное введение здоровым крысам GW6471 (антагониста ядерных рецепторов PPAR α , связанных с G-белком) в дозе 1 мг/кг не вызывало достоверных изменений ПНР, ЛПНР и паттернов походки.

Инъекция крысам с нейропатией седалищного нерва FAAs в дозе 1,5 мг/кг при фармакологической блокаде рецепторов PPAR α через 1 ч оказывала выраженное анальгезирующее действие, что подтверждает статистически значимое увеличение ПНР и ЛПНР. Схожий результат зафиксирован при регистрации паттернов походки, а именно отмечено увеличение интенсивности и площади отпечатка, а также скорости переноса конечности после введения исследуемых веществ. Однако для дальнейшего выяснения способов реализации антиноцицептивного действия данного комплекса соединений необходимы дополнительные исследования с использованием методов иммуногистохимии.

Библиографические ссылки

1. Di Cesare Mannelli L, D'Agostino G, Pacini A, Russo R, Zanardelli M, Ghelardini C, et al. Palmitoylethanolamide is a disease-modifying agent in peripheral neuropathy: pain relief and neuroprotection share a PPAR-alpha-mediated mechanism. *Mediators of Inflammation*. 2013;328797. DOI: 10.1155/2013/328797.
2. Доронькина АС, Михальчук АЛ, Губкин СВ, Молчанова АЮ, Богдан ВГ. Влияние амидов жирных кислот с этаноламином и глицином на ноцицептивные реакции и параметры походки крыс в норме и при экспериментальной периферической мононейропатии. *Вестні Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук*. 2022;19(4):364–374. DOI: 10.29235/1814-6023-2022-19-4-364-374.
3. Молчанова АЮ. *Эндоканнабиноидная система: физиология, патофизиология, терапевтический потенциал*. Улащик ВС, редактор. Минск: Беларуская навука; 2015. 211 с.
4. Дегтярев ВП, Раевская ОС. *Боль и обезболивание. Нейрофизиологические и нейрохимические механизмы*. Москва: МГМСУ; 2011. 96 с.
5. Мелик-Касумов ТБ, Павлють ТО, Жаворонок ИП, Антипова ОА, Пехтерева ЕИ, Василькевич АИ и др. Оценка антиноцицептивного действия амидов пальмитиновой кислоты. *Вестні Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук*. 2016;4:25–31.
6. Lyons DN, Zhang L, Danaher RJ, Miller CS, Westlund KN. PPAR γ agonists attenuate trigeminal neuropathic pain. *The Clinical Journal of Pain*. 2017;33(12):1071–1080. DOI: 10.1097/AJP.0000000000000509.
7. Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB $_1$, TRPV1 and PPAR γ receptors and neurotrophic factors. *Pain*. 2008;139(3):541–550. DOI: 10.1016/j.pain.2008.06.003.
8. Okine BN, Gaspar JC, Finn DP. PPARs and pain. *British Journal of Pharmacology*. 2019;176(10):1421–1442. DOI: 10.1111/bph.14339.
9. Caillaud M, Patel NH, White A, Wood M, Contreras KM, Toma W, et al. Targeting peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) to reduce paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2021;93:172–185. DOI: 10.1016/j.bbi.2021.01.004.
10. Hestehave S. The influence of rat strain of the development of neuropathic pain and comorbid anxio-depressive behavior after nerve injury. *Scientific Reports*. 2020;10(1):218–225. DOI: 10.1038/s41598-020-77640-8.

11. Menéndez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002;113(1):91–97. DOI: 10.1016/s0165-0270(01)00483-6.
12. Santos-Nogueira E, Redondo Castro E, Mancuso R, Navarro X, Randall – Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 2012;29(5):898–904. DOI: 10.1089/neu.2010.1700.
13. Heinzel J, Längle G, Oberhauser V, Hausner T, Kolbenschlag J, Prahm C, et al. Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review. *Journal of Neuroscience Methods*. 2020;345:108889. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2020.108889.
14. Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents and Actions*. 1993;39(1 supplement):C145–C147. DOI: 10.1007/BF01972748.
15. Russo R, LoVerme J, La Rana G, D’Agostino G, Sasso O, Calignano A, et al. Synergistic antinociception by the cannabinoid receptor agonist anandamide and the PPAR- α receptor agonist GW7647. *European Journal of Pharmacology*. 2007;566(1–3):117–119. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.03.007.
16. LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, et al. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;319(3):1051–1061. DOI: 10.1124/jpet.106.111385.
17. Ruiz-Medina J, Flores JA, Tasset I, Tunez I, Valverde O, Fernandez-Espejo E. Alteration of neuropathic and visceral pain in female C57BL/6J mice lacking the PPAR- α gene. *Psychopharmacology*. 2012;222(3):477–488. DOI: 10.1007/s00213-012-2662-8.
18. Donvito G, Wilkerson JL, Damaj MI, Lichtman AH. Palmitoylethanolamide reverses paclitaxel-induced allodynia in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;359(2):310–318. DOI: 10.1124/jpet.116.236182.

References

1. Di Cesare Mannelli L, D’Agostino G, Pacini A, Russo R, Zanardelli M, Ghelardini C, et al. Palmitoylethanolamide is a disease-modifying agent in peripheral neuropathy: pain relief and neuroprotection share a PPAR-alpha-mediated mechanism. *Mediators of Inflammation*. 2013;328797. DOI: 10.1155/2013/328797.
2. Doronkina AS, Mikhachuk AL, Goubkin SV, Molchanova AY, Bogdan VG. Effects of fatty acid amides with ethanolamine and glycine on nociceptive reactions and gait parameters in rats in normal and experimental peripheral mononeuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Series*. 2022;19(4):364–374. DOI: 10.29235/1814-6023-2022-19-4-364-374. Russian.
3. Molchanova AY. *Endokannabinoidnaya sistema: fiziologiya, patofiziologiya, terapevticheskii potentsial* [Endocannabinoid system: physiology, pathophysiology, therapeutic potential]. Ulashchik VS, editor. Minsk: Belaruskaja navuka; 2015. 211 p. Russian.
4. Degtyarev VP, Raevskaya OS. *Bol’ i obezbolivanie. Neurofiziologicheskie i neurokhimicheskie mekhanizmy* [Pain and pain relief. Neurophysiological and neurochemical mechanisms]. Moscow: Moscow State University of Medicine and Dentistry; 2011. 96 p. Russian.
5. Melik-Kasumov TB, Pavlut TO, Zhavoronok IP, Antipova OA, Pehtereva EI, Vasilkevich AI, et al. Assessment of antinociceptive effects of palmitic acid amides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Series*. 2016;4:25–31. Russian.
6. Lyons DN, Zhang L, Danaher RJ, Miller CS, Westlund KN. PPAR γ agonists attenuate trigeminal neuropathic pain. *The Clinical Journal of Pain*. 2017;33(12):1071–1080. DOI: 10.1097/AJP.0000000000000509.
7. Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB $_1$, TRPV1 and PPAR γ receptors and neurotrophic factors. *Pain*. 2008;139(3):541–550. DOI: 10.1016/j.pain.2008.06.003.
8. Okine BN, Gaspar JC, Finn DP. PPARs and pain. *British Journal of Pharmacology*. 2019;176(10):1421–1442. DOI: 10.1111/bph.14339.
9. Caillaud M, Patel NH, White A, Wood M, Contreras KM, Toma W, et al. Targeting peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) to reduce paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2021;93:172–185. DOI: 10.1016/j.bbi.2021.01.004.
10. Hestehave S. The influence of rat strain of the development of neuropathic pain and comorbid anxio-depressive behavior after nerve injury. *Scientific Reports*. 2020;10(1):218–225. DOI: 10.1038/s41598-020-77640-8.
11. Menéndez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002;113(1):91–97. DOI: 10.1016/s0165-0270(01)00483-6.
12. Santos-Nogueira E, Redondo Castro E, Mancuso R, Navarro X, Randall – Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 2012;29(5):898–904. DOI: 10.1089/neu.2010.1700.
13. Heinzel J, Längle G, Oberhauser V, Hausner T, Kolbenschlag J, Prahm C, et al. Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review. *Journal of Neuroscience Methods*. 2020;345:108889. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2020.108889.
14. Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents and Actions*. 1993;39(1 supplement):C145–C147. DOI: 10.1007/BF01972748.
15. Russo R, LoVerme J, La Rana G, D’Agostino G, Sasso O, Calignano A, et al. Synergistic antinociception by the cannabinoid receptor agonist anandamide and the PPAR- α receptor agonist GW7647. *European Journal of Pharmacology*. 2007;566(1–3):117–119. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.03.007.
16. LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, et al. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;319(3):1051–1061. DOI: 10.1124/jpet.106.111385.
17. Ruiz-Medina J, Flores JA, Tasset I, Tunez I, Valverde O, Fernandez-Espejo E. Alteration of neuropathic and visceral pain in female C57BL/6J mice lacking the PPAR- α gene. *Psychopharmacology*. 2012;222(3):477–488. DOI: 10.1007/s00213-012-2662-8.
18. Donvito G, Wilkerson JL, Damaj MI, Lichtman AH. Palmitoylethanolamide reverses paclitaxel-induced allodynia in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;359(2):310–318. DOI: 10.1124/jpet.116.236182.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 581.2

ВИРУЛЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПЕКТОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТЕНИЙ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

ШАО ЧЭНЮЕ¹⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

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

Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri* и *P. brasiliense*, выделенные из растений на территории Беларуси, различались по способности поражать ткани картофеля, моркови, лука и пекинской капусты при искусственном заражении. Высоковирулентными оказались штаммы видов *P. carotovorum* и *P. brasiliense*. Слабой вирулентностью характеризовались бактерии *P. parmentieri*, что выражалось в низкой эффективности заражения растений лука, моркови, пекинской капусты и в меньших, чем у других исследованных видов бактерий, показателях мацерацирующей и пектатлиазной активности.

Ключевые слова: мягкая гниль; вирулентность; пектатлиаза; картофель; *P. brasiliense*; *P. parmentieri*; *P. carotovorum*.

Образец цитирования:

Шао Чэнюе, Евтушенко АН. Вирулентные свойства пектобактерий, выделенных из образцов растений на территории Беларуси. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:44–51.
EDN: RAKYZR

For citation:

Shao Chengyue, Evtushenkov AN. Virulent properties of pectobacteria isolated from plant samples on the territory of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:44–51. Russian.
EDN: RAKYZR

Авторы:

Шао Чэнюе – аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. Н. Евтушенко.

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

Authors:

Shao Chengyue, postgraduate student at the department of molecular biology, faculty of biology.

520095424@qq.com

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

evtushenkov@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0002-2755-6979>

VIRULENT PROPERTIES OF PECTOBACTERIA ISOLATED FROM PLANT SAMPLES ON THE TERRITORY OF BELARUS

SHAO CHENGYUE^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

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

Corresponding author: A. N. Evtushenkov (evtushenkov@bsu.by)

The phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri* and *P. brasiliense* isolated from plants on the territory of Belarus differed in their ability to infect potato, carrot, onion and Chinese cabbage tissues with artificial infection. Strains of species *P. carotovorum* and *P. brasiliense* turned out to be highly virulent. Bacteria *P. parmentieri* were characterised by low virulence, which was manifested in the low efficiency of infection of onion, carrot, Chinese cabbage plants and reduced macerating and pectate lyase activities.

Keywords: soft rot; virulence; pectate lyase; potato; *P. brasiliense*; *P. parmentieri*; *P. carotovorum*.

Введение

Бактерии родов *Dickeya* и *Pectobacterium* являются возбудителями черной ножки картофеля и мягкой гнили различных видов растений. Ранее они относились к группе *carotovora* [1], позже на основании анализа последовательностей генов 16S рРНК и основных белков были выделены как самостоятельные роды в новом семействе Pectobacteriaceae [2].

Пектобактерии имеют широкий круг хозяев и инфицируют как сельскохозяйственные культуры, так и декоративные растения (например, картофель, томаты, кукурузу, капусту, свеклу, салат, перец, морковь, хризантемы). Бактерии родов *Dickeya* и *Pectobacterium* включены в топ-10 фитопатогенных бактерий [3]. Только в европейских странах потери продукции сельского хозяйства от пектобактерий оцениваются в десятки миллионов долларов США [4; 5].

Мягкая гниль и черная ножка картофеля считаются болезнями, передаваемыми семенными клубнями. Источником инфекции могут быть почва, остатки растений, насекомые, нематоды или сельскохозяйственные машины [6; 7]. Мягкая гниль проявляется в мацерации внутренних тканей клубней картофеля, а черная ножка характеризуется поражением тканей основания стебля с последующим хлорозом, увяданием листьев и снижением образования клубней [8]. Эти бактериозы возникают в результате действия на стенки растительных клеток комплекса ферментов, таких как пектиназы, целлюлазы и протеазы [9].

В настоящее время эффективные средства контроля мягкой гнили и черной ножки картофеля отсутствуют [5]. Для уменьшения вреда от патогенов осуществляют посев качественными клубнями (проверка на заражение) и удаление зараженных растений в период вегетации. Во многих странах налажены регулярный мониторинг видового состава бактерий родов *Dickeya* и *Pectobacterium* на растениях картофеля и изучение их вирулентности, что позволяет повысить эффективность контроля посевного материала [10].

Бактерии семейства Pectobacteriaceae являются доминирующими возбудителями мягкой гнили овощей и черной ножки картофеля в нашем регионе [11–13]. Интенсивный обмен посевным материалом приводит к быстрому распространению фитопатогенных бактерий, поэтому необходим постоянный мониторинг фитопатогенов для выявления новых опасных видов. Целью данного исследования являлось изучение вирулентных свойств бактерий семейства Pectobacteriaceae, выделенных ранее при бактериозах растений в Беларуси, для определения наиболее опасных фитопатогенов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 66 штаммов бактерий рода *Pectobacterium*, которые были выделены из образцов растений с симптомами мягкой гнили (клубни картофеля, морковь, капуста) и черной ножки (стебли картофеля), собранных на территории Беларуси. Штаммы идентифицированы до вида на основании изучения биохимических свойств и проведения ПЦР с видоспецифическими праймерами [13]. Бактерии выращивали при температуре 28 °С на картофельном агаре или полноценной питательной среде (LB).

Заражение растений. Бактерии выращивали в жидкой среде LB в течение ночи, центрифугировали, промывали 0,85 % раствором NaCl, ресуспендировали в том же растворе до оптической плотности при длине волны 600 нм, соответствующей плотности суспензии $3 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл. Клубни картофеля

(сорт Палац) поверхностно стерилизовали 70 % этанолом, затем вводили шприцем 20 мкл бактериальной суспензии и изолировали рану пленкой Parafilm (*Ancor Flexibles North America*, США). Зараженные клубни картофеля помещали в эксикатор при температуре 28 °С и относительной влажности воздуха от 70 до 80 %. Через 48 ч после инокуляции определяли массу мацерированной ткани и сохраняли образцы при температуре –20 °С до измерения ферментативной активности. Вымытые корнеплоды моркови стерилизовали 70 % этанолом, разрезали на ломтики толщиной 1 см с соблюдением стерильности и переносили на увлажненный стерильный фильтр в чашки Петри, далее вводили шприцем 20 мкл бактериальной суспензии и помещали образцы в термостат при температуре 28 °С на 48 ч. Заражение листьев пекинской капусты и чешуей лука осуществляли аналогично (путем введения 20 мкл бактериальной суспензии), после чего инкубировали образцы в течение 48 ч при температуре 28 °С. Через 48 ч после инокуляции измеряли площадь зоны поражения.

Анализ пектатлиазной активности в мацерированной ткани. К 500 мг образца мацерированной ткани в пробирке типа «эппендорф» добавляли 500 мкл дистиллированной воды, гомогенизировали наконечником пипетки и центрифугировали для получения неочищенного ферментного экстракта. Определение пектатлиазной активности осуществляли в супернатантах путем регистрации с помощью спектрофотометра увеличения оптической плотности реакционной смеси при длине волны 235 нм и температуре 30 °С, как описано ранее в работе [14].

Все исследования проводили в 3–5-кратной биологической повторности. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы *Excel 2010* (*Microsoft*, США). Данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего значения.

Результаты и их обсуждение

В работе изучали вирулентные свойства 66 штаммов 3 видов пектобактерий (*P. carotovorum*, *P. parmentieri* и *P. brasiliense*) путем заражения клубней картофеля, корнеплодов моркови, листьев пекинской капусты и чешуей лука. Характерные для мягкой гнили симптомы появлялись в течение 2 сут (рис. 1).

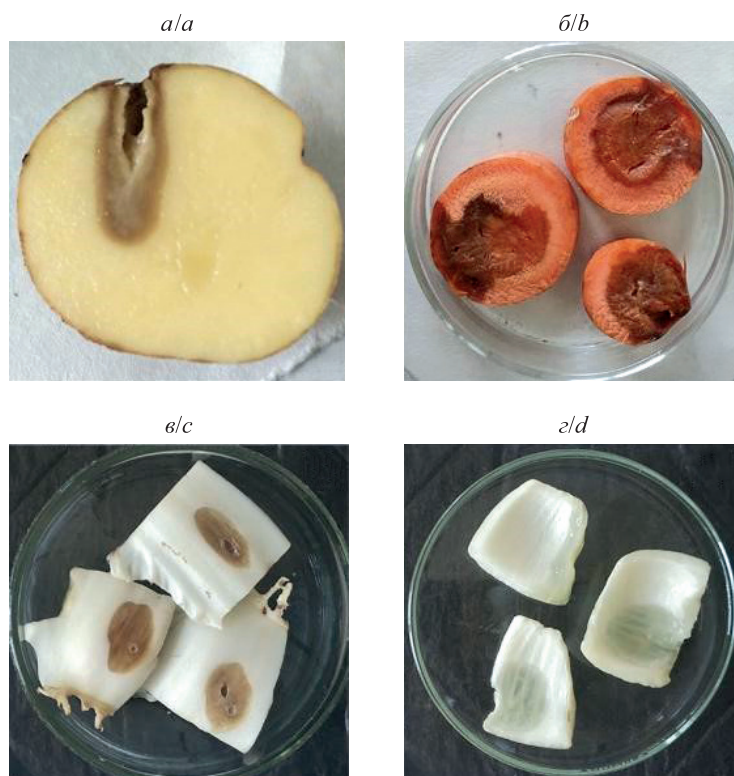


Рис. 1. Развитие мягкой гнили при заражении растений штаммом *P. carotovorum* 003-9: а – клубень картофеля; б – срезы корнеплода моркови; в – листья пекинской капусты; г – чешуи лука

Fig. 1. The development of soft rot when plants are infected with strain *P. carotovorum* 003-9: a – potato tuber; b – carrot root crop slices; c – Chinese cabbage leaves; d – onion scales

Ткани зараженных растений размягчались, зона поражения выглядела более темной и влажной. Контрольные образцы, инокулированные физиологическим раствором, не изменялись. Сравнение способности изучаемых штаммов 3 видов пектобактерий вызывать поражение тканей 4 видов растений показало, что наиболее широкий круг хозяев имеют штаммы вида *P. brasiliense*. Несмотря на то что все они были изолированы из пораженных вегетирующих стеблей и клубней картофеля [13], 6 штаммов (85,71 %), кроме картофеля, поражали морковь и пекинскую капусту, а 4 штамма (57,14 %) – все взятые в исследование сельскохозяйственные культуры. Обратная картина наблюдалась для штаммов вида *P. parmentieri*. Они также были выделены из картофеля [13] и успешно мацерировали ткани его клубней, но при этом поражение других растений могли вызывать менее 50 % исследуемых штаммов. Для бактерий вида *P. carotovorum* вне зависимости от источника их выделения характерен широкий круг хозяев, из которого несколько выпадает лук: только 26,19 % штаммов этого вида вызывали поражение чешуй лука. В целом можно отметить, что растения лука в наименьшей степени поражаются всеми 3 видами пектобактерий (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность заражения растений бактериями
P. carotovorum, *P. parmentieri* и *P. brasiliense*

Table 1

Effectiveness of infection of plants
with *P. carotovorum*, *P. parmentieri* and *P. brasiliense* bacteria

Вид бактерий	Общее количество штаммов	Доля штаммов, %, вызвавших поражение			
		клубней картофеля	срезов корнеплода моркови	листьев пекинской капусты	чешуй лука
<i>P. carotovorum</i>	42	100	88,10	97,62	26,19
<i>P. parmentieri</i>	17	100	29,41	47,06	11,76
<i>P. brasiliense</i>	7	100	85,71	85,71	57,14

Вирулентные свойства пектобактерий оценивали по степени мацерации зараженных тканей растений (рис. 2).

Как следует из рис. 2, изучаемые виды пектобактерий различались по степени мацерации тканей картофеля, моркови, пекинской капусты и лука. Более эффективно ткани испытуемых растений мацерировали бактерии *P. carotovorum* и *P. brasiliense*. В большей степени они поражали ткани пекинской капусты, моркови и картофеля, в меньшей степени – ткани лука. Бактерии *P. brasiliense* сильнее мацерировали ткани клубней картофеля и корнеплодов моркови даже в сравнении с бактериями *P. carotovorum*, что подтверждает ранее высказанное предположение об их высокой вирулентности [15]. Штаммы вида *P. parmentieri* значительно слабее мацерировали ткани моркови, пекинской капусты и лука, чем штаммы видов *P. carotovorum* и *P. brasiliense*. Исходя из этого, можно предположить, что бактерии *P. parmentieri* имели более низкую вирулентность.

В образцах пораженных тканей измеряли пектатлиазную активность. Пектатлиаза считается основным фактором вирулентности пектобактерий. Она представлена множеством изоферментов с большим спектром ферментативной активности, что позволяет бактериям поражать широкий круг растений различной таксономической принадлежности [9]. Пектатлиазная активность регистрировалась в образцах пораженных тканей всех исследуемых растений (табл. 2).

Таблица 2

Пектатлиазная активность бактерий *P. carotovorum*, *P. parmentieri* и *P. brasiliense*
в пораженных тканях растений, Е/мл

Table 2

Pectate lyase activity of bacteria *P. carotovorum*, *P. parmentieri* and *P. brasiliense*
in affected plant tissues, E/mL

Вид бактерий	Картофель	Морковь	Пекинская капуста	Лук
<i>P. carotovorum</i>	0,215 ± 0,029	0,215 ± 0,057	1,254 ± 0,307	0,070 ± 0,014
<i>P. parmentieri</i>	0,156 ± 0,027	0,027 ± 0,005	0,136 ± 0,017	0,015 ± 0,005
<i>P. brasiliense</i>	0,239 ± 0,034	0,079 ± 0,018	0,384 ± 0,08	0,019 ± 0,007

Примечание. Значения пектатлиазной активности, полученные для каждого штамма одного вида бактерий, суммировали и делили на число штаммов.

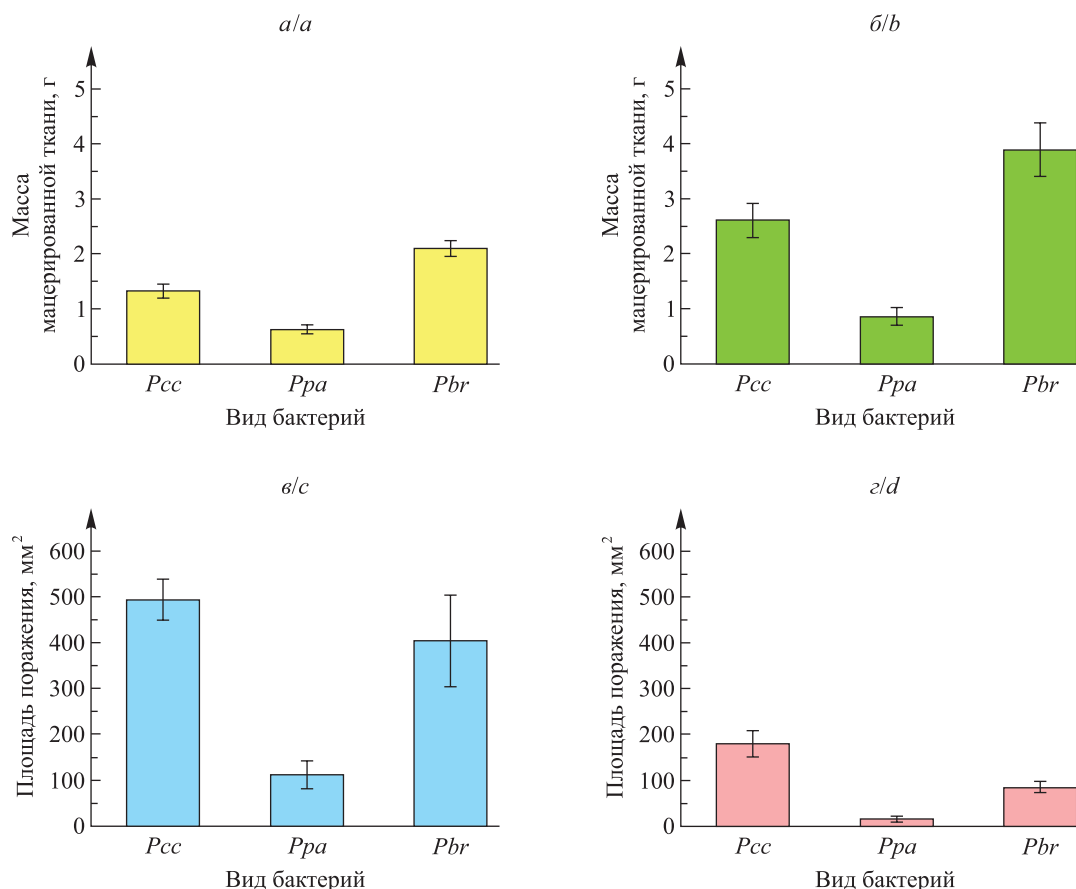


Рис. 2. Степень поражения растений бактериями *P. carotovorum* (*Pcc*), *P. parmentieri* (*Ppa*) и *P. brasiliense* (*Pbr*):
 а – клубни картофеля; б – корнеплоды моркови; в – листья пекинской капусты; г – чешуи лука.
 Для картофеля и моркови определяли массу мацерированной ткани, для пекинской капусты и лука измеряли площадь зоны поражения, так как мацерированная ткань не размягчалась, как при заражении картофеля и моркови. Данные, полученные для каждого штамма одного вида, суммировали и делили на число штаммов

Fig. 2. The degree of plant damage by bacteria *P. carotovorum* (*Pcc*), *P. parmentieri* (*Ppa*) and *P. brasiliense* (*Pbr*):
 а – potato tubers; б – carrot root crop slices; в – Chinese cabbage leaves; д – onion scales.
 For potato and carrot, the mass of macerated tissue was weighed, for Chinese cabbage and onion, the area of the affected zone was measured, since the macerated tissue did not soften, as when potato and carrot were infected.
 Data obtained for each strain of the same species were summarised for all strains and divided by the number of strains

Наименьшая пектатлиазная активность отмечалась в образцах растений, зараженных штаммами бактерий *P. parmentieri*, наибольшая – в образцах растений, зараженных штаммами бактерий *P. carotovorum*. Эти данные также свидетельствуют о том, что *P. parmentieri* является менее вирулентным видом, чем *P. carotovorum* и *P. brasiliense*.

Самые низкие значения пектатлиазной активности регистрировались при заражении пектобактериями лука, что коррелирует с площадью поражения тканей луковички и эффективностью заражения лука. Полученные результаты свидетельствуют о высокой устойчивости лука к заражению пектобактериями, это может быть связано с содержанием в его тканях соединений серы, обладающих сильными антибактериальными свойствами [16].

Выполненные исследования показывают высокую вирулентность распространенных в республике штаммов видов *P. carotovorum* и *P. brasiliense*. Они эффективно заражали картофель, морковь, пекинскую капусту, демонстрируя высокую мацерующую и пектатлиазную активность. Штаммы вида *P. parmentieri* по изученным характеристикам оказались менее вирулентными. Исследования, проведенные в Швейцарии, также выявили более низкую вирулентность местных штаммов вида *P. parmentieri* в сравнении с вирулентностью бактерий вида *P. carotovorum* и рода *Dickeya*, но более широкое их распространение [17]. Бактерии *P. parmentieri* и *P. brasiliense* впервые обнаружены в Беларуси при бактериозах

растений. Со времени открытия вида *P. brasiliense* как возбудителя черной ножки картофеля в Бразилии в 2004 г. патоген широко распространился по всему миру: он обнаружен в странах Азии (Китай, Япония), Африки (ЮАР, Кения, Алжир, Марокко), Европы (Нидерланды, Швейцария, Россия) [17–25]. Отмечается, что бактерии *P. brasiliense* отличаются высокой вирулентностью и, кроме картофеля, поражают другие овощные культуры. Вид *P. parmentieri* был установлен в 2016 г. Ревизия коллекционных штаммов пектобактерий выявила среди них штаммы *P. parmentieri*, выделенные ранее и идентифицированные как *P. carotovorum* [26]. В 2019 г. сообщалось о первом обнаружении в России на территории Московской области вида *P. parmentieri* в качестве возбудителя черной ножки картофеля [27]. Бактерии *P. parmentieri* широко распространены в Польше, где их изолировали еще в 1996 г., но идентифицировали как *P. carotovorum* [10].

Заключение

Выделенные из растений на территории Беларуси фитопатогенные бактерии *P. carotovorum*, *P. parmentieri* и *P. brasiliense* различались по способности поражать растения картофеля, моркови, лука и пекинской капусты при искусственном заражении. Штаммы видов *P. carotovorum* и *P. brasiliense* оказались высоковирулентными, а штаммы вида *P. parmentieri* характеризовались слабой вирулентностью, что проявлялось в низкой эффективности заражения растений лука, моркови, пекинской капусты и в меньших, чем у штаммов других исследованных видов бактерий, показателях мацерировочной и пектатлиазной активности. В то же время бактерии *P. parmentieri* эффективно заражали картофель и мацерировали ткани его клубней, что может свидетельствовать о специализации патогена к этой культуре. Из растений наиболее устойчивым к инфекции пектобактериями оказался лук: только отдельные штаммы пектобактерий (в основном *P. carotovorum* и *P. brasiliense*) вызывали бактериоз. Новый для Беларуси фитопатоген *P. brasiliense* успешно заражал клубни картофеля, морковь, пекинскую капусту и быстро мацерировал пораженные ткани. Получены данные о том, что *P. brasiliense* может поражать 19 видов растений из 10 семейств (однодольных и двудольных), но чаще всего патоген изолируют из растений семейства пасленовых [15]. Учитывая способность поражать широкий круг сельскохозяйственных культур и высокую вирулентность *P. brasiliense*, можно прогнозировать потенциальную опасность нового фитопатогена для посадок картофеля, томатов и перца в Беларуси.

Библиографические ссылки

1. Dye DW. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science*. 1968;11(4):590–607.
2. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the «Enterobacteriales»: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganeliaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
3. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(6):614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
4. Pérombelon MCM, Kelman A. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*. 1980;18:361–387. DOI: 10.1146/annurev.py.18.090180.002045.
5. Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*. 2011;60(3):385–399. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x.
6. Cappaert MR, Powelson ML, Franc GD, Harrison MD. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot erwinias for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology*. 1988;78(12):1668–1672. DOI: 10.1094/Phyto-78-1668.
7. Rossmann S, Dees MW, Perminow J, Meadow R, Brurberg MB. Soft rot Enterobacteriaceae are carried by a large range of insect species in potato fields. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018;84(12):e00281-18. DOI: 10.1128/AEM.00281-18.
8. Pérombelon MCM. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*. 2002;51(1):1–12. DOI: 10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x.
9. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology*. 1996;50:213–257. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.213.
10. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;159(2):309–325. DOI: 10.1007/s10658-020-02163-x.
11. Евтушенков АН, Фомичев ЮК. Пектатлиазная активность бактерий рода *Erwinia*. *Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География*. 1978;2:25–28.
12. Комар ЕИ, Шавель МИ, Песнякевич АГ. Идентификация грамотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий, вызывающих заболевания картофеля в Беларуси. *Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География*. 2014;2:54–60.
13. Шао Чэньюе, Горовик ЮН, Сидорова СГ, Евтушенков АН. Идентификация пектолитических видов бактерий, выделенных при бактериозах растений в Республике Беларусь. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:64–72. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-3-64-72.
14. Евтушенков АН, Шевчик ВЕ, Попова ЛБ, Фомичев ЮК. Очистка и свойства двух внеклеточных пектатлиаз штамма *Erwinia chrysanthemi* ENA49. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1986;22(2):187–192.
15. Oulghazi S, Sarfraz S, Zaczek-Moczydłowska MA, Khayi S, Ed-Dra A, Lekbach Y, et al. *Pectobacterium brasiliense*: genomics, host range and disease management. *Microorganisms*. 2021;9(1):106. DOI: 10.3390/microorganisms9010106.

16. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Scientific American*. 1985;252(3):114–119.
17. de Werra P, Debonneville C, Kellenberger I, Dupuis B. Pathogenicity and relative abundance of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in Switzerland: an epidemiological dichotomy. *Microorganisms*. 2021;9(11):2270. DOI: 10.3390/microorganisms9112270.
18. Meng Xianglong, Chai Ali, Shi Yanxia, Xie Xuewen, Ma Zhanhong, Li Baoju. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. *Plant Disease*. 2017;101(2):279–287. DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0763-RE.
19. van der Merwe JJ, Coutinho TA, Korsten L, van der Waals JE. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. 2010;126(2):175–185. DOI: 10.1007/s10658-009-9531-2.
20. Oulghazi S, Moumni M, Khayi S, Robic K, Sarfraz S, Lopez-Roques C, et al. Diversity of Pectobacteriaceae species in potato growing regions in Northern Morocco. *Microorganisms*. 2020;8(6):895. DOI: 10.3390/microorganisms8060895.
21. Naas H, Sebahia M, Orfei B, Rezzonico F, Buonauro R, Moretti C. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*. 2018;151(4):1027–1034. DOI: 10.1007/s10658-018-1438-3.
22. Onkendi EM, Moleleki LN. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. *European Journal of Plant Pathology*. 2014;139(3):557–566. DOI: 10.1007/s10658-014-0411-z.
23. Leite LN, de Haan EG, Krijger M, Kastelein P, van der Zouwen PS, van den Bovenkamp GW, et al. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. *New Disease Reports*. 2014;29(1):24. DOI: 10.5197/j.2044-0588.2014.029.024.
24. de Werra P, Bussereau F, Keiser A, Ziegler D. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland. *Plant Disease*. 2015;99(4):551. DOI: 10.1094/PDIS-07-14-0742-PDN.
25. Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroshnikov KK, et al. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(2):364. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN.
26. Khayi S, Cigna J, Chong TM, Quêtu-Laurent A, Chan K-G, Hélias V, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5379–5383. DOI: 10.1099/ijsem.0.001524.
27. Ngoc Ha VT, Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, et al. First report of *Pectobacterium parmentieri* causing stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(1):144. DOI: 10.1094/PDIS-11-17-1829-PDN.

References

1. Dye DW. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science*. 1968;11(4):590–607.
2. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the «Enterobacterales»: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
3. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(6):614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
4. Pérombelon MCM, Kelman A. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*. 1980;18:361–387. DOI: 10.1146/annurev.py.18.090180.002045.
5. Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*. 2011;60(3):385–399. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x.
6. Cappaert MR, Powelson ML, Franc GD, Harrison MD. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot erwinias for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology*. 1988;78(12):1668–1672. DOI: 10.1094/Phyto-78-1668.
7. Rossmann S, Dees MW, Perminow J, Meadow R, Brurberg MB. Soft rot Enterobacteriaceae are carried by a large range of insect species in potato fields. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018;84(12):e00281-18. DOI: 10.1128/AEM.00281-18.
8. Pérombelon MCM. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*. 2002;51(1):1–12. DOI: 10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x.
9. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology*. 1996;50:213–257. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.213.
10. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;159(2):309–325. DOI: 10.1007/s10658-020-02163-x.
11. Evtushenkov AN, Fomichev YuK. [Pectate lyase activity of the bacteria of the genus *Erwinia*]. *Vestnik BGU. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 1978;2:25–28. Russian.
12. Komar EI, Shavel' MI, Pesnyakevich AG. [Identification of the gramnegative pectolytic phytopathogenic bacteria provoking potato diseases in Belarus]. *Vestnik BGU. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2014;2:54–60. Russian.
13. Shao Chengyue, Gorovik YuN, Sidorova SG, Evtushenkov AN. Identification of pectolytic bacterial species isolated during plant bacteriosis in the Republic of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:64–72. Russian. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-3-64-72.
14. Evtushenkov AN, Shevchik VE, Popova LB, Fomichev YuK. [Purification and properties of two extracellular pectate lyases of the strain *Erwinia chrysanthemi* ENA49]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1986;22(2):187–192. Russian.
15. Oulghazi S, Sarfraz S, Zaczek-Moczydłowska MA, Khayi S, Ed-Dra A, Lekbach Y, et al. *Pectobacterium brasiliense*: genomics, host range and disease management. *Microorganisms*. 2021;9(1):106. DOI: 10.3390/microorganisms9010106.
16. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Scientific American*. 1985;252(3):114–119.
17. de Werra P, Debonneville C, Kellenberger I, Dupuis B. Pathogenicity and relative abundance of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in Switzerland: an epidemiological dichotomy. *Microorganisms*. 2021;9(11):2270. DOI: 10.3390/microorganisms9112270.
18. Meng Xianglong, Chai Ali, Shi Yanxia, Xie Xuewen, Ma Zhanhong, Li Baoju. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. *Plant Disease*. 2017;101(2):279–287. DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0763-RE.

19. van der Merwe JJ, Coutinho TA, Korsten L, van der Waals JE. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. 2010;126(2):175–185. DOI: 10.1007/s10658-009-9531-2.
20. Oulghazi S, Moumni M, Khayi S, Robic K, Sarfraz S, Lopez-Roques C, et al. Diversity of Pectobacteriaceae species in potato growing regions in Northern Morocco. *Microorganisms*. 2020;8(6):895. DOI: 10.3390/microorganisms8060895.
21. Naas H, Sebahia M, Orfei B, Rezzonico F, Buonauro R, Moretti C. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*. 2018;151(4):1027–1034. DOI: 10.1007/s10658-018-1438-3.
22. Onkendi EM, Moleleki LN. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. *European Journal of Plant Pathology*. 2014;139(3):557–566. DOI: 10.1007/s10658-014-0411-z.
23. Leite LN, de Haan EG, Krijger M, Kastelein P, van der Zouwen PS, van den Bovenkamp GW, et al. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. *New Disease Reports*. 2014;29(1):24. DOI: 10.5197/j.2044-0588.2014.029.024.
24. de Werra P, Bussereau F, Keiser A, Ziegler D. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland. *Plant Disease*. 2015;99(4):551. DOI: 10.1094/PDIS-07-14-0742-PDN.
25. Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroshnikov KK, et al. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(2):364. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN.
26. Khayi S, Cigna J, Chong TM, Quêtu-Laurent A, Chan K-G, Hélias V, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5379–5383. DOI: 10.1099/ijsem.0.001524.
27. Ngoc Ha VT, Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, et al. First report of *Pectobacterium parmentieri* causing stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(1):144. DOI: 10.1094/PDIS-11-17-1829-PDN.

Получена 06.03.2023 / исправлена 05.06.2023 / принята 05.06.2023.
Received 06.03.2023 / revised 05.06.2023 / accepted 05.06.2023.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНАКТИВАЦИИ ШИКИМАТКИНАЗЫ У РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ *BACILLUS SUBTILIS* 168wt21CSA И *B. SUBTILIS* 5434p4SA

ЧАО ЮЙ¹⁾, Е. О. КОРИК¹⁾, А. В. ЛАГОДИЧ¹⁾

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

Прототрофные штаммы *Bacillus subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434 трансформированы рекомбинантными конструкциями, содержащими фрагмент гена шикиматкиназы. За счет гомологичной рекомбинации осуществлена интеграция векторных конструкций в состав бактериальной хромосомы трансформируемых штаммов с образованием рекомбинантных штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. Конструктивные отличия между полученными штаммами обусловлены механизмом инактивации гена шикиматкиназы: при использовании конструкции рMTL21CΔaroK (штамм *B. subtilis* 168wt21CSA) реализована необратимая инактивация, а при использовании конструкции рMUTIN4ΔaroK (штамм *B. subtilis* 5434p4SA) – регулируемая (индуцируемая ИПТГ) экспрессия гена шикиматкиназы. Изучены морфофизиологические и биохимические особенности штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. У обоих штаммов в нативных условиях отмечены утрата прототрофных свойств и приобретение способности к повышенному синтезу шикимовой кислоты. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA продемонстрирован эффект восстановления прототрофных свойств у части клеток бактериальной популяции при активации экспрессии гена шикиматкиназы в присутствии ИПТГ. Выявлена зависимость изменения числа клеток с активированным геном шикиматкиназы от концентрации индуктора в среде. С применением метода ВЭЖХ показано, что у полученных штаммов-кандидатов шикимовая кислота синтезируется эффективнее, чем у соответствующих штаммов-предшественников: ее содержание в культуральной среде может достигать 564 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA и 732 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 5434p4SA, т. е. более чем в 2,5 раза превышать таковые значения для исходных штаммов.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*; гомологичная рекомбинация; инактивация шикиматкиназы; метаболический путь шикимата; тест на синтрофизм; индуктор ИПТГ; промотор *Pspac*.

Образец цитирования:

Чао Юй, Корик ЕО, Лагодич АВ. Оценка эффективности инактивации шикиматкиназы у рекомбинантных штаммов – продуцентов шикимовой кислоты *Bacillus subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:52–64.
EDN: MKDCZJ

For citation:

Chao Yu, Korik EO, Lahodzich AV. Evaluation of the efficiency of shikimate kinase inactivation in recombinational strains – producers of shikimic acid *Bacillus subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:52–64. Russian.
EDN: MKDCZJ

Авторы:

Чао Юй – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Лагодич.
Елена Олеговна Корик – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.
Алексей Викторович Лагодич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Chao Yu, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.
cygoodluck1989@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1647-3377>
Elena O. Korik, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.
korik@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-7888-4518>
Aliaksei V. Lahodzich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
lagodichav@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-6837-2439>

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF SHIKIMATE KINASE INACTIVATION IN RECOMBINATIONAL STRAINS – PRODUCERS OF SHIKIMIC ACID *BACILLUS SUBTILIS* 168wt21CSA AND *B. SUBTILIS* 5434p4SA

CHAO YU^a, E. O. KORIK^a, A. V. LAHODZICH^a

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

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

Prototrophic strains *Bacillus subtilis* 168wt and *B. subtilis* VKPM 5434 were transformed with recombinational constructs containing the fragment of shikimate kinase gene. The vector constructs were integrated into the bacterial chromosome of the transformed strains via homologous recombination resulting in recombinant strains *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA. The differences between the obtained strains are due to the mechanism of the shikimate kinase gene inactivation: complete knockout with the construct pMTL21CΔaroK (strain *B. subtilis* 168wt21CSA) and conditional (IPTG-inducible) expression of shikimate kinase gene with the construct pMUTIN4ΔaroK (strain *B. subtilis* 5434p4SA). The morphophysiological and biochemical features of the strains *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA were studied. For both strains under native conditions, the loss of prototrophic properties and the acquisition of ability to increase the synthesis of shikimic acid were noted. For the strain *B. subtilis* 5434p4SA, the effect of restoring prototrophic properties in some cells of the bacterial population was demonstrated upon activation of the expression of the shikimate kinase gene in the presence of IPTG. The dependence of the change in the number of cells with the activated shikimate kinase gene on the concentration of IPTG inductor in the medium was revealed. Using the HPLC method, we shown that mutant strains synthesise shikimic acid more efficiently than the corresponding parent strains: shikimic acid content in the culture medium can reach 564 μg/mL for the strain *B. subtilis* 168wt21CSA and 732 μg/mL for the strain *B. subtilis* 5434p4SA, i. e. more than 2.5 times exceed those for the original strains.

Keywords: *Bacillus subtilis*; homologous recombination; inactivation of shikimate kinase; the metabolic pathway of shikimat; syntrophism test; IPTG inductor; *Pspac* promoter.

Введение

Шикиматный путь включает стадии синтеза всех трех ароматических аминокислот микроорганизмами, в ходе которых образуются продукты 3-дегидрошикимовой, шикимовой и хоризмовой кислот и их производные (рис. 1) [1; 2]. Ароматические аминокислоты, к которым относятся L-тирозин, L-триптофан и L-фенилаланин, востребованы в сельском хозяйстве и медицинской практике, поскольку выполняют множество жизненно важных функций в организме. Так, L-тирозин является предшественником гормонов дофамина, адреналина, норадреналина и тироксина. Препараты L-тирозина используются в качестве усилителя вкуса, помогают улучшить внимание, память, концентрацию, поддерживают работу нервной системы, стабилизируют артериальное давление и частоту сердечных сокращений у пациентов с болезнью Паркинсона [3], позволяют решить косметические проблемы обесцвечивания кожи за счет повышения синтеза меланина у пациентов с витилиго [4; 5]. Второй незаменимой аминокислотой является L-триптофан. Потребность рынка в L-триптофане растет с каждым годом [6]. Это обусловлено его широким использованием в качестве важного компонента кормов для животных, а также применением при производстве противоопухолевых препаратов, таких как виолацеин и деоксивиолацеин [6]. Третья аминокислота, L-фенилаланин, входит в состав подсластителя аспартама, который назначается пациентам с сахарным диабетом и лицам с избыточной массой тела [7]. Шикимовая кислота является одним из наиболее востребованных и самых ранних идентифицированных соединений в пути биосинтеза ароматических аминокислот [8]. Ее выделяют из растительного сырья, преимущественно из плодов звездчатого аниса. Также разработаны подходы для микробиологического синтеза, реализованные с использованием различных представителей про- и эукариот, таких как *Escherichia coli* [9; 10], *Saccharomyces cerevisiae* [11; 12], *Pseudomonas viridans* [13] и *Bacillus subtilis* [14]. Возросший интерес к шикимовой кислоте и поиск высокопродуктивных штаммов для ее синтеза обусловлены исключительными свойствами данной кислоты: она выступает основным хиральным центром при синтезе ряда востребованных фармацевтических препаратов и соединений, наиболее известным из которых является препарат «Тамифлю», применяемый для борьбы с различными штаммами гриппа, включая штамм птичьего гриппа H5N1.

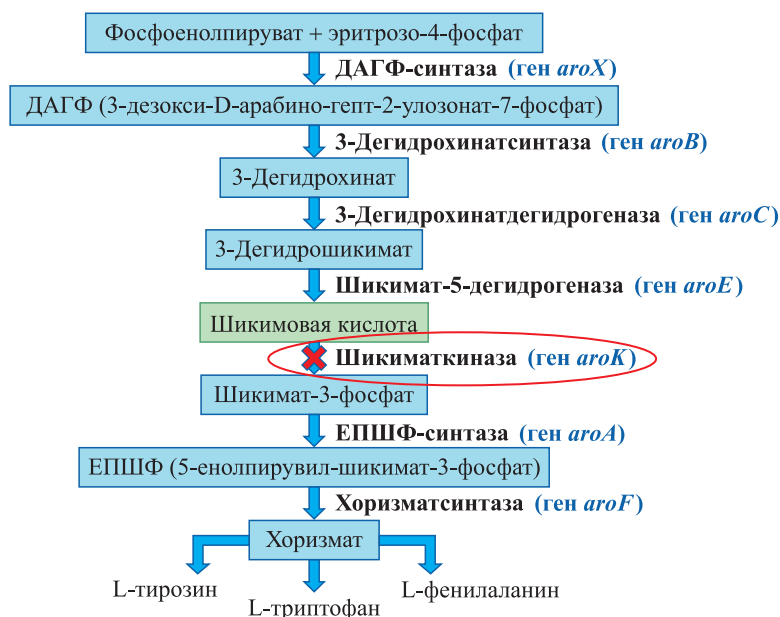


Рис. 1. Общая схема шикиматного пути у *B. subtilis* (составлено на основе данных источников [15–17] с дополнениями). Названия генов приведены для генома *B. subtilis* 168 (сборка NC_000964.3)

Fig. 1. General scheme of the shikimate pathway in *B. subtilis* (compiled on the basis of data from sources [15–17] with additions). The names of the genes are given for *B. subtilis* 168 genome (assembly NC_000964.3)

Ранее с использованием двух плазмидных конструкций (pMTL21CΔaroK [18; 19] и pMUTIN4ΔaroK [20; 21]), содержащих в своем составе области для гомологичной рекомбинации с бактериальной хромосомой клеток *B. subtilis*, были получены генно-инженерные штаммы-кандидаты, которые оценивались как штаммы – продуценты шикимовой кислоты. С применением метода гиперосмотической электротрансформации описанные выше конструкции введены в клетки штаммов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434 [19] и путем гомологичной рекомбинации интегрированы в бактериальную хромосому с образованием рекомбинантных штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA соответственно.

У используемых в работе исходных прототрофных штаммов шикиматный путь обеспечивает образование L-триптофана, L-фенилаланина и L-тирозина, а шикимовая кислота является промежуточным продуктом этого пути [14]. Однако у полученных штаммов-кандидатов работа гена шикиматкиназы (*aroK*) должна быть нарушена, что обусловит блокировку превращения шикимата в шикимат-3-фосфат и невозможность образования L-триптофана, L-фенилаланина и L-тирозина [21].

Предполагается, что избыток шикимовой кислоты (целевой продукт) в клетках штамма *B. subtilis* 168wt21CSA будет достигаться за счет нарушения целостности гена *aroK*. Это приведет к отсутствию шикиматкиназной активности в клетках полученного штамма и, как следствие, к накоплению шикимата в клетке в концентрациях, превышающих физиологическую норму, с последующим пассивным транспортом во внеклеточную среду. Сходный эффект должен проявляться и у штамма *B. subtilis* 5434p4SA, однако при получении этого штамма реализован ряд конструктивных особенностей. Так, интеграция конструкции pMUTIN4ΔaroK в состав бактериальной хромосомы должна была приводить не к нарушению целостности гена *aroK*, а к изменению эффективности его экспрессии путем постановки под индуцируемый ИПТГ промотор *Pspac*. Привнесение терминаторов t_1 , t_2 и t_0 перед промоторным регионом должно было исключить фоновую экспрессию гена *aroK* с других промоторов в отсутствие индукции промотора *Pspac*. Сниженная чувствительность к ретроингибированию ДАГФ-синтазы продуктами шикиматного пути, характерная для исходного штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434, должна была обеспечить более высокий выход шикимовой кислоты, чем у немутагенизированного штамма *B. subtilis* 168wt (рис. 2) [19].

Таким образом, при отсутствии в среде индуктора ИПТГ у штамма *B. subtilis* 5434p4SA должна отсутствовать экспрессия гена шикиматкиназы (*aroK*) и, как следствие, наблюдаться полная или частичная утрата шикиматкиназной активности в клетках, приводящая как к развитию ауксотрофности по ароматическим аминокислотам, так и к накоплению в клетке шикимата в концентрациях, превышающих физиологическую норму, с последующим пассивным транспортом во внеклеточную среду. Ожидается, что при наличии в среде индуктора ИПТГ промотор *Pspac* обеспечит экспрессию подконтрольного ему гена *aroK*, в случае его функциональной целостности это приведет к образованию функционально активного белкового продукта гена *aroK* и восстановлению шикиматкиназной активности в клетке.

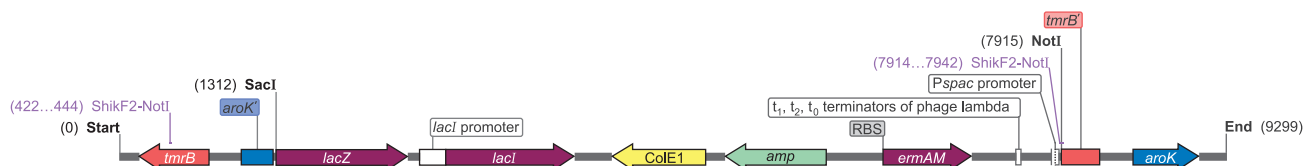


Рис. 2. Ожидаемая организация фрагмента бактериального генома клеток *B. subtilis* после интеграции плазмиды pMUTIN4ΔaroK.

Последовательности генов *tmrB* и *aroK* обозначены заливкой красного и синего цвета соответственно. Для восстановленных после интеграции последовательностей генов указано направление открытых рамок считывания. Фрагменты генов *tmrB* и *aroK*, представленные начальной областью открытой рамки считывания, обозначены заливкой красного и синего цвета и подписаны как *tmrB'* и *aroK'*

Fig. 2. Expected organisation of a fragment of the bacterial genome of *B. subtilis* after integration of the plasmid pMUTIN4ΔaroK.

The *tmrB* and *aroK* gene sequences are indicated by red and blue shading respectively. For the sequences obtained after integration are shown the direction of the open reading frames. Fragments represented by the initial region of the *tmrB* and *aroK* genes (open reading frames) are indicated by red and blue shading and signed as *tmrB'* and *aroK'*

Цель и задачи настоящего исследования заключались в следующем: путем гиперосмотической электро-трансформации ввести генетическую конструкцию pMTL21CΔaroK в клетки штамма *B. subtilis* 168wt и отобрать рекомбинантные клетки, полученные в результате интеграции конструкции pMTL21CΔaroK в состав бактериальной хромосомы; оценить эффективность экспрессии генов шикиматного пути с промотора Pspac в клетках штамма *B. subtilis* 5434p4SA; изучить морфофизиологические и биохимические особенности полученных штаммов (эффективность роста на средах различного состава, целостность шикиматного пути, эффективность синтеза и накопления шикимата).

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. В ходе работы использовались:

- штамм *B. subtilis* ВКПМ 5434 (является высокопродуктивным продуцентом L-триптофана, устойчивым к хлорамфениколу; предоставлен Национальным биоресурсным центром «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (Москва));
- штамм *B. subtilis* 5434p4SA (характеризуется тем, что ген *aroK* находится под контролем промотора Pspac, и отличается устойчивостью к эритромицину и хлорамфениколу; получен из штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 в результате интеграции конструкции pMUTIN4ΔaroK в бактериальную хромосому);
- штамм *B. subtilis* 168 (характеризуется мутацией гена *trpC2* [22]);
- штамм *B. subtilis* 168wt (является прототрофом; получен путем трансформации штамма *B. subtilis* 168 фрагментированным геномом *B. natto*);
- штамм *B. subtilis* 168wt21CSA (характеризуется необратимой инактивацией гена *aroK* и устойчивостью к хлорамфениколу; получен из штамма *B. subtilis* 168wt в результате интеграции конструкции pMTL21CΔaroK в бактериальную хромосому);
- плазмиды pMTL21CΔaroK и pMUTIN4ΔaroK (получены из плазмид pMTL21C [18] и pMUTIN4 [20] соответственно путем клонирования последовательности для обеспечения их интеграции в хромосому *B. subtilis* в целях инактивации гена *aroK* [19]).

Электротрансформация клеток штамма *B. subtilis* 168wt. Ночную культуру штамма *B. subtilis* 168wt, выращенную на среде LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl) [23], разводили средой для выращивания LBS (среда LB, содержащая 0,5 моль/л сорбитола) до достижения бактериальной культурой оптической плотности 0,01 при длине волны 600 нм, после чего культивировали при температуре 37 °C и скорости вращения 200 об/мин до достижения культурой оптической плотности 0,5 при длине волны 600 нм. Далее бактериальные клетки 10 мин охлаждали на льду, а затем осаждали центрифугированием в течение 10 мин при ускорении 5000 g. Полученный осадок промывали ледяной гиперосмотической средой для электротрансформации SMG (концентрация сорбита 1 моль/л, концентрация маннита 0,5 моль/л, объемная доля глицерина 1,5 %). После четырехкратной промывки клетки ресуспензировали в среде для электротрансформации (объем среды составлял 1,25 % от исходного объема культуры). Электрокомпетентные клетки либо сразу использовали для электротрансформации, либо замораживали и хранили при температуре –80 °C. Для электротрансформации брали 60 мкл электрокомпетентных клеток, добавляли к ним 65 нг ДНК плазмиды pMTL21CΔaroK (1,083 нг/мкл), а затем переносили полученную суспензию в охлажденную на льду кювету для электропорации с зазором между электродами 1 мм. После инкубации в течение 5 мин клетки подвергали воздействию одиночного электрического импульса

с использованием электропоратора Gene Pulser Xcell (*Bio-Rad*, США), при этом длительность импульса составляла 4,0–5,5 мс, напряженность электрического поля – 23 кВ/см, электрическая емкость – 25 мкФ, а сопротивление достигало 200 Ом. После воздействия электрического импульса в кювету вносили 1 мл среды для восстановления (среда LB, содержащая 0,5 моль/л сорбитола и 0,38 моль/л маннитола). По истечении 6 ч инкубации при температуре 37 °С клетки высевали на агаризованную среду LB с концентрацией эритромицина 5 мкг/мл и культивировали при температуре 37 °С. Отбор и анализ полученных трансформантов проводили на 2-е сутки культивирования [19].

Оценка продукции L-триптофана у различных штаммов *B. subtilis*. Для выявления у штаммов способности синтезировать L-триптофан были использованы различные варианты посева анализируемых штаммов и тест-культуры, реализуемые при постановке теста на синтрофизм (рис. 3), а также метод перпендикулярных штрихов, наиболее часто применяемый для оценки антагонистической активности [24].

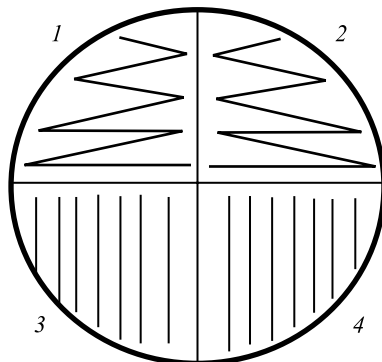


Рис. 3. Определение продукции L-триптофана с помощью ауксотрофического теста. В сектора 1 и 2 высевались анализируемые штаммы *B. subtilis* (непрерывный штрих), в сектора 3 и 4 высевалась тест-культура *B. subtilis* 168 trpC2 (параллельные штрихи)

Fig. 3. Determination of L-tryptophan production using the auxotrophic test. In sectors 1 and 2 were seeded the analysed strains of *B. subtilis* (solid stroke), in sectors 3 and 4 was seeded a test culture of *B. subtilis* 168 trpC2 (parallel strokes)

При использовании метода перпендикулярных штрихов на поверхность минимальной агаризованной среды в чашке Петри штрихом высевали исследуемый штамм и помещали чашку в термостат при температуре 37 °С. Продолжительность культивирования определяли по эффективности прироста биомассы продуцента. После завершения роста культуры и диффузии продуцируемого L-триптофана в агаризованную среду перпендикулярно к штриху выросшего штамма штрихами подсеивали тест-культуру, начиная от краев чашки, затем снова помещали чашку в термостат на 48 ч. Если изучаемый микроорганизм синтезировал и выделял диффундирующий в среде L-триптофан, то это было видно по ростостимулирующему действию в отношении используемой тест-культуры ауксотрофного штамма *B. subtilis* 168, зона роста которого начиналась в непосредственной близости от зоны роста самого продуцента. Чем дальше от точки роста целевого штамма был возможен рост тестируемого штамма, тем с меньшей эффективностью проявлялась инактивация целевого гена. При полной утрате шикиматкиназной активности исследуемыми штаммами рост тест-культуры, равно как и рост исследуемого штамма, был либо невозможен, либо возможен только в области непосредственного контакта с анализируемым образцом [24]. Сходные результаты получены при использовании схемы посева культур, применяемой в тесте на синтрофизм (см. рис. 3). Учет результатов проводили после 72 ч культивирования при температуре 37 °С.

Выявление в популяции доли клеток с активным промотором *Pspac*. Эффективность экспрессии (долю клеток, экспрессирующих ген шикиматкиназы с промотора *Pspac*) определяли при культивировании клеток в жидкой среде и на агаризованных средах. При приготовлении сред с заданными концентрациями индуктора использовали метод серийных разведений [24].

Определение эффективности индукции экспрессии гена шикиматкиназы при культивировании клеток в жидкой среде. В несколько стерильных пробирок вносили по 2 мл минимальной глюкозо-солевой среды SMS. В первую пробирку, содержащую 4 мл среды, вносили ИПТГ до достижения конечной концентрации 2,4 ммоль/л и тщательно перемешивали. После этого 2 мл жидкости из первой пробирки переносили во вторую пробирку и повторяли перемешивание, затем 2 мл содержимого второй пробирки переносили в третью пробирку и т. д. Из предпоследней пробирки удаляли 2 мл раствора для выравнивания объема и обеспечения одинаковых условий культивирования. При таком способе

разведения в каждой последующей пробирке концентрация ИПТГ была в 2 раза меньше, чем в предыдущей. Последняя пробирка со средой не содержала ИПТГ и являлась контрольной. Во все пробирки вносили по 0,1 мл суспензии отмытых бактериальных клеток с плотностью 10^4 – 10^5 клеток на 1 мл. Через 16–18 ч культивирования в оптимальных условиях проводили анализ роста микроорганизмов как путем визуальной оценки (помутнение среды), так и с использованием спектрофотометрического метода. Помутнение среды трактовали как наличие высокой численности бактерий (более 10^7 клеток на 1 мл).

Определение доли клеток, экспрессирующих ген шикиматкиназы с промотора Pspac при различных концентрациях индуктора. Применяя сходный с описанным выше подход, готовили чашки с агаризованной минимальной глюкозо-солевой средой и концентрацией ИПТГ 0; 0,3; 0,6; 1,2 и 2,4 ммоль/л. Для подсчета общего числа жизнеспособных клеток использовали чашки Петри с полноценной питательной средой. Во все чашки вносили по 0,1 мл суспензии отмытых бактериальных клеток с плотностью 10^4 – 10^5 клеток на 1 мл. Через 16–18 ч культивирования в оптимальных условиях проводили подсчет числа КОЕ, которое соответствовало числу клеток с активным промотором Pspac.

Состав среды и условия культивирования, используемые для оценки уровня синтеза шикимовой кислоты клетками *B. subtilis* с помощью метода ВЭЖХ. Выращенные на среде LB ночные культуры штаммов *B. subtilis* 168wt, *B. subtilis* 168wt21CSA были использованы для инокуляции (объемная доля 5 %) в 4 мл среды для ферментации, полученной на основе минимальной среды Спидайзена (1,4 % K_2HPO_4 , 0,6 % KH_2PO_4 , 0,01 % $MgSO_4$, 0,2 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % $Na_3C_6H_5O_7$) [22; 25].

По окончании культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при ускорении 13 000 g. Полученный супернатант отбирали и очищали от остатков бактериальных клеток и их обломков с помощью шприцевого бактериального фильтра с размером пор 0,45 мкм (*Macherey-Nagel*, Германия). Для загрузки колонки использовали 5 мкл отфильтрованной культуральной жидкости.

Подготовка стандарта шикимовой кислоты для ВЭЖХ-анализа. Образец стандарта шикимовой кислоты растворяли в метаноле до концентрации 2 мг/мл. Полученный раствор очищали с помощью шприцевого бактериального фильтра с размером пор 0,45 мкм. Выполняли трехкратные инъекции по 5 мкл [26; 27].

Количественный анализ шикимовой кислоты методом ВЭЖХ. Супернатанты анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе LCMS-2020 (*Shimadzu*, Япония) с использованием колонки Allure C18 (диаметр 4,6 мм, длина 150 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) (*Restek*, США) и детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M20A (*Shimadzu*). Разделение веществ проводили градиентным элюированием при температуре колонки 40 °C и скорости потока 0,5 мл/мин на протяжении 20 мин. На основании анализа собственных результатов [19] и протоколов, представленных в работах [14; 26; 28], были изменены условия градиента мобильной фазы. Модифицированные условия градиента мобильной фазы представлены в табл. 1. Обнаружение шикимовой кислоты и измерение ее концентрации проводили при длине волны 210 нм с помощью детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M20A [26; 28].

Таблица 1

Условия хроматографического разделения

Table 1

Conditions for chromatographic separation

Время, мин	Доля компонентов мобильной фазы, %		
	Вода	Метанол	Муравьиная кислота
0–12	97–92	2–7	1
12–13	92–4	7–95	1
13–15	4	95	1
15–20	97	2	1

Примечания: 1. В ходе анализа использовалась 1 % муравьиная кислота. 2. В этих условиях стандарт шикимовой кислоты элюировался на 162-й секунде.

Результаты и их обсуждение

Оценка эффективности роста и способности к синтезу триптофана у исходных штаммов и штаммов-кандидатов. У отобранных штаммов-кандидатов с использованием теста на синтрофизм продемонстрировано появление неспособности к подращиванию клеток тест-штамма *B. subtilis* 168, нуждающегося в L-триптофане, что и должно быть характерно для этих штаммов вследствие нарушения целостности шикиматного пути (рис. 4).

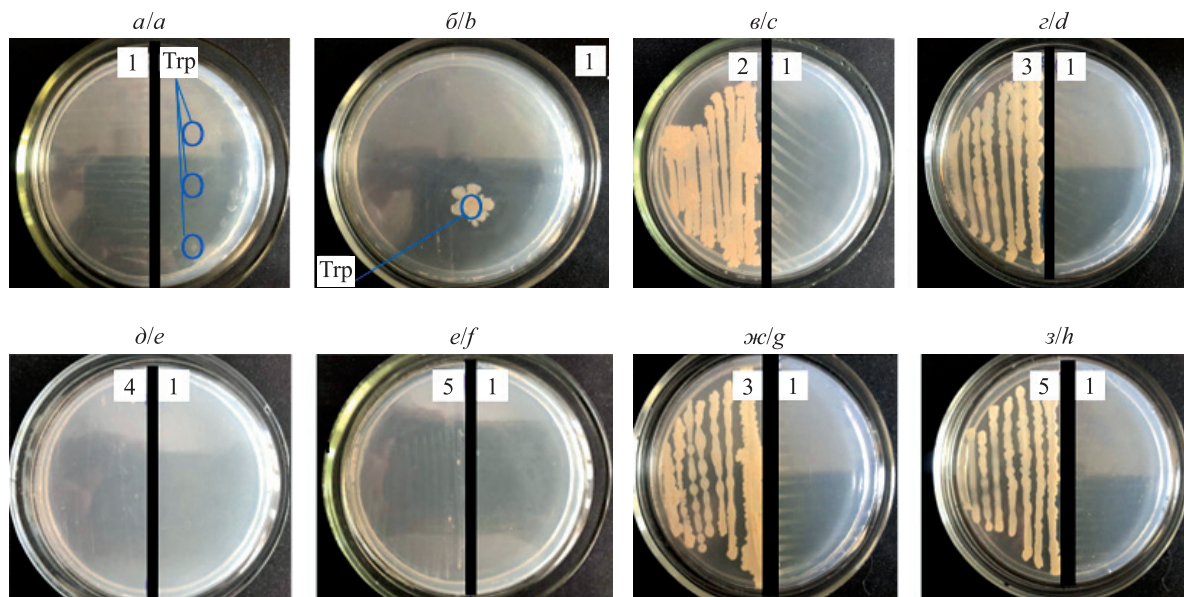


Рис. 4. Оценка эффективности роста и способности к синтезу L-триптофана у исходных штаммов и штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA (чашки инкубировали при температуре 37 °С, учет результатов проводили через 72 ч):
 а – оценка эффективности роста тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде (тест-штамм высеян параллельными штрихами на половину чашки Петри, в другую половину чашки внесен L-триптофан (Trp) (маркером синего цвета отмечены области наслаивания раствора L-триптофана на агаризованную среду, в каждую область внесено 20 мкл 25 ммоль/л раствора L-триптофана));
 б – оценка эффективности роста тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде (тест-штамм высеян методом Коха, затем в отмеченную маркером синего цвета область уколком внесено 5–10 мкл 25 ммоль/л раствора L-триптофана (Trp));
 в – оценка эффективности роста штамма-прототипа *B. subtilis* 168wt (2) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;
 г – оценка эффективности роста штамма-прототипа *B. subtilis* ВКПМ 5434 (3) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;
 д – оценка эффективности роста штамма-кандидата *B. subtilis* 168wt21CSA (4) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;
 е – оценка эффективности роста штамма-кандидата *B. subtilis* 5434p4SA (5) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;
 ж – оценка эффективности роста штамма-прототипа *B. subtilis* ВКПМ 5434 (3) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде в присутствии 2,4 ммоль/л ИПТГ;
 з – оценка эффективности роста штамма-кандидата *B. subtilis* 5434p4SA (5) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде в присутствии 2,4 ммоль/л ИПТГ

Fig. 4. Evaluation of the growth efficiency and ability to synthesise L-tryptophan in the original strains and candidate strains *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA (the plates were incubated at temperature of 37 °C, the results were recorded after 72 h):
 а – evaluation of the growth efficiency of the test strain *B. subtilis* 168 (1) on the SMS medium (the test strain was seeded with parallel strokes on half of the Petri dish, L-tryptophan (Trp) was added to the other half of the dish (the points of layering of the L-tryptophan solution in the agar medium marked as blue areas, in each area 20 µL of 25 mmol/L solution of L-tryptophan were added);
 б – evaluation of the growth efficiency of the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium (the test strain was inoculated by the Koch method, after which 5–10 µL of 25 mmol/L solution of L-tryptophan (Trp) was injected in the point marked as blue area);
 в – evaluation of the growth efficiency of the prototype strain *B. subtilis* 168wt (2) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;
 г – evaluation of the growth efficiency of the prototype strain *B. subtilis* VKPM 5434 (3) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;
 е – evaluation of the growth efficiency of the candidate strain *B. subtilis* 168wt21CSA (4) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;
 ж – evaluation of the growth efficiency of the candidate strain *B. subtilis* 5434p4SA (5) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;
 з – evaluation of the growth efficiency of the prototype strain *B. subtilis* VKPM 5434 (3) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium in the presence of 2.4 mmol/L IPTG;
 и – evaluation of the growth efficiency of the candidate strain *B. subtilis* 5434p4SA (5) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium in the presence of 2.4 mmol/L IPTG

Рост тест-штамма *B. subtilis* 168 на минимальной глюкозо-солевой среде возможен только в присутствии L-триптофана и наблюдается либо в области диффузии внесенного раствора L-триптофана (см. рис. 4, а), либо непосредственно в месте его введения (см. рис. 4, б). На рис. 4, в и г, продемонстрированы прототрофные свойства штаммов-прототипов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434, а также их способность к подрачиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 на минимальной глюкозо-солевой среде: незначительный рост тест-штамма наблюдается в непосредственной близости от анализируемых штаммов, предположительно, в области диффузии синтезируемого ими L-триптофана. Эти данные подтверждают целостность шикиматного пути у штаммов-прототипов. Анализ рис. 4, д и е, отражающих эффективность роста штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA на минимальной глюкозо-солевой среде, позволяет заключить, что рост штамма *B. subtilis* 168wt21CSA на этой среде невозможен, а рост штамма *B. subtilis* 5434p4SA незначителен. Эти данные свидетельствуют о полной или частичной утрате прототрофных свойств рекомбинантными штаммами *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. Следует отметить, что оба указанных штамма демонстрировали способность к росту на минимальной глюкозо-солевой среде при наличии в ней смеси трех ароматических аминокислот – L-тирозина, L-триптофана и L-фенилаланина. Потеря прототрофности у рекомбинантных штаммов, равно как и восстановление способности к росту на минимальной глюкозо-солевой среде при условии одновременного присутствия в ней конечных метаболитов шикиматного пути – L-тирозина, L-триптофана и L-фенилаланина, является прогнозируемой и ожидаемой. Стоит заметить, что наблюдаемая у штамма *B. subtilis* 5434p4SA незначительная способность к росту на минимальной глюкозо-солевой среде (см. рис. 4, е) также является прогнозируемой, она может быть объяснена характерной для промотора *Pspac* фоновой активностью [20]. С использованием чашечного метода для штамма *B. subtilis* 5434p4SA продемонстрирован следовой рост на минимальной глюкозо-солевой среде без формирования четких колоний, а при длительном культивировании в жидкой среде (продолжительность культивирования 48 ч, температура 37 °С, скорость вращения 200 об/мин) плотность культуры не превышала $2,6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Добавление в среду ИПТГ восстанавливало прототрофные свойства организма и его способность к подрачиванию клеток тест-штамма (см. рис. 4, з). В качестве контроля сравнения выступал штамм-прототип *B. subtilis* ВКПМ 5434, который на минимальной глюкозо-солевой среде с ИПТГ продемонстрировал отсутствие изменений в способности к подрачиванию тест-штамма *B. subtilis* 168, что расценивалось как отсутствие изменений в активности синтеза L-триптофана (см. рис. 4, ж).

Таким образом, результаты сравнения эффективности роста штамма *B. subtilis* 5434p4SA, представленной на рис. 4, е и з, однозначно свидетельствуют, что в присутствии ИПТГ у рекомбинантных бактерий *B. subtilis* 5434p4SA восстанавливается способность к росту на среде SMS и подрачиванию тест-штамма *B. subtilis* 168, т. е. в присутствии ИПТГ восстанавливается целостность пути синтеза ароматических аминокислот. Это свойство является ключевым для валидации полученного мутанта и говорит о корректности функциональной организации структуры разработанной конструкции рMUTIN4Δ*aroK*, точности процесса ее интеграции в бактериальную хромосому целевого штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434, верности локализации в составе бактериальной хромосомы привнесенных за счет гомологичной рекомбинации детерминант с восстановлением структурной и функциональной целостности гена *aroK* при его постановке под регулируемый промотор *Pspac*. В связи с этим рекомбинантный штамм *B. subtilis* 168wt21CSA может рассматриваться как альтернативная тест-система при характеристике основных свойств штамма *B. subtilis* 5434p4SA.

Интересные результаты были получены для штамма *B. subtilis* 5434p4SA при его культивировании в жидкой минимальной глюкозо-солевой среде с ИПТГ. Как было отмечено ранее, штамм *B. subtilis* 5434p4SA утрачивает прототрофные свойства, которые восстанавливаются в присутствии ИПТГ, что связано с активацией экспрессии гена *aroK* с привнесенного индуцируемого ИПТГ промотора *Pspac*. Для используемой в работе векторной молекулы рMUTIN4, содержащей промотор *Pspac*, *lac*-оператор и терминаторы t_1 , t_2 и t_0 , была описана зависимость уровня экспрессии генетических детерминант, контролируемых промотором *Pspac*, как функция эффективности работы промотора от концентрации индуктора. Данная зависимость имела линейный характер в интервале концентраций ИПТГ от 0,01 до 1,0 ммоль/л (далее измерения были непоказательны из-за насыщения системы экспрессируемым продуктом) [20]. Характерный фоновый рост без формирования четких колоний при культивировании штамма на плотной минимальной глюкозо-солевой среде, а также низкий титр КОЕ при культивировании в жидкой среде позволили предположить, что имеет место не низкий уровень экспрессии подконтрольного гена во всех клетках популяции, а экспрессия подконтрольного гена в случайных клетках популяции. Для проверки данного предположения была выдвинута гипотеза, что даже при использовании индуктора экспрессия подконтрольного гена идет не во всех, а только в части клеток бактериальной популяции. Для проверки

выдвинутой гипотезы в популяции клеток *B. subtilis* 5434p4SA определяли долю клеток, обладающих прототрофным фенотипом при отсутствии ИПТГ, и долю клеток, восстановивших прототрофный фенотип после внесения в среду культивирования ИПТГ в различных концентрациях.

Анализ числа сформированных колоний на средах разного состава наглядно демонстрирует долю клеток в бактериальной популяции, у которых проявлялся прототрофный фенотип в результате экспрессии гена *aroK* с промотора *Pspac* (табл. 2).

Таблица 2

Доля клеток штамма *B. subtilis* 5434p4SA, эффективно экспрессирующих ген *aroK*, при различных концентрациях ИПТГ в среде культивирования

Table 2

Proportion of *B. subtilis* 5434p4SA cells that effectively express the *aroK* gene at different concentrations of IPTG in the culture medium

Штамм	Число КОЕ, сформированных на минимальной глюкозо-солевой среде с эритромицином (5 мкг/мл), при различных концентрациях ИПТГ					Общее число КОЕ, сформированных на полноценной питательной среде	
	0 ммоль/л	0,3 ммоль/л	0,6 ммоль/л	1,2 ммоль/л	2,4 ммоль/л	С эритромицином (5 мкг/мл)	Без эритромицина
<i>B. subtilis</i> ВКПМ 5434	–	–	–	–	–	–	1523,0 ± 24,3
<i>B. subtilis</i> 5434p4SA	5,0 ± 1,1	82,0 ± 2,0	238,0 ± 5,6	616,0 ± 6,8	1330,0 ± 68,0	1413,0 ± 32,9	1427,0 ± 29,8
Доля прототрофных клеток	0,35 %	5,80 %	16,84 %	43,59 %	94,0 %	100 % (контроль)	100 % (контроль)

Примечания: 1. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение; m – ошибка среднего значения, рассчитанная через среднеквадратичное отклонение при трехкратной повторности эксперимента. 2. Сведения для штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 приведены в целях демонстрации отсутствия спонтанной устойчивости к эритромицину у штамма-прототипа. 3. Знак «минус» обозначает отсутствие роста. 4. Доля прототрофных клеток определена относительно числа КОЕ, сформированных на среде с эритромицином.

Совокупный анализ описанных выше результатов позволяет заключить, что вследствие гомологичной рекомбинации между фрагментами ДНК, клонированными в состав конструкций pMTL21CΔ*aroK* и pMUTIN4Δ*aroK*, и целевыми областями бактериального генома штаммов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434 были получены рекомбинантные штаммы с заблокированной шикиматкиназной активностью, обуславливающей возникновение у исследуемых штаммов-кандидатов ауксотрофности по ароматическим аминокислотам. Это указывает на целевую доставку и интеграцию клонированных участков в нужные регионы бактериальной хромосомы. В пользу справедливости высказанного предположения также свидетельствуют данные, полученные для штамма-кандидата *B. subtilis* 5434p4SA, у которого инактивация гена шикиматкиназы должна носить обратимый характер. Так, у штамма *B. subtilis* 5434p4SA была отмечена утрата прототрофных свойств и способности к синтезу L-триптофана, что является ожидаемым фенотипическим изменением. При культивировании штамма на минимальной глюкозо-солевой среде в присутствии ИПТГ происходит восстановление прототрофных свойств и способности к синтезу L-триптофана, что также является ожидаемым фенотипическим изменением и согласно рабочей модели может быть объяснено экспрессией гена шикиматкиназы с привнесенного промотора *Pspac*, индуцируемого ИПТГ.

Таким образом, с помощью теста на синтрофизм было продемонстрировано соответствие между теоретически ожидаемыми и наблюдаемыми фенотипическими изменениями в характеристиках штаммов-кандидатов, что позволило использовать отобранные штаммы-кандидаты для дальнейших исследований по оценке их продуктивности.

Оценка эффективности синтеза шикимовой кислоты. Концентрацию шикимовой кислоты в среде определяли с помощью метода ВЭЖХ после 72 ч культивирования анализируемых штаммов в ферментационной среде (начальная концентрация L-тирозина, L-триптофана и L-фенилаланина по 12,5 мкг/мл, начальная концентрация глюкозы 0,5 %, температура культивирования 37 °С, скорость вращения 200 об/мин). Ростовые показатели бактериальной культуры и эффективность накопления шикимовой кислоты в среде после 72 ч культивирования представлены в табл. 3. Следует отметить, что используемые штаммы имеют разную скорость роста: в указанный интервал времени для быстрорастущих

культур, таких как *B. subtilis* 168wt, наступает фаза отмирания и лизиса клеток, тогда как для культуры *B. subtilis* 5434p4SA, отличающейся самым медленным ростом, этот временной промежуток соответствует фазе глубокого стационара. Именно с лизисом культур авторы связывают обнаружение шикимовой кислоты для штаммов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434.

Таблица 3

**Ростовые показатели штаммов *B. subtilis*
и эффективность накопления шикимовой кислоты после 72 ч инкубирования
в ферментационной среде для синтеза шикимовой кислоты**

Table 3

**Growth rates of strains *B. subtilis* and the efficiency
of accumulation of shikimic acid after 72 h of incubation
in the fermentation medium for the synthesis of shikimic acid**

Штамм	Оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм	Биомасса культуры, мг	Концентрация шикимовой кислоты в среде, мкг/мл
<i>B. subtilis</i> 168wt	0,6347 ± 0,0230	1548 ± 35	156,03 ± 3,66
<i>B. subtilis</i> 168wt21CSA	1,7482 ± 0,0486	2923 ± 45	564,46 ± 4,70
<i>B. subtilis</i> ВКПМ 5434	1,0513 ± 0,0553	2469 ± 34	260,16 ± 3,18
<i>B. subtilis</i> 5434p4SA	1,8917 ± 0,0170	3387 ± 37	732,38 ± 4,53

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение; m – ошибка среднего значения, рассчитанная через среднееквадратичное отклонение при трехкратной повторности эксперимента.

Как видно из табл. 3, у обоих рекомбинантных штаммов эффективность накопления шикимовой кислоты в среде культивирования значительно превышала аналогичный показатель у штаммов-прототипов. Так, для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA количество шикимовой кислоты, накапливаемой в ферментационной среде, возросло в 3,6 раза относительно исходного уровня и составило (564,46 ± 4,70) мкг/мл. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA прирост был чуть менее значительным (в 2,8 раза), однако количество накапливаемой в среде шикимовой кислоты являлось максимальным в анализируемом ряду и достигало (732,38 ± 4,53) мкг/мл. Также следует отметить, что в предыдущих исследованиях авторов при использовании других параметров хроматографического разделения образцов продукция шикимовой кислоты у штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 не обнаружена, а соответствующий показатель эффективности накопления шикимовой кислоты для штамма *B. subtilis* 5434p4SA был в 1,8 раза ниже и составлял (403,98 ± 9,10) мкг/мл [19]. Отличия числовых значений могут быть объяснены как модификацией условий хроматографического разделения, так и изменением параметров культивирования, которые, безусловно, играют весьма существенную роль при работе с продуцентами. При сравнении исходных штаммов с полученными продуцентами по таким показателям, как оптическая плотность бактериальной культуры и ее биомасса, нельзя не отметить, что у полученных продуцентов накопление шикимовой кислоты сопряжено с пролонгированным эффектом от увеличения оптической плотности культуры и ее биомассы. Так, у штамма *B. subtilis* 168wt21CSA через 72 ч инкубирования в среде ферментации оптическая плотность культуры была в 2,8 раза, а биомасса – в 1,9 раза выше, чем у штамма *B. subtilis* 168wt, при этом в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 168wt21CSA накапливалось в 3,6 раза больше шикимовой кислоты по сравнению с количеством кислоты, накапливаемым в культуральной жидкости штамма-прототипа. Вероятно, разница ростовых показателей связана с отличиями в фазах роста культур клеток штамма-прототипа и штамма-продуцента. Аналогичные закономерности были выявлены для пары *B. subtilis* ВКПМ 5434 – *B. subtilis* 5434p4SA (для культур также наблюдались отличия в фазах роста). Так, у штамма *B. subtilis* 5434p4SA через 72 ч культивирования оптическая плотность культуры была в 1,8 раза, биомасса – в 1,4 раза, а количество накапливаемой шикимовой кислоты – в 2,8 раза выше, чем у исходного штамма. Приведенные числовые значения позволяют предположить, что наблюдаемые изменения в сравниваемых параметрах носят нелинейный характер и могут контролироваться другими факторами, которые не были учтены в данном исследовании.

В результате сравнения ростовых показателей и эффективности синтеза шикимовой кислоты двух штаммов-прототипов (*B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434) и полученных на их основе рекомбинантных штаммов (*B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA) выявлена интересная особенность. При указанных режимах культивирования соответствующие показатели штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 примерно в 1,7 раза (оптическая плотность культуры – в 1,7 раза, биомасса – в 1,6 раза, количество накапливаемой шикимовой кислоты – в 1,7 раза) превышают таковые штамма *B. subtilis* 168wt. У рекомбинантных

штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA эти показатели различаются не так существенно (оптическая плотность культуры – в 1,1 раза, биомасса – в 1,2 раза, количество накапливаемой шикимовой кислоты – в 1,3 раза), но они по-прежнему выше у штамма *B. subtilis* 5434p4SA. Повышенные ростовые характеристики, выявленные для штаммов *B. subtilis* ВКПМ 5434 и *B. subtilis* 5434p4SA, могут быть объяснены способностью к сверхсинтезу L-триптофана у исходного штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 и его низкой чувствительностью к ретроингибированию L-триптофаном и другими ароматическими кислотами, добавленными в среду культивирования.

Заключение

На основе теоретических данных о структуре шикиматного пути и ожидаемой организации генетического материала получаемых рекомбинантных штаммов с использованием микробиологических и биохимических подходов установлено соответствие основных характеристик штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA прогнозируемым параметрам, а также осуществлена оценка их ростовых показателей и эффективности синтеза шикимовой кислоты при стандартных условиях культивирования. Для полученных штаммов выявлены утрата прототрофных свойств и приобретение способности к повышенному синтезу шикимовой кислоты. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA продемонстрирован эффект восстановления прототрофных свойств у части клеток бактериальной популяции при активации экспрессии гена шикиматкиназы в присутствии индуктора, что может быть использовано для удешевления синтеза шикимовой кислоты при масштабировании процессов культивирования. С помощью метода ВЭЖХ показано, что у полученных штаммов-кандидатов шикимовая кислота синтезируется эффективнее, чем у соответствующих штаммов-предшественников: ее содержание в среде культивирования превышает таковые значения у штаммов-прототипов более чем в 2,5 раза, достигая 564 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA и 732 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 5434p4SA.

Библиографические ссылки

1. Bentley R, Haslam E. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1990;25(5):307–384. DOI: 10.3109/10409239009090615.
2. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999; 50:473–503. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
3. Humphrey CE, Furegati M, Laumen K, La Vecchia L, Leutert T, Müller-Hartweg JCD, et al. Optimized synthesis of L-m-tyrosine suitable for chemical scale-up. *Organic Process Research & Development*. 2007;11(6):1069–1075. DOI: 10.1021/op700093y.
4. Гиляров МС, Баев АА, Винберг ГГ, Заварзин ГА, Иванов АВ, Северин СЕ и др., редакторы. *Биологический энциклопедический словарь*. Москва: Советская энциклопедия; 1986. 831 с.
5. Meyskens FL Jr, Farmer P, Fruehauf JP. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research*. 2001; 14(3):148–154. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2001.140303.x.
6. Fang Ming-Yue, Zhang Chong, Yang Song, Cui Jin-Yu, Jiang Pei-Xia, Lou Kai, et al. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:8. DOI: 10.1186/s12934-015-0192-x.
7. Ul-Haq I, Ali S. Microbiological transformation of L-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl L-alanine (L-dopa) by a mutant strain of *Aspergillus oryzae* UV-7. *Current Microbiology*. 2002;45(2):88–93. DOI: 10.1007/s00284-001-0080-y.
8. Davis BD. Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;191(1):315–325. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)50982-0.
9. Dell KA, Frost JW. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(24): 11581–11589. DOI: 10.1021/ja00077a065.
10. Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W, Frost JW. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*. 2003;19(3):808–814. DOI: 10.1021/bp025769p.
11. Weber C, Brückner C, Weinreb S, Lehr C, Essl C, Boles E. Biosynthesis of cis,cis-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(23):8421–8430. DOI: 10.1128/AEM.01983-12.
12. Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 2013;15:55–66. DOI: 10.1016/j.ymben.2012.10.003.
13. Wang S, Bilal M, Zong Y, Hu H, Wang W, Zhang X. Development of a plasmid-free biosynthetic pathway for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synthetic Biology*. 2018;7(4):1131–1142. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00047.
14. Liu Dong-Feng, Ai Guo-Min, Zheng Qing-Xiang, Liu Chang, Jiang Cheng-Ying, Liu Li-Xia, et al. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:40. DOI: 10.1186/1475-2859-13-40.
15. Чao Ю, Шoнина МЮ, Лагодич АВ. Разработка общей концепции регулируемой инактивации гена шикиматкиназы для модификации шикиматного пути у бактерий *Bacillus subtilis*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2017;3:45–53.
16. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 complete genome [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine, National Center for Biomedical Information; 2023 [cited 2022 July 14]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000964.3.

17. UniProt [Internet]. [S. l.]: UniProt consortium; 2002–2023 [cited 2022 July 14]. Available from: <https://www.uniprot.org/>.
18. Chambers SP, Prior SE, Barstow DA, Minton NP. The pMTL *nic*⁻ cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene*. 1988;68(1):139–149. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90606-3.
19. Чао Ю, Лагодич АВ. Анализ эффективности факторов электротрансформации клеток *Bacillus subtilis* для инактивации гена *aroK* путем гомологичной рекомбинации. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:64–73 (на англ.). DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-64-73.
20. Vagner V, Dervyn E, Ehrlich SD. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 1998;144(11):3097–3104. DOI: 10.1099/00221287-144-11-3097.
21. Jiang JJ, Liu T, Lin SJ. [Research progress on the biosynthesis of aromatic compounds by microorganisms]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*. 2019;31(5):430–448. Chinese.
22. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *PNAS*. 1958;44(10):1072–1078. DOI: 10.1073/pnas.44.10.1072.
23. Guérout-Fleury A-M, Shazand K, Frandsen N, Stragier P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1995;167(1–2):335–336. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00652-4.
24. Лысак ВВ, Желдакова РА, Фомина ОВ. *Микробиология*. Минск: БГУ; 2015. 115 с.
25. Bott KF, Wilson GA. Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system. *Journal of Bacteriology*. 1967;94(3):562–570. DOI: 10.1128/jb.94.3.562-570.1967.
26. Chen Fengli, Hou Kexin, Li Shuangyang, Zu Yuangang, Yang Lei. Extraction and chromatographic determination of shikimic acid in Chinese conifer needles with 1-benzyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid aqueous solutions. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2014;256473. DOI: 10.1155/2014/256473.
27. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 1983;166(4):557–580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
28. Altinyay Ç, Ergene Öz B, Altun ML. Quantification of shikimic acid in the methanolic extracts of three *Alnus* taxons growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;13(1):115–120.

References

1. Bentley R, Haslam E. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1990;25(5):307–384. DOI: 10.3109/10409239009090615.
2. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999;50:473–503. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
3. Humphrey CE, Furegati M, Laumen K, La Vecchia L, Leutert T, Müller-Hartweg JCD, et al. Optimized synthesis of L-*m*-tyrosine suitable for chemical scale-up. *Organic Process Research & Development*. 2007;11(6):1069–1075. DOI: 10.1021/op700093y.
4. Gilyarov MS, Baev AA, Vinberg GG, Zavarzin GA, Ivanov AV, Severin SE, et al., editors. *Biologicheskii entsiklopedicheskii slovar'* [Biological encyclopedic dictionary]. Moscow: Sovetskaya entsiklopediya; 1986. 831 p. Russian.
5. Meyskens FL Jr, Farmer P, Fruehauf JP. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research*. 2001;14(3):148–154. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2001.140303.x.
6. Fang Ming-Yue, Zhang Chong, Yang Song, Cui Jin-Yu, Jiang Pei-Xia, Lou Kai, et al. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:8. DOI: 10.1186/s12934-015-0192-x.
7. Ul-Haq I, Ali S. Microbiological transformation of L-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl L-alanine (L-dopa) by a mutant strain of *Aspergillus oryzae* UV-7. *Current Microbiology*. 2002;45(2):88–93. DOI: 10.1007/s00284-001-0080-y.
8. Davis BD. Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;191(1):315–325. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)50982-0.
9. Dell KA, Frost JW. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(24):11581–11589. DOI: 10.1021/ja00077a065.
10. Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W, Frost JW. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*. 2003;19(3):808–814. DOI: 10.1021/bp025769p.
11. Weber C, Brückner C, Weinreb S, Lehr C, Essl C, Boles E. Biosynthesis of cis,cis-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(23):8421–8430. DOI: 10.1128/AEM.01983-12.
12. Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 2013;15:55–66. DOI: 10.1016/j.ymben.2012.10.003.
13. Wang S, Bilal M, Zong Y, Hu H, Wang W, Zhang X. Development of a plasmid-free biosynthetic pathway for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synthetic Biology*. 2018;7(4):1131–1142. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00047.
14. Liu Dong-Feng, Ai Guo-Min, Zheng Qing-Xiang, Liu Chang, Jiang Cheng-Ying, Liu Li-Xia, et al. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:40. DOI: 10.1186/1475-2859-13-40.
15. Chao Y, Shonina MY, Lahodzich AV. Design of the general concept of regulated inactivation of the gene shikimatkinase for modification of the shikimat way in bacteria *Bacillus subtilis*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2017;3:45–53. Russian.
16. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 complete genome [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine, National Center for Biomedical Information; 2023 [cited 2022 July 14]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000964.3.
17. UniProt [Internet]. [S. l.]: UniProt consortium; 2002–2023 [cited 2022 July 14]. Available from: <https://www.uniprot.org/>.
18. Chambers SP, Prior SE, Barstow DA, Minton NP. The pMTL *nic*⁻ cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene*. 1988;68(1):139–149. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90606-3.

19. Chao Y, Lahodzich AV. Analysis of the efficiency factors of electrotransformation of *Bacillus subtilis* to inactivate the *aroK* gene by the method of homologous recombination. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:64–73. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-64-73.
20. Vagner V, Dervyn E, Ehrlich SD. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 1998;144(11):3097–3104. DOI: 10.1099/00221287-144-11-3097.
21. Jiang JJ, Liu T, Lin SJ. [Research progress on the biosynthesis of aromatic compounds by microorganisms]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*. 2019;31(5):430–448. Chinese.
22. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *PNAS*. 1958;44(10):1072–1078. DOI: 10.1073/pnas.44.10.1072.
23. Guérout-Fleury A-M, Shazand K, Frandsen N, Stragier P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1995;167(1–2):335–336. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00652-4.
24. Lysak VV, Zheldakova RA, Fomina OV. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Minsk: Belarusian State University; 2015. 115 p. Russian.
25. Bott KF, Wilson GA. Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system. *Journal of Bacteriology*. 1967;94(3):562–570. DOI: 10.1128/jb.94.3.562-570.1967.
26. Chen Fengli, Hou Kexin, Li Shuangyang, Zu Yuangang, Yang Lei. Extraction and chromatographic determination of shikimic acid in Chinese conifer needles with 1-benzyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid aqueous solutions. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2014;256473. DOI: 10.1155/2014/256473.
27. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 1983;166(4):557–580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
28. Altinyay Ç, Ergene Öz B, Altun ML. Quantification of shikimic acid in the methanolic extracts of three *Alnus* taxons growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;13(1):115–120.

Получена 16.03.2023 / исправлена 12.06.2023 / принята 12.06.2023.
Received 16.03.2023 / revised 12.06.2023 / accepted 12.06.2023.

УДК 57.063.7:582.29(476)

РЕВИЗИЯ ЛИШАЙНИКОВ РОДА *BRYORIA* БЕЛАРУСИ. II. *BRYORIA IMPLEXA* s. l.

А. Г. ЦУРИКОВ¹⁾, В. В. ГОЛУБКОВ²⁾, П. Н. БЕЛЫЙ³⁾, И. М. БОЛСУН¹⁾

¹⁾Гомельский государственный университет им. Франциска Скорины,
ул. Советская, 104, 246028, г. Гомель, Беларусь

²⁾Независимый исследователь, г. Гродно, Беларусь

³⁾Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Беларусь

С применением метода тонкослойной хроматографии проведена ревизия доступного гербарного материала лишайников рода *Bryoria*, собранного на территории Беларуси в 1924–2018 гг. Отмечено, что группа *B. implexa* s. l. представлена видами *B. capillaris*, *B. implexa* s. str., *B. kuemmerleana* и *B. vrangiana*. Дано морфологическое описание видов *B. implexa* s. str., *B. kuemmerleana* и *B. vrangiana*, указаны их химический состав, особенности экологии и данные о распространении в пределах республики. Виды *B. kuemmerleana* и *B. vrangiana* впервые приведены для территории Беларуси.

Ключевые слова: биоразнообразие; распространение; экология; вторичные метаболиты; секция *Implexae*.

Благодарность. Авторы выражают сердечную благодарность кандидату биологических наук И. Н. Урбанавичене (Ботанический институт имени В. Л. Комарова РАН) за ценные консультации.

Образец цитирования:

Цуриков АГ, Голубков ВВ, Белый ПН, Болсун ИМ. Ревизия лишайников рода *Bryoria* Беларуси. II. *Bryoria implexa* s. l. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:65–80. EDN: HTEKYT

For citation:

Tsurykau AH, Golubkov VV, Bely PN, Bolsun IM. Revision of the lichen genus *Bryoria* in Belarus. II. *Bryoria implexa* s. l. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:65–80. Russian. EDN: HTEKYT

Авторы:

Андрей Геннадьевич Цуриков – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры ботаники и физиологии растений биологического факультета.

Владимир Владимирович Голубков – кандидат биологических наук, доцент; независимый исследователь.

Павел Николаевич Белый – кандидат биологических наук; ученый секретарь.

Ирина Михайловна Болсун – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. Г. Цуриков.

Authors:

Andrei H. Tsurykau, doctor of science (biology), docent; professor at the department of botany and plant physiology, faculty of biology.

tsurykau@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6309-170X>

Vladimir V. Golubkov, PhD (biology), docent; independent researcher.

vgolubkov@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-7120-9093>

Pavel N. Bely, PhD (biology); scientific secretary.

belyj@cbg.org.by

<https://orcid.org/0000-0002-1497-8478>

Iryna M. Bolsun, student at the faculty of biology.

irisha.bolsun@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-9585-4847>

REVISION OF THE LICHEN GENUS *BRYORIA* IN BELARUS. II. *BRYORIA IMPLEXA* s. l.

A. H. TSURYKAU^a, V. V. GOLUBKOV^b, P. N. BELY^c, I. M. BOLSUN^a

^aFrancisk Skorina Gomel State University, 104 Savieckaja Street, Gomel 246028, Belarus

^bIndependent researcher, Grodna, Belarus

^cCentral Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus,
2v Surganova Street, Minsk 220012, Belarus

Corresponding author: A. H. Tsurykau (tsurykau@gmail.com)

A revision using thin-layer chromatography of the available herbarium material of the lichen genus *Bryoria* collected on the territory of Belarus in 1924–2018 was carried out. Noted that the *B. implexa* s. l. group is represented by species *B. capillaris*, *B. implexa* s. str., *B. kuemmerleana* and *B. vrangiana*. The article provides morphological description of the species *B. implexa* s. str., *B. kuemmerleana* and *B. vrangiana*. Their chemical composition, ecology and data on distribution within the republic are indicated. Species *B. kuemmerleana* and *B. vrangiana* are reported for the first time for the territory of Belarus.

Keywords: biodiversity; distribution; ecology; secondary metabolites; *Implexae* section.

Acknowledgements. We warmly thank PhD (biology) I. N. Urbanavichene (Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences) for the valuable suggestions.

Введение

Секция *Implexae* рода *Bryoria* (Parmeliaceae) включает кустистые повисающие волосовидные лишайники, приуроченные к таежным бореальным лесам Северного и Южного полушарий [1]. В настоящее время существуют различные видовые концепции отдельных представителей рода *Bryoria*. Наиболее признаваемым является подход финских исследователей. Согласно этому подходу секция *Implexae* включает 2 филогенетически обособленные клады (группы), которые объединяют 11 видов, из них 6 видов встречаются в Европе [2]. Результаты более поздних исследований выявили низкую филогенетическую поддержку видового ранга для многих ранее признаваемых таксонов, сведя все разнообразие секции к 4 видам [3]. Однако в настоящее время эти данные не в полной мере нашли отражение в видовых концепциях рассматриваемой секции как европейских [4], так и российских [5] ученых.

В актуальных списках лишайников Беларуси [6; 7] разнообразие рода *Bryoria* изложено преимущественно с использованием устаревших данных, поскольку применение современных таксономических концепций невозможно без проведения ревизии гербарного материала с помощью химических (хроматография) либо молекулярно-генетических методов исследования. В Беларуси ревизия лишайников рода *Bryoria* (ранее рассматриваемых как *Alectoria*) была проведена Н. В. Горбач в 1965 г. [8]. Ввиду существенно изменившихся с момента опубликования упомянутой работы концепций многих видов этого рода изложенные в ней результаты уже не могут использоваться для оценки биоразнообразия и встречаемости отдельных представителей (в частности, 7 из 8 номенклатурных комбинаций рода *Bryoria*, приведенных Н. В. Горбач, в настоящее время являются устаревшими).

В связи с вышесказанным актуальной задачей представляется ревизия доступного гербарного материала лишайников рода *Bryoria*, собранного на территории Беларуси, с применением современных методов идентификации. В настоящем исследовании принята концепция секции *Implexae*, изложенная в работе [2] и поддержанная при составлении актуального ключа для определения рода *Bryoria* в издании «Флора лишайников России: семейство Parmeliaceae» [5].

Материалы и методы исследования

Объектом исследования выступили образцы лишайников рода *Bryoria*, хранящиеся в гербариях Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (MSK-L), Центрального ботанического сада НАН Беларуси (MSKH), Белорусского государственного университета (MSKU), Гомельского государственного университета имени Франциска Скорины (GSU) и Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН (LE). Всего было проанализировано 207 гербарных образцов сборов 1924–2018 гг. Дублеты, хранящиеся в разных гербариях, принимали за один гербарный образец. Морфологию образцов изучали с помощью стереомикроскопа SMZ-745 (*Nikon*, Япония), состав вторичных метаболитов (рис. 1) определяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей С [9].

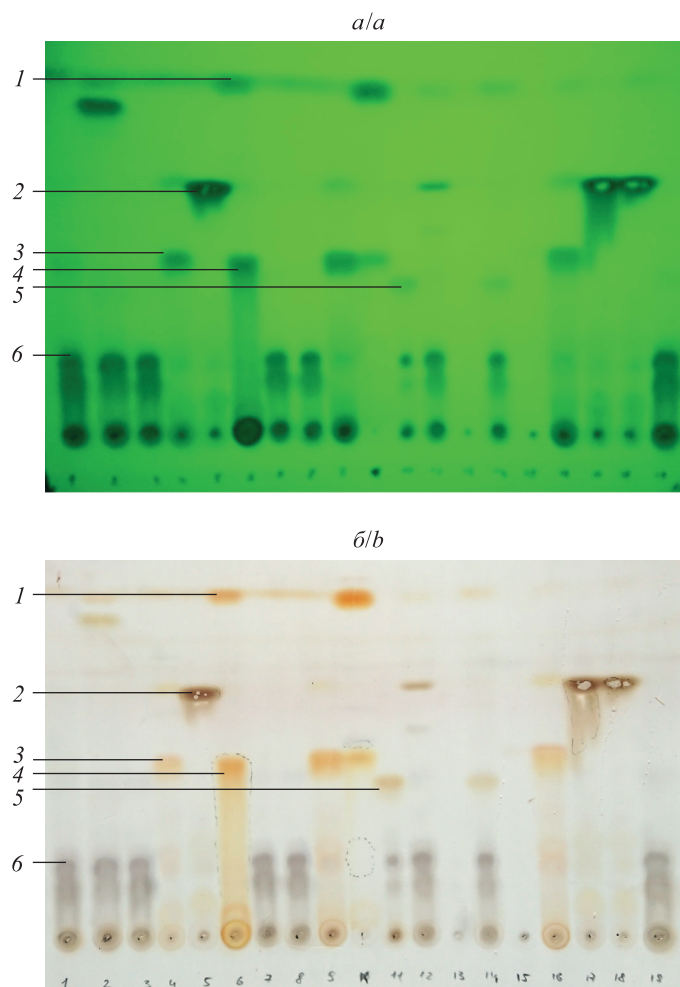


Рис. 1. Хроматограмма вторичных метаболитов в ультрафиолете (длина волны 254 нм) до обработки H_2SO_4 (а) и в видимом свете после обработки H_2SO_4 (б):

1 – атранорин; 2 – псоромовая кислота; 3 – алекториальная кислота;
4 – норстиктовая кислота; 5 – гиروفоровая кислота; 6 – фумарпротоцеттаровая кислота

Fig. 1. Chromatogram of secondary metabolites in ultraviolet (wavelength 254 nm) before treatment with H_2SO_4 (a) and in visible light after treatment with H_2SO_4 (b):

1 – atranorin; 2 – psoromic acid; 3 – alectorialic acid; 4 – norstictic acid;
5 – gyrophoric acid; 6 – fumarprotocetraric acid

В ходе исследования фрагмент слоевища лишайника помещали в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Экстракцию вторичных метаболитов лишайника проводили ацетоном в течение 1 ч. После этого 30 мкл экстракта наносили на пластины для тонкослойной хроматографии со стандартным силикагелем и ультрафиолетовым индикатором Alugram Sil G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Германия). Элюирование пластины до оптимальной длины продвижения фронта (12 см) осуществляли в течение 40 мин. Визуализацию разделяемых веществ смеси проводили под ультрафиолетовым излучением с длиной волны 254 и 366 нм, а затем выполняли обработку пластины 10 % раствором серной кислоты (H_2SO_4) с последующим нагреванием в сушильном шкафу до температуры 110 °С в течение 10 мин. В качестве контроля использовали лишайники *Platismatia glauca* (L.) W. L. Culb. & C. F. Culb. и *Pleurosticta acetabulum* (Neck.) Elix & Lumbsch, содержащие атранорин, норстиктовую и каператовую кислоты.

Результаты и их обсуждение

Проведенная ревизия гербарного материала показала, что в Беларуси секция *Implexae* рода *Bryoria* представлена 4 видами – *B. capillaris* (Ach.) Brodo & D. Hawksw. (13 образцов, или 6,3 % от общего количества исследованных образцов), *B. implexa* (Hoffm.) Brodo & D. Hawksw. s. str. (32 образца, или 15,5 %), *B. kuemmerleana* (Gyeln.) Brodo & D. Hawksw. (5 образцов, или 2,4 %) и *B. vrangiana* (Gyeln.) Brodo & D. Hawksw. (61 образец, или 29,5 %). Виды *B. kuemmerleana* и *B. vrangiana* впервые указаны для территории Беларуси.

Следует отметить, что до 2014 г. [2] *B. implexa* s. str., *B. kuemmerleana* и *B. vrangiana* рассматривались в качестве отдельных хемотипов морфологически и химически вариабельного таксона *B. implexa* s. l. [9]. Ниже приводится морфологическое описание каждого из перечисленных видов, а также их химический состав, особенности экологии и данные о распространении в пределах республики. Весь гербарный материал этих видов группы *B. implexa* s. l. хранится в фондах коллекций MSK-L, MSKH и GSU.

Вид *B. implexa* s. str. Таллом длиной до 15 см, повисающий, от светло-коричневого до коричневого, от матового до слегка блестящего. Углы между ветвями различны. Ветви в основном сжатые, перекрученные и слегка ямчатые. Псевдоцифеллы белые, реже более темные, удлинненно-веретеновидные, на отдельных участках таллома обвивают ветви. Соралии от бородавчатых до щелевидных, беловато-серого цвета. Изидии и колючки отсутствуют. Апотеции и пикниды не обнаружены.

Химический состав. Псоромовая кислота, иногда атранорин. Соралии содержат фумарпротоцетрамовую кислоту.

Экология. На территории Беларуси вид *B. implexa* s. str. характеризуется достаточно широкой экологической приуроченностью. Он произрастает как в хвойных, так и в лиственных лесах: в сосняках и ельниках найдены 14 образцов (43,7 %), в дубравах и березняках – 6 образцов (18,8 %). Для оставшихся 12 образцов (37,5 %) информация об условиях произрастания отсутствовала.

Все образцы были собраны на коре деревьев. На сосне обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) произрастали 12 образцов (37,5 %), на ели европейской (*Picea abies* (L.) H. Karst.) – 7 образцов (21,9 %), на березе повислой (*Betula pendula* Roth) – 6 образцов (18,8 %), на дубе черешчатом (*Quercus robur* L.) – 2 образца (6,2 %). Для оставшихся 5 образцов (15,6 %) информация о субстрате отсутствовала.

Распространение. Ареал вида *B. implexa* s. str. охватывает Европу и Азию. В Беларуси он распространен достаточно широко, однако произрастает неравномерно, встречаясь преимущественно в северо-западных регионах страны (рис. 2).

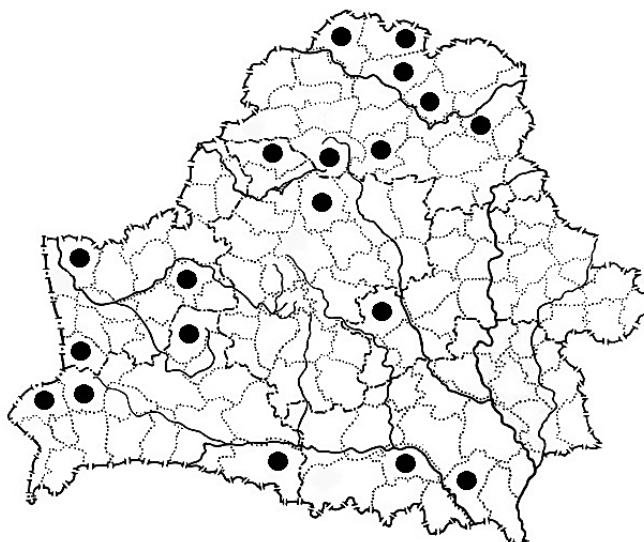


Рис. 2. Распространение вида *B. implexa* s. str. на территории Беларуси
Fig. 2. Distribution of species *B. implexa* s. str. in Belarus

Отличие от схожих таксонов. В соответствии с современными представлениями вид *B. implexa* s. str. отличается содержанием псоромовой кислоты в вегетативных частях таллома и наличием белых, удлиненных (до веретеновидных) псевдоцифелл [2]. Ревизия собранного на территории Беларуси гербарного материала показала, что лишь несколько образцов обладают выраженными белыми псевдоцифеллами на всей протяженности таллома. У большинства образцов наряду с белыми выявлены серые и коричневатые псевдоцифеллы, что может быть следствием большого возраста гербарных коллекций, но делает этот морфологический критерий малопригодным без подтверждения данными химического анализа. По-видимому, наличие псоромовой кислоты является единственным четким критерием, отграничивающим вид *B. implexa* s. str. от морфологически схожих таксонов.

Исследованные образцы. Информация о месте и дате сбора, а также коллекторе проанализированных гербарных образцов вида *B. implexa* s. str. приведена в табл. 1.

Таблица 1

Данные этикеток исследованных гербарных образцов вида *B. implexa* s. str.

Table 1

Label data of the studied herbarium specimens of species *B. implexa* s. str.

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Брестская область, Барановичский район	5 км восточнее д. Колбовичи, сосняк вересковый	–	В. В. Голубков	6 апреля 1991 г.	MSK-L
Брестская область, Каменецкий район	Национальный парк «Беловежская пуца», аг. Каменюки	–	Равкова, Соколова	17 июля 1957 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 745, дубрава	Ель	В. В. Голубков	17 июля 1984 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 775, дубрава	Ель	В. В. Голубков	17 июня 1983 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 779	Дуб	В. В. Голубков	17 июля 1983 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 780, выдел № 9, ельник кисличный	Ель	П. Н. Белый	16 октября 2009 г.	MSKH (образец № 2103)
	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 828, сосняк мшистый	Сосна	В. В. Голубков	18 июля 1983 г.	MSK-L
Брестская область, Пружанский район	Национальный парк «Беловежская пуца», Никорское лесничество, квартал № 5, ельник кисличный	Ель	В. В. Голубков	19 июля 1983 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», Переровское лесничество, квартал № 88, 4 км восточнее д. Белый Лесок, дубрава грабово-кисличная	Сосна	В. В. Голубков	13 июля 1983 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», Переровское лесничество, квартал № 589, дубрава грабово-кисличная	Дуб	В. В. Голубков	14 июля 1983 г.	MSK-L
Брестская область, Столинский район	4 км южнее аг. Рубель	–	Н. В. Горбач	13 июня 1954 г.	MSK-L

Продолжение табл. 1
 Continuation of the table 1

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Витебская область, Верхнедвинский район	3 км юго-восточнее д. Прошки	Сосна	–	16 июня 1976 г.	MSK-L
	1 км западнее д. Сукали, переходная полоса от сосняка сфагнового в сосняк чернично-мшистый	Береза	–	–	MSK-L
Витебская область, Витебский район	д. Бригитполе, правый берег р. Западной Двины, сосняк лишайниково- моховой	Сосна	Н. В. Горбач	Июль 1964 г.	MSK-L
Витебская область, Докшицкий район	Березинский биосферный заповедник, 3,56 км южнее д. Слободы, Слободское болото, сосняк осоково-сфагновый	Ель	Р. В. Цвирко	5 июня 2015 г.	MSKH (образец № 6572)
Витебская область, Лепельский район	Березинский биосферный заповедник, окрестности д. Домжерицы, сосняк мшистый	Сосна	В. В. Голубков	11 июня 1991 г.	MSK-L
	Березинский биосферный заповедник, по дороге из д. Крайцы в д. Броды	Сосна	Н. В. Горбач	20 октября 1961 г.	MSK-L
	Березинский биосферный заповедник, ур. Нешково	Сосна	Н. В. Горбач	1961 г.	MSK-L
	Березинский биосферный заповедник, эксперимен- тальное лесохозяйство «Барсуки», квартал № 55, ельник мшистый	Ель	П. Н. Белый	14 июля 2009 г.	MSKH (образец № 1902)
Витебская область, Полоцкий район	47 км северо-восточнее г. Полоцка, северный берег оз. Глубокое, опушка сосняка орлякового	Сосна	В. В. Голубков	20 июля 1985 г.	MSK-L
	Между озерами Россолай и Глубокое, опушка сосняка орлякового	–	В. В. Голубков	20 июля 1985 г.	MSK-L
Витебская область, Россонский район	Окрестности д. Юховичи, край верхового болота	Береза	В. В. Голубков	29 сентября 1987 г.	MSK-L
Витебская область, Шумилинский район	25 км северо-западнее г. Шумилино, окрестности оз. Россолай	Береза	В. В. Голубков	20 июля 1985 г.	MSK-L
Гомельская область, Мозырский район	Мозырская гряда, березняк орляково-мшистый	Береза	В. В. Голубков	26 августа 1976 г.	MSK-L
Гомельская область, Хойникский район	Хойникское опытно-производственное лесничество, опушка дубравы разнотравной	Сосна	Н. В. Горбач	29 мая 1969 г.	MSK-L

Окончание табл. 1
Ending table 1

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Гродненская область, Гродненский район	Окрестности аг. Гожа и д. Мельники, Гожское лесничество, квартал № 21	–	Г. В. Вынаев	22 июля 1973 г.	MSK-L
	Окрестности д. Рыбницы	Сосна	А. Бумбуль	–	MSK-L
Гродненская область, Новогрудский район	4 км северо-восточнее д. Бор, ельник мшистый	Ель	П. Н. Белый	10 сентября 2010 г.	MSKH (образец № 5178)
Гродненская область, Свислочский район	1 км юго-восточнее д. Рудни	Береза	В. В. Голубков	29 сентября 1984 г.	MSK-L
Минская область, Логойский район	2 км от г. п. Плещеницы, правая сторона Витебского шоссе, сосняк мшистый	Сосна	В. В. Голубков	22 июля 1975 г.	MSK-L
Минская область, Мядельский район	Национальный парк «На- рочанский», ландшафтный заказник «Голубые озера», окрестности д. Ольшево, пойма р. Страчи, ельник черничный	Сосна	В. В. Голубков	6 августа 1976 г.	MSK-L
Могилёвская область, Осиповичский район	Осиповичский опытный лесхоз, Цельское лесничество, квартал № 23	Береза	Н. В. Горбач	31 мая 1968 г.	MSK-L

Вид *B. kuemmerleana*. Таллом длиной до 10 см, повисающий, от светло-коричневого до темно-коричневого, иногда с темными фрагментами, чаще матовый, в основании и местах ветвления с мучнистым налетом (рис. 3). Углы между ветвями различны. Ветвление нерегулярное, в основном изотомически-дихотомическое, без боковых веточек и колючек. Псевдоцифеллы рассеянные, хорошо заметные, беловато-коричневого цвета. Соралии бугорчатые, щелевидные, шире ветвей, на которых образуются. Апотеции и пикниды не обнаружены.



Рис. 3. Типичный таллом вида *B. kuemmerleana* (а).
На увеличенном фрагменте (б) стрелками указано развитие
мучнистого налета в основании таллома

Fig. 3. Typical thallus of species *B. kuemmerleana* (a).
On the enlarged fragment (b) the arrows indicate the pruina
at the basal part of the thallus

Химический состав. Норстиктовая кислота, иногда атранорин.

Экология. На территории Беларуси вид *B. kuemmerleana* произрастает в различных биотопах: в сосняках собраны 2 образца (40 %), в дубраве и на открытом месте найдено по 1 образцу (в сумме 40 %). Для 1 образца (20 %) информация об условиях произрастания отсутствовала.

В качестве субстрата вид предпочитает кору деревьев. Так, 2 образца (40 %) произрастали на сосне обыкновенной, по 1 образцу (в сумме 60 %) было найдено на ели европейской, березе повислой и дубе черешчатом.

Распространение. Вид *B. kuemmerleana* произрастает в Европе и Азии, чаще встречаясь на севере бореальной зоны [2]. Поскольку ранее этот вид рассматривался в качестве хемотипа группы *B. implexa* s. l., его распространение изучено недостаточно. В Беларуси вид *B. kuemmerleana* встречается крайне редко: известны лишь 5 локалитетов (рис. 4).

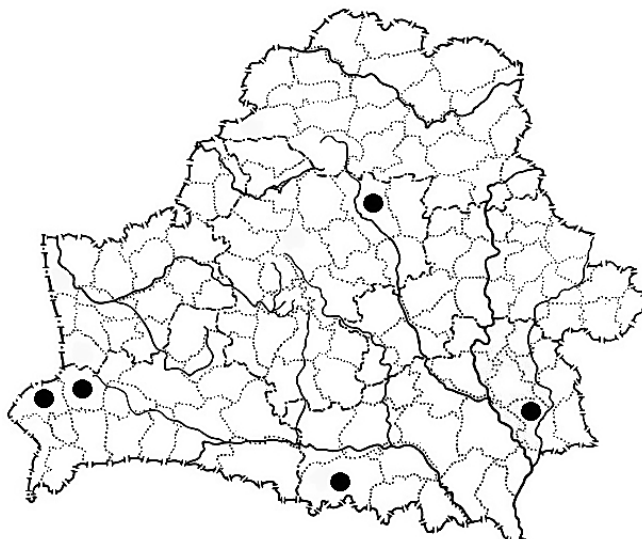


Рис. 4. Распространение вида *B. kuemmerleana* на территории Беларуси

Fig. 4. Distribution of species *B. kuemmerleana* in Belarus

Отличие от схожих таксонов. Ранее вид *B. kuemmerleana* рассматривался в качестве хемотипа группы *B. implexa* s. l., содержащего норстиктовую кислоту [2]. Согласно современным данным от схожих видов *B. kuemmerleana* отличается морфологически (наличием мучнистого налета) и химически (содержанием норстиктовой кислоты) [2; 5]. Результаты исследования показали, что мучнистый налет хорошо развит менее чем у 50 % образцов и также может присутствовать у других видов секции *Implexae* рода *Bryoria*, поэтому наличие норстиктовой кислоты, по-видимому, является единственным четким критерием, позволяющим провести корректную идентификацию изучаемого материала.

Исследованные образцы. Информация о месте и дате сбора, а также коллекторе проанализированных гербарных образцов вида *B. kuemmerleana* приведена в табл. 2.

Таблица 2

Данные этикеток исследованных гербарных образцов вида *B. kuemmerleana*

Table 2

Label data of the studied herbarium specimens of species *B. kuemmerleana*

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Брестская область, Каменецкий район	Национальный парк «Беловежская пуща», Хвойническое лесничество, квартал № 349, 5 км севернее д. Хвойник, дубрава елово-черничная	Поваленная ель	А. Г. Цуриков, В. В. Голубков	9 августа 2018 г.	GSU
Брестская область, Пружанский район	Окрестности г. п. Ружаны, Михалинское лесничество	Сосна	А. И. Осмоловская	Июль 1965 г.	MSK-L

Окончание табл. 2
Ending table 2

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Гомельская область, Гомельский район	Окрестности д. Терюхи, открытое место	Пень дуба	–	18 мая 1980 г.	MSK-L
Гомельская область, Лельчицкий район	Национальный парк «Припятский», Млынокское лесничество, квартал № 104, сосняк березово-вересковый	Береза	В. В. Голубков	13 августа 1982 г.	MSK-L
Минская область, Борисовский район	Окрестности д. Борки, верховое болото, сосняк пушицево-сфагновый	Сосна	В. В. Голубков	22 апреля 1991 г.	MSK-L

Вид *B. vrangiana*. Таллом длиной до 25 см, повисающий, от матового до слегка блестящего, светло-коричневый или коричневый, редко темно-коричневый, крайне редко очень светлый, почти всегда с выраженным оливково-зеленоватым оттенком (рис. 5), часто присутствуют темные (до черных) участки. Углы между ветвями преимущественно тупые. Псевдоцифеллы мелкие, редкие, удлинненно-веретеновидные, одного цвета с талломом. Соралии варьируют в количестве (от обильных до отсутствующих), обычно округлые, выпуклые, шире веточек, на которых расположены. Апотеции и пикниды не обнаружены.



Рис. 5. Типичный таллом вида *B. vrangiana* с оливково-зеленоватым оттенком
Fig. 5. Typical thallus of species *B. vrangiana* showing its olive-green colour

Химический состав. Известны 3 хемотипа этого вида [2; 5] (все они обнаружены в Беларуси): хемотип I характеризуется наличием гирофоровой кислоты, иногда атранорина, соралии могут содержать фумарпротоцеттаровую кислоту (24 образца, или 39,3 %), хемотип II содержит фумарпротоцеттаровую кислоту (35 образцов, или 57,4 %), хемотип III отличается отсутствием химических веществ (2 образца, или 3,3 %).

Экология. На территории Беларуси все 3 хемотипа имеют схожую экологическую и субстратную приуроченность. Вид *B. vrangiana* произрастает как в хвойных (преимущественно сосновых), так и в лиственных лесах. В сосняках были собраны 15 образцов (24,6 %), в березняках – 10 образцов (16,4 %), в лагге болотного массива – 6 образцов (9,8 %), в ельниках – 5 образцов (8,2 %), в дубравах – 4 образца (6,6 %). Для 21 образца (34,4 %) информация об условиях произрастания отсутствовала.

В качестве субстрата вид предпочитает кору деревьев: 35 образцов (57,4 %) произрастали на березе повислой, 10 образцов (16,4 %) – на сосне обыкновенной, 5 образцов (8,2 %) – на ели европейской, 2 образца (3,3 %) – на дубе черешчатом, по 1 образцу (в сумме 3,3 %) – на иве белой (*Salix alba* L.) и липе сердцелистной (*Tilia cordata* Mill.). Еще 1 образец (1,6 %) был найден на заборе. Для оставшихся 6 образцов (9,8 %) информация о субстрате отсутствовала.

Распространение. Вид *B. vrangiana* произрастает в Европе, Азии и Северной Америке [2; 5]. В Беларуси он является самым распространенным представителем рода *Bryoria*, встречаясь преимущественно в северо-западных регионах страны (рис. 6).



Рис. 6. Распространение вида *B. vrangiana* на территории Беларуси:
 а – хемотип I; б – хемотип II; в – хемотип III

Fig. 6. Distribution of species *B. vrangiana* in Belarus:
 a – chemotype I; b – chemotype II; c – chemotype III

Отличие от схожих таксонов. Ранее вид *B. vrangiana* рассматривался в составе хемотипов группы *B. implexa* s. l. [2; 9]. Согласно современной концепции [2] вид является химически вариабельным. При этом по химическому составу достаточно легко могут быть идентифицированы только образцы хемотипа I, содержащие гирофоровую кислоту, поскольку остальные виды рода *Bryoria* на территории Европы не продуцируют это вещество. Морфологически образцы всех 3 хемотипов отличаются характерным оливковым оттенком, который наблюдается как у темноокрашенных, так и у светлоокрашенных форм, а также наличием удлинненно-веретеновидных псевдоцифелл одного цвета с талломом.

Исследованные образцы. Информация о месте и дате сбора, а также коллекторе проанализированных гербарных образцов вида *B. vrangiana* приведена в табл. 3.

Таблица 3

Данные этикеток исследованных гербарных образцов вида *B. vrangiana*

Table 3

Label data of the studied herbarium specimens of species *B. vrangiana*

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
<i>Хемотип I</i>					
Брестская область, Каменецкий район	Национальный парк «Беловежская пуща», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 825	Береза	В. В. Голубков	1982 г.	MSK-L

Продолжение табл. 3
Continuation of the table 3

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Брестская область, Лунинецкий район	Окрестности аг. Дятловичи	Забор	Н. В. Кацуба	25 августа 1999 г.	MSK-L
Брестская область, Пружанский район	Национальный парк «Беловежская пуща», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 591, окрестности хут. Перерово, дубрава кисличная	–	В. В. Голубков	25 июля 1984 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуща», Переровское лесничество, квартал № 588, край верхового болота	Ива	В. В. Голубков	22 июня 1983 г.	MSK-L
Витебская область, Верхнедвинский район	Окрестности д. Прошки, сосняк вересковый	Береза	В. В. Голубков	5 июня 1982 г.	MSK-L
	1 км западнее д. Сукали, сосняк чернично-мшистый	–	В. В. Голубков	18 июня 1986 г.	MSK-L
	Окрестности д. Сукали, остров на оз. Освея, сосняк березово-черничный	Береза	В. В. Голубков	17 июня 1986 г.	MSK-L
Витебская область, Глубокский район	Глубокское лесничество, квартал № 89	Береза	Н. В. Горбач	10 июля 1958 г.	MSK-L
Витебская область, Лепельский район	Березинский биосферный заповедник, Домжерицкое лесничество, лагг болотного массива Савский Мох	Береза	П. Н. Белый	18 сентября 2006 г.	MSKH (образец № 6592)
	Березинский биосферный заповедник, Домжерицкое лесничество, квартал № 270	Береза	П. Н. Белый	20 октября 2006 г.	MSKH (образец № 6583)
	Березинский биосферный заповедник, ур. Залазы	Сосна	Н. В. Горбач	–	MSK-L
	Военная база «Боровка»	Береза	П. Н. Белый	22 мая 2010 г.	MSKH (образец № 6604)
	2,5 км юго-восточнее д. Барсуки	Ель	П. Н. Белый	21 июля 2016 г.	MSKH (образец № 6619)
	2 км западнее д. Домжерицы, опушка березняка	Береза	В. В. Голубков	18 мая 1986 г.	MSK-L
	2 км западнее д. Рожно, сосняк можжевельново- мшистый	Сосна	В. В. Голубков	18 мая 1986 г.	MSK-L
Гомельская область, Житковичский район	Национальный парк «Припятский», Переровское лесничество, квартал № 20	Сосна	О. П. Шахрай	18 июля 1973 г.	GSU

Продолжение табл. 3
 Continuation of the table 3

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Гродненская область, Свислочский район	Национальный парк «Беловежская пуца», Свислочское лесничество, квартал № 34, 2 км северо- восточнее аг. Доброволя, ельник черничный	Ель	–	30 сентября 1984 г.	MSK-L
Минская область, Борисовский район	3,5 км западнее г. Борисова, правобережная часть долины р. Березины, сосняк с березой	Береза	А. Н. Скуратович	5 мая 2000 г.	MSK-L
Минская область, Воложинский район	Налибокская пуца, ельник мшистый	Ель	В. В. Голубков	9 сентября 1973 г.	MSK-L
Минская область, Логойский район	Окрестности г. п. Плещеницы, возле правой стороны Витебского шоссе (по направлению от г. п. Плещеницы), березняк можжевельново- разнотравный	Береза	–	22 июля 1975 г.	MSK-L
	2 км от г. п. Плещеницы, правая сторона Витебского шоссе, сосняк мшистый	Сосна	–	7 октября 2000 г.	MSK-L
Минская область, Минский район	Окрестности д. Слободщины, обочина Московского шоссе	Липа	Г. Былицкий	8 ноября 1975 г.	MSK-L
Минская область, Мядельский район	Окрестности оз. Нарочь, д. Степеново, сосняк мшистый	Сосна	–	18 июля 1979 г.	MSK-L
Могилёвская область, Осиповичский район	Осиповичский опытный лесхоз, Цельское лесничество, квартал № 23	Береза	Н. В. Горбач	31 мая 1968 г.	MSK-L
<i>Хемотип II</i>					
Брестская область, Каменецкий район	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 740, выдел № 38, ельник кисличный	Ель	П. Н. Белый	17 октября 2009 г.	MSKH (образец № 1992)
	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 830	Береза	В. В. Голубков	1983 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», Королево-Мостовское лесничество, квартал № 777, 3,5 км северо-восточнее д. Каменюки	Дуб	В. В. Голубков	–	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуца», окрестности д. Каменки, вдоль дороги	Сосна	Г. В. Вынаев, Третьяков	22 февраля 1981 г.	MSK-L

Продолжение табл. 3
Continuation of the table 3

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Брестская область, Каменецкий район	Национальный парк «Беловежская пуща», Пашуковское лесничество, терраса р. Лесной, окрестности д. Подбельские Огородники	–	–	28 июля 1972 г.	MSK-L
Брестская область, Пружанский район	Национальный парк «Беловежская пуща», Переровское лесничество, квартал № 712, 4 км западнее хут. Вискули, дубрава разнотравная	Дуб	В. В. Голубков	20 июня 1983 г.	MSK-L
	Национальный парк «Беловежская пуща», Переровское лесничество, квартал № 712, 4 км западнее хут. Вискули, дубрава разнотравная	Береза	В. В. Голубков	20 июня 1983 г.	MSK-L
	Шоссе на г. Пружаны, сосняк вересковый	Сосна	Е. Е. Блудов	13 мая 1977 г.	MSK-L
Витебская область, Верхнедвинский район	1 км западнее д. Сукали, переходная полоса от сосняка сфагнового в сосняк чернично-мшистый	–	В. В. Голубков	18 июня 1986 г.	MSK-L
Витебская область, Докшицкий район	Окрестности д. Малые Ситцы	Ель	М. П. Томин	1 августа 1946 г.	MSK-L
Витебская область, Лепельский район	Военная база «Боровка»	Береза	П. Н. Белый	22 мая 2010 г.	MSKH (образец № 6605)
	Березинский биосферный заповедник, Домжерицкое лесничество, квартал № 270, лагг болотного массива Савский Мох	Береза	П. Н. Белый	20 октября 2006 г.	MSKH (образец № 6573)
	Березинский биосферный заповедник, Домжерицкое лесничество, квартал № 284, выдел № 7	Береза	П. Н. Белый	18 сентября 2006 г.	MSKH (образец № 6597)
	Березинский биосферный заповедник, Домжерицкое лесничество, квартал № 284, выдел № 7	Береза	П. Н. Белый	19 сентября 2006 г.	MSKH (образец № 6611)
	Березинский биосферный заповедник, Домжерицкое лесничество, квартал № 314, ур. Лужа, сосняк долгомошный	Береза	П. Н. Белый	20 сентября 2006 г.	MSKH (образец № 6614)
	Березинский биосферный заповедник, Крайцевское лесничество, квартал № 560, выдел № 6, у берега Пострежского болота	Сосна	П. Н. Белый	18 апреля 2007 г.	MSKH (образец № 6601)

Продолжение табл. 3
 Continuation of the table 3

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Витебская область, Лепельский район	Березинский биосферный заповедник, 2 км западнее д. Домжерицы, перекресток шоссе, опушка березняка	Береза	В. В. Голубков	18 мая 1986 г.	MSK-L
Витебская область, Россонский район	2 км юго-западнее д. Межно, сосняк елово-березово-вересково-мшистый	Береза	В. В. Голубков	2 сентября 1988 г.	MSK-L
	Окрестности д. Мошницы, березняк	Береза	В. В. Голубков	26 июня 1986 г.	MSK-L
	Окрестности д. Ножницы и оз. Синьша, березняк	Береза	В. В. Голубков	23 июня 1986 г.	MSK-L
	Окрестности д. Юховичи, ельник сосново-березово-чернично-мшистый	Береза	В. В. Голубков	30 сентября 1987 г.	MSK-L
	9 км северо-западнее д. Юховичи, край верхового болота, сосняк черничный	–	В. В. Голубков	3 октября 1986 г.	MSK-L
	Южный берег болота Большой Мох	Сосна	В. В. Голубков	15 октября 1984 г.	MSK-L
Гомельская область, Житковичский район	Национальный парк «Припятский», Переровское лесничество, квартал № 3, окрестности д. Хлупин, пойменная дубрава	Береза	В. В. Голубков	24 августа 1983 г.	MSK-L
Гомельская область, Лельчицкий район	Национальный парк «Припятский», Сологубовское лесничество, березняк злаковый	Береза	О. П. Шахрай	23 июля 1975 г.	GSU
Гомельская область, Мозырский район	Мозырская гряда, березняк орляковый	Береза	–	26 августа 1976 г.	MSK-L
	Окрестности д. Провтюки, березняк орляковый	Береза	В. В. Голубков	26 августа 1977 г.	MSK-L
Гомельская область, Светлогорский район	г. Светлогорск (лесопарк «Ю.-3.»), сосняк мшистый с березой	Береза	Л. А. Кравчук	8 июля 1999 г.	MSK-L
Гродненская область, Мостовский район	2 км севернее д. Черленки, берег р. Щары	Береза	Г. П. Антонов	15 мая 1987 г.	MSK-L
	2 км севернее д. Черленки, берег р. Щары	Береза	Г. П. Антонов	19 мая 1987 г.	MSK-L
Гродненская область, Свислочский район	Язвинское лесничество, квартал № 110, сосняк мшистый	Береза	В. В. Голубков	25 июля 1984 г.	MSK-L
Минская область, Борисовский район	Окрестности д. Борки, верховое болото, сосняк пушицево-сфагновый	Сосна	–	22 апреля 1991 г.	MSK-L
Минская область, Воложинский район	Раковское лесничество, квартал № 40, выдел № 6, 0,37 км юго-восточнее д. Душково, ельник мшистый	–	П. Н. Белый	28 июля 2009 г.	MSKH (образец № 6570)

Окончание табл. 3
Ending table 3

Регион	Локалитет	Субстрат	Коллектор	Дата сбора	Гербарий
Минская область, Логойский район	Окрестности г. п. Плещеницы, возле правой стороны Витебского шоссе (по направлению от г. п. Плещеницы), березняк разнотравный	Береза	В. В. Голубков	22 июля 1975 г.	MSK-L
Минская область, Мядельский район	Ландшафтный заказник «Голубые озера», березняк елово-черничный	Береза	В. В. Голубков	8 августа 1975 г.	MSK-L
<i>Хемотип III</i>					
Минская область, Дзержинский район	Негорельский учебно-опытный лесхоз	Береза	Н. В. Горбач	1952 г.	MSK-L
Витебская область, Глубокский район	Глубокское лесничество, квартал № 89	Береза	Н. В. Горбач	10 июля 1958 г.	MSK-L

Заключение

В результате ревизии 207 образцов лишайников рода *Bryoria* с использованием метода тонкослойной хроматографии были выявлены 61 образец вида *B. vrangiana*, 32 образца вида *B. implexa* s. str. и 5 образцов вида *B. kuemmerleana*. Виды *B. kuemmerleana* и *B. vrangiana* впервые приводятся для территории Беларуси, причем вид *B. vrangiana* является наиболее распространенным представителем изучаемого рода в республике. Полученные в ходе исследования данные уточняют экологию и географию вышеуказанных видов как в пределах Беларуси, так и в пределах Европы в целом.

Библиографические ссылки

- Nadyeina O, Cornejo C, Boluda CG, Myllys L, Rico VJ, Crespo A, et al. Characterization of microsatellite loci in lichen-forming fungi of *Bryoria* section *Implexae* (Parmeliaceae). *Applications in Plant Sciences*. 2014;2(7):1400037. DOI: 10.3732/apps.1400037.
- Velmalala S, Myllys L, Goward T, Holien H, Halonen P. Taxonomy of *Bryoria* section *Implexae* (Parmeliaceae, Lecanoromycetes) in North America and Europe, based on chemical, morphological and molecular data. *Annales Botanici Fennici*. 2014;51(6):345–371. DOI: 10.5735/085.051.0601.
- Boluda CG, Rico VJ, Divakar PK, Nadyeina O, Myllys L, McMullin RT, et al. Evaluating methodologies for species delimitation: the mismatch between phenotypes and genotypes in lichenized fungi (*Bryoria* sect. *Implexae*, Parmeliaceae). *Persoonia*. 2019; 42:75–100. DOI: 10.3767/persoonia.2019.42.04.
- Nimis PL, Martellos S. *ITALIC 7.0, The Information System on Italian Lichens* [Internet]. Trieste: University of Trieste, Department of Life Sciences; 2022 [cited 2023 January 21]. Available from: <https://italic.units.it>.
- Андреев МП, Ахти Т, Гагарина ЛВ, Гимельбрант ДЕ, Жданов ИС, Конорева ЛА и др. *Флора лишайников России: семейство Parmeliaceae = The lichen flora of Russia: family Parmeliaceae*. Андреев МП, Ахти Т, Гагарина ЛВ, Гимельбрант ДЕ, редакторы. Москва: Товарищество научных изданий КМК; 2022. 187 с.
- Tsurykau A. A provisional checklist of the lichens of Belarus. *Opuscula Philolichenum*. 2018;17:374–479.
- Яцына АП, Голубков ВВ, Гимельбрант ДЕ, Конорева ЛА, Кузнецова ЕС, Чесноков СВ. *Флора Беларуси: лишайники. Том 1*. Парфенов ВИ, редактор. Минск: Беларуская навука; 2019. 341 с.
- Горбач НВ. Лишайники роду *Alectoria* Ach. у Беларусі. *Весці Акадэміі навук Беларускай ССР. Серыя біялагічных навук*. 1965;1:55–58.
- Myllys L, Velmalala S, Holien H. *Bryoria*. In: Thell A, Moberg R, editors. *Nordic lichen flora. Volume 4, Parmeliaceae*. Göteborg: Zetterqvist Tryckeri AB; 2011. p. 26–37.

References

- Nadyeina O, Cornejo C, Boluda CG, Myllys L, Rico VJ, Crespo A, et al. Characterization of microsatellite loci in lichen-forming fungi of *Bryoria* section *Implexae* (Parmeliaceae). *Applications in Plant Sciences*. 2014;2(7):1400037. DOI: 10.3732/apps.1400037.
- Velmalala S, Myllys L, Goward T, Holien H, Halonen P. Taxonomy of *Bryoria* section *Implexae* (Parmeliaceae, Lecanoromycetes) in North America and Europe, based on chemical, morphological and molecular data. *Annales Botanici Fennici*. 2014;51(6):345–371. DOI: 10.5735/085.051.0601.
- Boluda CG, Rico VJ, Divakar PK, Nadyeina O, Myllys L, McMullin RT, et al. Evaluating methodologies for species delimitation: the mismatch between phenotypes and genotypes in lichenized fungi (*Bryoria* sect. *Implexae*, Parmeliaceae). *Persoonia*. 2019; 42:75–100. DOI: 10.3767/persoonia.2019.42.04.

4. Nimis PL, Martellos S. *ITALIC 7.0, The Information System on Italian Lichens* [Internet]. Trieste: University of Trieste, Department of Life Sciences; 2022 [cited 2023 January 21]. Available from: <https://italic.units.it>.
5. Andreev MP, Ahti T, Gagarina LV, Himelbrant DE, Zhdanov IS, Konoreva LA, et al. *The lichen flora of Russia: family Parmeliaceae*. Andreev MP, Ahti T, Gagarina LV, Himelbrant DE, editors. Moscow: KMK Scientific Press; 2022. 187 p. Russian.
6. Tsurykau A. A provisional checklist of the lichens of Belarus. *Opuscula Philolichenum*. 2018;17:374–479.
7. Yatsyna AP, Golubkov VV, Himelbrant DE, Konoreva LA, Kuznetsova ES, Chesnokov SV. *Flora Belarusi: lishainiki. Tom 1* [Flora of Belarus: lichens. Volume 1]. Parfenov VI, editor. Minsk: Belaruskaja navuka; 2019. 341 p. Russian.
8. Gorbach NV. [Lichens of the genus *Alectoria* Ach. in Belarus]. *Vesci Akadjemii navuk Belaruskaj SSR. Seryja bijalagichnyh navuk*. 1965;1:55–58. Belarusian.
9. Myllys L, Velmala S, Holien H. *Bryoria*. In: Thell A, Moberg R, editors. *Nordic lichen flora. Volume 4, Parmeliaceae*. Göteborg: Zetterqvist Tryckeri AB; 2011. p. 26–37.

Получена 24.01.2023 / исправлена 20.02.2023 / принята 22.02.2023.
Received 24.01.2023 / revised 20.02.2023 / accepted 22.02.2023.

**КОМПЛЕКСЫ ЧЛЕНИСТОНОГИХ-ФИТОФАГОВ
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКАНСКОГО ЛАНДШАФТНОГО
ЗАКАЗНИКА «ОЗЕРЫ» (ГРОДНЕНСКАЯ ОБЛАСТЬ, БЕЛАРУСЬ)****А. В. РЫЖАЯ¹⁾, Е. И. ГЛЯКОВСКАЯ¹⁾**¹⁾Гродненский государственный университет им. Янки Купалы,
ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Беларусь

Установлены состояние и функционирование сообществ аборигенных и инвазивных видов фитофагов, повреждающих древесно-кустарниковые растения на особо охраняемых природных территориях Гродненско-Предполеского региона. В полевой сезон 2021 г. на пробных площадях республиканского ландшафтного заказника «Озеры» выявлены представители 2 классов членистоногих – Arachnida (паукообразные) и Insecta Ectognatha (насекомые открыточелюстные). Всего обнаружено 85 видов фитофагов из 54 родов, 19 семейств и 6 отрядов (Prostigmata, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera и Lepidoptera). Наибольшее количество видов (29 видов, или 34 % от их общего числа) относятся к отряду Lepidoptera (чешуекрылые). Подавляющая часть зарегистрированных членистоногих-фитофагов (18 видов из 14 родов, 9 семейств и 4 отрядов) в качестве кормового растения используют дуб черешчатый (*Quercus robur* L., 1753). На обследованных пробных площадях отмечены 11 инвазивных видов. Наибольшее количество инвазивных фитофагов трофически связаны с робинией обыкновенной (*Robinia pseudoacacia* L., 1753). Полученные данные могут быть использованы для выявления угроз от внедрения инвазивных видов в нативные сообщества.

Ключевые слова: членистоногие-фитофаги; таксономическая структура; трофическая специализация; инвазивные виды; древесно-кустарниковые растения; Гродненско-Предполесский регион; особо охраняемые природные территории.

Благодарность. Работа основана на результатах исследований, проведенных в рамках выполнения комплексного задания «Проблемы биологических инвазий и паразитарных угроз в природных и антропогенно трансформированных экосистемах» государственной программы научных исследований «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг. Авторы выражают благодарность доктору биологических наук О. В. Созинову за помощь в идентификации растений.

Образец цитирования:

Рыжая АВ, Гляковская ЕИ. Комплексы членистоногих-фитофагов на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры» (Гродненская область, Беларусь). *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:81–90.
EDN: CFNBOI

For citation:

Rhyzhaya AV, Hliakouskaya KI. Arthropod phytophages complexes on the territory of the republican landscape reserve «Ozeru» (Grodno Region, Belarus). *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:81–90. Russian.
EDN: CFNBOI

Авторы:

Александра Васильевна Рыжая – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры зоологии и физиологии человека и животных факультета биологии и экологии.

Екатерина Ивановна Гляковская – кандидат биологических наук; доцент кафедры зоологии и физиологии человека и животных факультета биологии и экологии.

Authors:

Aleksandra V. Rhyzhaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of zoology and physiology of human and animals, faculty of biology and ecology.

rhyzhaya@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0009-1128-3644>

Katsiaryna I. Hliakouskaya, PhD (biology); associate professor at the department of zoology and physiology of human and animals, faculty of biology and ecology.

ekaterina.g91@mail.ru

ARTHROPOD PHYTOPHAGES COMPLEXES ON THE TERRITORY OF THE REPUBLICAN LANDSCAPE RESERVE «OZERY» (GRODNO REGION, BELARUS)

A. V. RHYZHAYA^a, K. I. HLIKOUSKAYA^a

^aYanka Kupala State University of Grodno, 22 Azheshka Street, Grodna 230023, Belarus

Corresponding author: A. V. Rhyzhaya (rhyzhaya@mail.ru)

The state and functioning of native and invasive species of phytophages communities that damage trees and shrubs in specially protected natural areas of the Grodno-Predpolessky region were established. In the field season of 2021, representatives of 2 classes of arthropods have been identified on the territory of the republican landscape reserve «Ozery» – the class Arachnida and the class Insecta Ectognatha. In total, 85 species of phytophages from 54 genera, 19 families and 6 orders (Prostigmata, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera and Lepidoptera) were found. The largest number of species (29 species, or 34 % of their total number) belongs to the order Lepidoptera. The vast majority of registered arthropod phytophages (18 species from 14 genera, 9 families and 4 orders) use English oak (*Quercus robur* L., 1753) as a food plant. In total, 11 invasive species was noted in the surveyed sample plots. The largest number of invasive phytophages is trophically associated with black locust (*Robinia pseudoacacia* L., 1753). The data obtained to identify threats from the introduction of invasive species into native communities can be used.

Keywords: arthropod phytophages; taxonomic structure; trophic specialisation; invasive species; trees and shrubs; Grodno-Predpolessky region; specially protected natural areas.

Acknowledgements. This work is based on the results of studies, which were carried out as part of the complex task «Problems of biological invasions and parasitic threats in natural and anthropogenically transformed ecosystems» of the state programme of scientific research «Natural resources and the environment» for 2021–2025. The authors thank doctor of science (biology) O. V. Sozinov for the help in the identification of plants.

Введение

Гродненско-Предполесский регион, характеризующийся спецификой природно-климатических условий, в целом отличается слабой изученностью энтомофауны особо охраняемых природных территорий (ООПТ), что связано с отсутствием научных отделов и научных сотрудников в системе управления заказниками. Научно-исследовательские работы на ООПТ Беларуси посвящены в первую очередь инвентаризации флоры и фауны, изучению гидрологического режима и исследованию наиболее значимых биоценозов. Таксономический состав, особенности биологии и экологии, уровень вредоносности членистоногих-фитофагов на ООПТ Гродненско-Предполесского региона оставались неустановленными, так как на территории республиканских ландшафтных заказников региона подобного рода исследования ранее не проводились.

В основу настоящей работы положены материалы энтомофитопатологических обследований древесно-кустарниковых растений, выполнявшихся на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры» с мая по октябрь 2021 г. Заказник расположен в 15 км к северо-востоку от г. Гродно и к северу от аг. Озеры¹. Координаты центральной части в системе координат 1984 г. (WGS-84) – 53°47'40,4268" с. ш., 24°2'39,2393" в. д. Максимальная протяженность с севера на юг – 16,6 км, с запада на восток – 21 км.

Республиканский ландшафтный заказник «Озеры» является сложным лесным и водно-болотным природным комплексом, который местами нарушен хозяйственной деятельностью, а именно мелиорацией торфяников, вырубками леса, застройкой, сельскохозяйственным и дорожным освоением территорий, полными посадками лесных культур и рекультивацией насаждений². Растительные сообщества в пределах заказника представлены лесной, болотной, прибрежно-водной и водной растительностью, незначительно распространены луговые фитоценозы и синантропные растительные группировки.

Материалы и методы исследования

В полевой сезон 2021 г. нами выполнены энтомофитопатологические обследования основных типов лесных экосистем республиканского ландшафтного заказника «Озеры». Ранее подобные исследования на территории заказника не проводились.

Пробные площади выбирали с учетом присутствия синантропных растительных группировок и расположения населенных пунктов различного типа. Всего обследовали 4 пробные площади, исходя из гипотезы, что центрами внедрения инвазивных видов в нативные сообщества являются человеческие поселения (рис. 1).

¹Подготовка представления о преобразовании республиканского ландшафтного заказника «Озеры»: отчет о НИР (заключ.) / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича; рук. А. В. Пучило. Минск, 2012. 135 с. № ГР 20122194. Инв. № 79199.

²Там же.

Пробная площадь О1 – окрестности туристической базы «Химик», расположенной на территории заказника в 40 км от г. Гродно в сосновом бору на берегу оз. Белое. Координаты GPS – 53°48' 18,4" с. ш., 24° 10' 58,5" в. д. Основу древесного яруса составляет сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L., 1753), также встречаются дуб черешчатый (*Quercus robur* L., 1753), осина (*Populus tremula* L., 1753), рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L., 1753), лещина обыкновенная (*Corylus avellana* (L.) H. Karst., 1881), береза повислая (*Betula pendula* Roth, 1788). Из кустарников произрастает можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis* L., 1753), из полукустарников – малина обыкновенная (*Rubus idaeus* L., 1753).

Пробная площадь О2 – окрестности д. п. Подбелое, расположенного между агрогородками Озеры и Поречье в 1,5 км от туристической базы «Химик». Координаты GPS – 53°49' 23,9" с. ш., 24° 10' 29,9" в. д. Поселок окружен сосняком, также здесь произрастают дуб черешчатый, осина, лещина обыкновенная, береза повислая, рябина обыкновенная, по окраинам поселка отмечены интродуценты – смородина красная (*Ribes rubrum* L., 1753), орех грецкий (*Juglans regia* L., 1753), робиния обыкновенная (*Robinia pseudo-acacia* L., 1753), каштан конский (*Aesculus hippocastanum* L., 1753).

Пробная площадь О3 – окрестности аг. Озеры, расположенного в 25 км к северо-востоку от г. Гродно на берегах озер Рыбница и Белое. Координаты GPS – 53°43' 28,2" с. ш., 24° 12' 5,9" в. д. Обследованный участок располагается вдоль автодороги Гродно – Острино. Основу древостоя составляет сосна обыкновенная, также встречаются яблоня домашняя (*Malus domestica* Borkh., 1803), рябина обыкновенная, ива (*Salix* sp.), осина, дуб черешчатый, клен остролистный (*Acer platanoides* L., 1753), жостер слабительный (*Rhamnus cathartica* L. (1753)), ель обыкновенная (*Picea abies* (L.) H. Karst., 1881), каштан конский.

Пробная площадь О4 – сосновый лес за д. Рыбницей, расположенный в 21 км от г. Гродно. Координаты GPS – 53°49' 22,8" с. ш., 24° 2' 44,16" в. д. Здесь произрастают береза повислая, робиния обыкновенная, орех грецкий, яблоня домашняя, ель обыкновенная, а также липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill., 1768), ольха черная (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., 1791), ива козья (*Salix caprea* L., 1753), боярышник (*Crataegus* sp.).

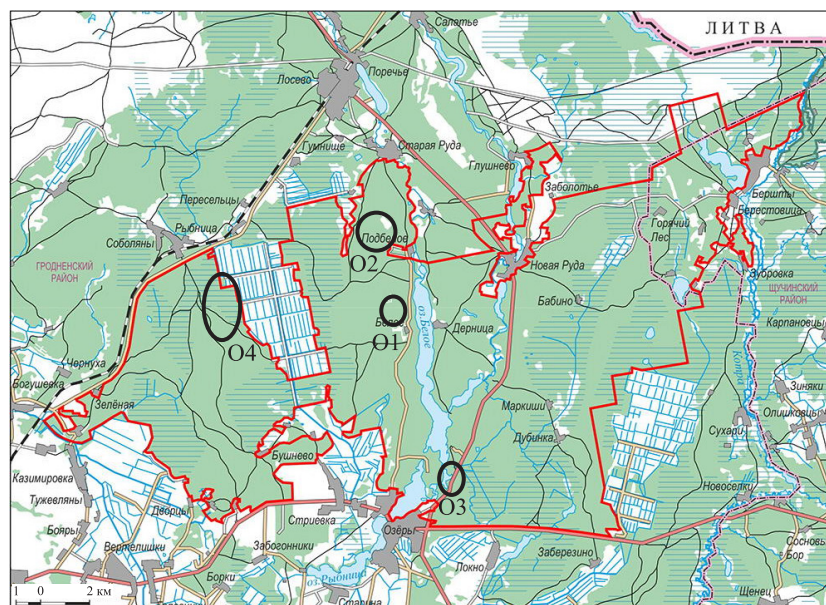


Рис. 1. Карта мест проведения исследований на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры»: пробная площадь О1 – окрестности туристической базы «Химик»; пробная площадь О2 – окрестности д. п. Подбелое; пробная площадь О3 – окрестности аг. Озеры; пробная площадь О4 – сосновый лес за д. Рыбницей

Fig. 1. Map of research plots on the territory of the republican landscape reserve «Ozery»: sample plot O1 – surroundings of the tourist base «Khimik»; sample plot O2 – surroundings of the dacha village Podbeloe; sample plot O3 – surroundings of the agro-town Ozery; sample plot O4 – pine forest behind the village Rybnitsa

Сбор материала осуществляли по стандартным методикам энтомологических исследований [1]. В ходе визуального осмотра древесно-кустарниковых растений выявляли фитофагов-вредителей, а также вызванные ими повреждения. Фрагменты растений с фитофагами и (или) повреждениями собирали для последующего анализа в лабораторных условиях. Гербаризацию осуществляли по соответствующим

методикам [2]. Таксономическую принадлежность членистоногих устанавливали с использованием тематических атласов-определителей и справочников [3–8], а также специализированных интернет-порталов. Растения идентифицировали с помощью сайта *plantarium.ru*. Правильность определения растений подтверждена О. В. Созиновым, доктором биологических наук, заведующим кафедрой ботаники факультета биологии и экологии Гродненского государственного университета имени Янки Купалы. Для анализа результатов составляли базовые списки в табличном процессоре *Excel 2016 (Microsoft, США)*. Оценку уровня вредоносности фитофагов осуществляли согласно специальной 4-балльной шкале, предложенной С. В. Горленко с соавторами [9]. Материал хранится в лаборатории зоологии беспозвоночных кафедры зоологии и физиологии человека и животных факультета биологии и экологии Гродненского государственного университета имени Янки Купалы.

Результаты и их обсуждение

По итогам исследований на 4 пробных площадях республиканского ландшафтного заказника «Озере» установлено обитание 85 видов³ членистоногих-фитофагов из 54 родов и 19 семейств [10]. Зарегистрированные виды принадлежат к 6 отрядам из 2 классов – Arachnida (паукообразные) и Insecta Ectognatha (насекомые открыточелюстные). Наибольшее количество видов (29 видов, или 34 % от их общего числа) относятся к отряду Lepidoptera (чешуекрылые). Из отряда Hymenoptera (перепончатокрылые) выявлены 14 видов (17 % от их общего числа), из отряда Prostigmata – 12 видов (14 %), из отрядов Diptera (двукрылые) и Coleoptera (жесткокрылые) – по 11 видов (13 %). Наименьшим количеством видов (8 видов, или 9 % от их общего числа) представлен отряд Hemiptera (полужесткокрылые).

Анализ распределения фитофагов по семействам показал преобладание представителей семейства Gracillariidae (моли-пестрянки): к нему принадлежал 21 вид (рис. 2). Семейство Eriophyidae (галловые клещи) представлено 12 видами, семейства Cecidomyiidae (комары-галлицы) и Tenthredinidae (настоящие пилильщики) насчитывают по 10 видов, семейство Cynipidae (орехотворки) – 6 видов, которые отмечены исключительно на дубе черешчатом.

Семейства Chrysomelidae (листоеды), Attelabidae (трубковерты), Aphididae (настоящие тли), Nepticulidae (моли-малютки) и Lyonetiidae (крохотки-моли) в сборах представлены 2–5 видами. Остальные семейства фитофагов малочисленны и представлены 1 видом.

В ходе исследований на территории заказника выявлены 16 видов из 15 родов, 9 семейств (Agromyzidae, Attelabidae, Cecidomyiidae, Curculionidae, Eriophyidae, Gelechiidae, Gracillariidae, Nepticulidae и Tortricidae) и 4 отрядов (Coleoptera, Prostigmata, Lepidoptera и Diptera), которых ранее в зеленых насаждениях урбоценозов Гродненско-Предполесского региона не регистрировали.

Важную часть региональных эколого-фаунистических исследований составляет изучение распределения растительноядных насекомых и клещей по таксонам кормовых растений. Наличие либо отсутствие в местной флоре растений-хозяев однозначно определяет возможность существования в этих условиях популяций многих фитофагов [11]. По итогам анализа полученных в ходе исследований данных установлено обитание выявленных видов членистоногих-фитофагов на 24 таксонах древесно-кустарниковых растений (рис. 3).

³*Aceria cephalonea* (Nalepa, 1922), *A. erinea* (Nalepa, 1891), *A. platanoidea* (Nalepa, 1922), *A. varia* (Nalepa, 1892), *Acrocerops brongniardella* (Fabricius, 1798), *Aculus craspedobius* (Nalepa, 1925), *A. tetanothrix* (Nalepa, 1889), *Adelges tardus* (Dreyfus, 1888), *Agelastica alni* Linnaeus, 1758, *Agromyza alnibetulae* Hensel, 1931, *Andricus curvator* Hartig, 1840, *A. foecundatrix* (Hartig, 1840), *Apoderus coryli* (Linnaeus, 1758), *Attelabus nitens* (Scopoli, 1763), *Blennocampa phyllocolpa* Viitasaari & Vikberg, 1985, *Byctiscus betulae* (Linnaeus, 1758), *Caliroa cinxia* (Klug, 1816), *Callisto denticulella* (Thunberg, 1794), *Caloptilia alchimiella* (Scopoli, 1763), *C. hemidactylella* (Denis & Schiffermüller, 1775), *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, 1986, *Chrysomela lapponica* Linnaeus, 1758, *Ch. populi* Linnaeus, 1758, *Contarinia petioli* (Kieffer, 1898), *Cryptomyzus ribis* (Linnaeus, 1758), *Cynips longiventris* Hartig, 1840, *Dasineura rosaria* (Loew, 1850), *D. tiliae* (Schrank, 1803), *Deporaus betulae* (Linnaeus, 1758), *Didymomyia tiliacea* (Bremi, 1847), *Drepanosiphum platanooidis* Schrank, 1801, *Eriophyes laevis* (Nalepa, 1889), *E. leiosoma* (Nalepa, 1892), *E. pyri* (Pagenstecher, 1857), *E. tiliae* (Pagenstecher, 1857), *Fenusia pumila* Leach, 1817, *Harmandiola globuli* (Rübsaamen, 1889), *H. tremulae* (Winnertz, 1853), *Heterarthrus flavicollis* (Gussakovskij, 1947), *H. nemoratus* (Fallén, 1808), *Incurvaria pectinea* Haworth, 1828, *Iteomyia capreae* (Winnertz, 1853), *Lasioptera rubi* (Schrank, 1803), *Leucoptera malifoliella* (O. Costa, 1836), *Lyonetia clerkella* (Linnaeus, 1758), *Macrodiplosis dryobia* (Löw, 1877), *Macrosaccus robiniella* (Clemens, 1859), *Nematus tibialis* Newman, 1837, *Neuroterus anthracinus* (Curtis, 1838), *N. numismalis* (Fourcroy, 1785), *N. quercusbaccarum* (Linnaeus, 1758), *Obolodiplosis robiniae* (Haldeman, 1847), *Orchestes quercus* (Linnaeus, 1758), *Panaphis juglandis* (Goeze, 1778), *Paractopa robiniella* Clemens, 1863, *Parna apicalis* (Brischke, 1888), *Parornix scoticella* (Stainton, 1850), *Phratora vitellinae* (Linnaeus, 1758), *Phyllocnistis saligna* (Zeller, 1839), *Ph. unipunctella* (Stephens, 1834), *Ph. xenia* Hering, 1936, *Phyllocolpa oblita* (Serville, 1823), *Phyllocoptes goniothorax* (Nalepa, 1889), *Ph. populi* Nalepa, 1894, *Phyllonorycter issikii* (Kumata, 1963), *Ph. joannisi* (Le Marchand, 1936), *Ph. nicellii* (Stainton, 1851), *Ph. oxyacanthae* (Frey, 1856), *Ph. pastorella* (Zeller, 1846), *Ph. quercifoliella* (Zeller, 1839), *Ph. rajella* (Linnaeus, 1758), *Ph. roboris* (Zeller, 1839), *Ph. sagitella* (Bjerkander, 1790), *Ph. ulmifoliella* (Hübner, 1817), *Plagioderia versicolora* (Laicharting, 1781), *Pontania pedunculi* (Hartig, 1837), *Prionus coriarius* Linnaeus, 1758, *Profenusia pygmaea* (Klug, 1816), *Retinia resinella* (Linnaeus, 1758), *Stenolechia gemmella* (Linnaeus, 1758), *Stigmella aceris* (Frey, 1857), *S. nylandriella* (Tengström, 1848), *S. roborella* (Johansson, 1971), *Tischeria ekebladella* (Bjerkander, 1795), *Trichoermes walkeri* Foerster, 1848.

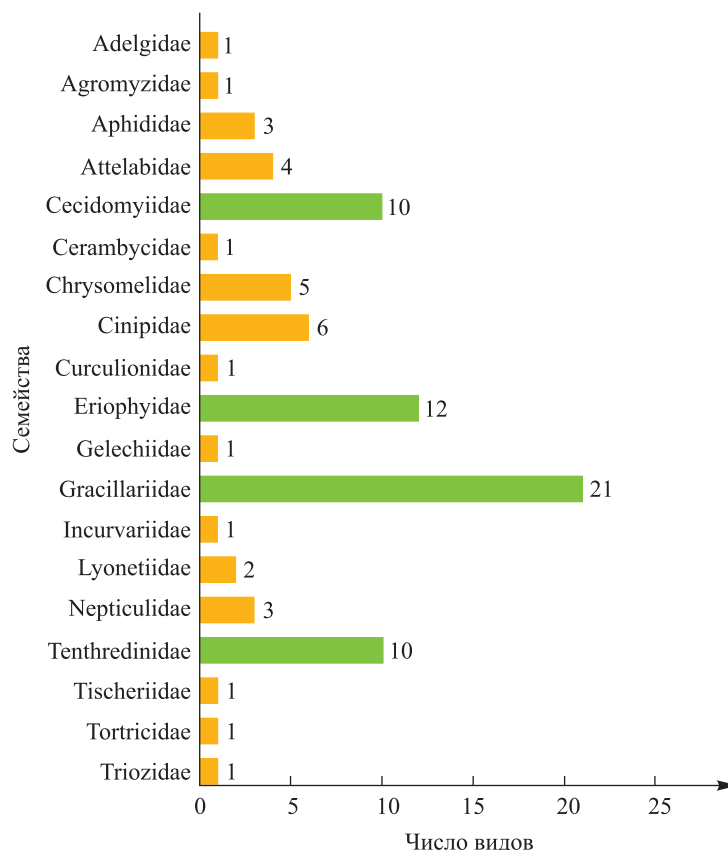


Рис. 2. Распределение комплекса членистоногих-фитофагов в условиях республиканского ландшафтного заказника «Озеры» по семействам

Fig. 2. Distribution of the complex of arthropod phytophages in the conditions of the republican landscape reserve «Ozery» by families



Рис. 3. Количество видов фитофагов, трофически связанных с отдельными видами древесных растений на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры»

Fig. 3. The number of phytophages species trophically associated with individual species of woody plants on the territory of the republican landscape reserve «Ozery»

Подавляющее количество зарегистрированных членистоногих-фитофагов (18 видов из 14 родов, 9 семейств и 4 отрядов) в качестве кормового растения используют *Quercus robur*. Наибольшее число фитофагов, обнаруженных на дубе черешчатом, относятся к отрядам Hymenoptera и Lepidoptera (8 и 6 видов соответственно). Уровень вредоносности фитофагов – вредителей *Q. robur* на обследованных участках варьирует от низкого (1 балл) до крайне высокого (4 балла). Крайне высокой вредоносностью (4 балла) при высокой встречаемости (3 балла) отличаются орехотворки *Neuroterus numismalis* и *N. quercusbaccarum*. Особенность вызываемых ими повреждений кормового растения проявляется в том, что практически вся нижняя сторона заселенных листовых пластинок оказывается усыпана галлами.

На *Populus tremula* отмечены 10 видов фитофагов – 1 вид клещей (*Aceria varia*), 3 вида листоедов (*Chrysomela lapponica*, *Ch. populi* и *Plagioderma versicolora*), 3 вида галлиц (*Contarinia petioli*, *Harmandiola globuli* и *H. tremulae*) и 3 вида молей-пестрянок (*Phyllocnistis unipunctella*, *Ph. xenia* и *Phyllonorycter sagitella*). У большинства насекомых, обнаруженных на осине, уровень вредоносности оценивается как средний (2 балла). Высокой вредоносностью (3 балла) отличаются 2 вида листоедов (*Ch. lapponica*, *P. versicolora*) и 1 вид галлиц (*C. petioli*).

На *Betula pendula* и *Tilia cordata* отмечены 8 и 6 видов фитофагов соответственно, на *Acer platanoides* и растениях рода *Salix* выявлено по 5 видов фитофагов, на остальных 18 таксонах обследованных древесно-кустарниковых растений обнаружено от 1 до 3 видов фитофагов.

Исходя из широты трофической специализации, на обследованных пробных площадях преобладают монофаги, которые насчитывают 62 вида (73 % от их общего числа). К олигофагам принадлежат 16 видов (*Attelabus nitens*, *Caliroa cinxia*, *Caloptilia alchimiella*, *Cameraria ohridella*, *Chrysomela populi*, *Eriophyes pyri*, *Fenusa pumila*, *Heterarthrus flavicollis*, *Parornix scoticella*, *Phratora vitellinae*, *Phyllonorycter issikii*, *Ph. oxyacanthae*, *Ph. pastorella*, *Plagioderma versicolora*, *Profenusa pygmaea*, *Tischeria ekebladella*).

Полифаги представлены 7 видами (*Apoderus coryli*, *Chrysomela lapponica*, *Dasineura rosaria*, *Incurvaria pectinea*, *Leucoptera malifoliella*, *Lyonetia clerkella*, *Prionus coriarius*). Данные виды способны повреждать широкий спектр кормовых растений из разных ботанических семейств.

Помимо трофической специализации, учитывались особенности образа жизни фитофага на кормовом растении. Установлено, что 94 % от общего числа собранных видов принадлежат к филлобионтным формам. Отмечено всего 5 меристемофильных видов. Так, вид *Adelges tardus* инициирует образование овально-шишковидных желтоватых галлов на вершинах побегов ели обыкновенной, вид *Andricus foecundatrix* формирует шишковидные галлы на побегах дуба черешчатого, вид *Contarinia petioli* – округлые галлы на черешках листовых пластинок тополя дрожащего, а вид *Retinia resinella* – галлы в виде смоляных наплывов на вершинах побегов сосны обыкновенной. Личинки вида *Stenolechia gemmella* вызывают увядание побегов дуба черешчатого, а позднее их усыхание.

Установленные на территории заказника виды фитофагов составляют 2 группы по образу жизни – открытоживущие и скрытоживущие формы. Среди скрытоживущих форм наибольшим числом видов представлены минеры (35 видов). Галлообразование характерно для 27 видов. Вызываемые ими тераты, как правило, хорошо заметны стороннему наблюдателю [12], представлены одно- или многокамерными, закрытыми либо открытыми галлами на различных частях кормовых растений, потеря декоративности чаще всего не может быть компенсирована растением в текущем вегетационном сезоне. Помимо этого, 4 вида клещей образуют эринеумы (войлочки), а 5 видов насекомых инициируют сворачивание листовых пластинок в пакеты.

Такие виды, как *Blennocampa phyllocolpa*, *Macrodiplosis dryobia* и *Phyllocolpa oblita*, формируют загиб края листовой пластинки, внутри которого развиваются личинки, поэтому также могут быть отнесены к скрытоживущим формам.

Открытоживущие формы насчитывают 11 видов из семейств тлей, листоедов и пилильщиков. Имаго и личинки открыто обитают на кормовом растении колониями (некоторые виды тлей) либо небольшими группами (листоеды и пилильщики), выгрызая отверстия, высасывая или объедая мягкие ткани листа. На обследованных участках республиканского ландшафтного заказника «Озеры» установлено обитание 17 видов сосущих фитофагов (20 % от общего числа выявленных видов).

Одной из задач предпринятых исследований было выявление инвазивных видов членистоногих-фитофагов на ООПТ, в частности на пробных площадях республиканского ландшафтного заказника «Озеры». Всего обнаружено 11 видов фитофагов-инвайдеров из 5 отрядов и 5 семейств (табл. 1).

Среди инвазивных видов членистоногих-фитофагов преобладают представители семейств Gracillariidae и Aphididae (36 и 27 % от их общего числа соответственно).

Кормовыми растениями для инвазивных фитофагов являются 6 таксонов древесно-кустарниковых растений, относящихся к 6 родам, 6 семействам и 5 порядкам. Наибольшее количество инвазивных фитофагов обнаружено на робинии обыкновенной. В их составе представлены 2 вида молей-пестрянок, 1 вид галлиц и 1 вид пилильщиков. На одном и том же растении отмечаются как верхнесторонние мины (*Parectopa robiniella*), так и нижнесторонние пленчатые мины (*Macrosaccus robiniella*), что значительно снижает его декоративность.

Согласно литературным данным [12] на робинии возможно обнаружение инвазивных видов тлей, это обуславливает необходимость мониторинга состояния древесно-кустарниковых растений, особенно на ООПТ.

Среди обнаруженных инвайдеров 5 видов являются сосущими фитофагами (к ним относятся 3 вида тлей (семейство Aphididae) и 2 вида клещей (семейство Eriophyidae)), что составляет 45 % от числа инвазивных видов членистоногих-фитофагов, установленных для территории заказника.

Таблица 1

**Таксономический состав инвазивных членистоногих-фитофагов
на пробных площадях республиканского ландшафтного заказника «Озеры»**

Table 1

**Taxonomic composition of invasive arthropod phytophages
in the sample plots of the republican landscape reserve «Ozery»**

Надсемейство	Семейство	Виды
Eriophyoidea	Eriophyidae	<i>Aceria cephalonea</i> (кленовый галловый клещ)
		<i>A. erinea</i> (ореховый войлочный клещ)
Aphidoidea	Aphididae	<i>Cryptomyzus ribis</i> (красногалловая смородинная тля)
		<i>Drepanosiphum platanoidis</i> (большая яворовая тля)
		<i>Panaphis juglandis</i> (пестрая ореховая тля)
Gracillarioidea	Gracillariidae	<i>Cameraria ohridella</i> (каштановая минирующая моль)
		<i>Parectopa robiniella</i> (белоакациевая верхнесторонняя минирующая моль)
		<i>Phyllonorycter issikii</i> (липовая моль-пестрянка)
		<i>Macrosaccus robiniella</i> (белоакациевая нижнесторонняя моль-пестрянка)
Sciaroidea	Cecidomyiidae	<i>Obolodiplosis robiniae</i> (белоакациевая листовая галлица)
Tenthredinoidea	Tenthredinidae	<i>Nematus tibialis</i> (голенастый пилильщик)

Также была проанализирована встречаемость видов на обследованных пробных площадях (табл. 2). На всех 4 пробных площадях, заложенных на территории заказника, отмечен только 1 вид – олигофаг *Profenusa pygmaea* из семейства Tenthredinidae, инициирующий образование больших беловатых пятен на верхней стороне листовых пластинок дуба черешчатого. На 3 пробных площадях встречаются 6 видов (*Apoderus coryli*, *Neuroterus numismalis*, *Orchestes quercus*, *Phyllonorycter issikii*, *Ph. roboris*, *Tischeria ekebladella*), на 2 пробных площадях – 32 вида, на 1 пробной площади – 46 видов.

Таблица 2

**Встречаемость членистоногих-фитофагов на пробных площадях
республиканского ландшафтного заказника «Озеры»**

Table 2

**Occurrence of arthropod phytophages in the sample plots
of the republican landscape reserve «Ozery»**

Встречаемость	Перечень видов
Виды, отмеченные на 4 пробных площадях	<i>Profenusa pygmaea</i>
Виды, отмеченные на 3 пробных площадях	<i>Apoderus coryli</i> , <i>Neuroterus numismalis</i> , <i>Orchestes quercus</i> , <i>Phyllonorycter issikii</i> , <i>Ph. roboris</i> , <i>Tischeria ekebladella</i>
Виды, отмеченные на 2 пробных площадях	<i>Acrocercops brongniardella</i> , <i>Adelges tardus</i> , <i>Agelastica alni</i> , <i>Andricus foecundatrix</i> , <i>Callisto denticulella</i> , <i>Caloptilia alchimiella</i> , <i>C. hemidactylella</i> , <i>Cameraria ohridella</i> , <i>Chrysomela lapponica</i> , <i>Contarinia petioli</i> , <i>Cynips longiventris</i> , <i>Eriophyes tiliae</i> , <i>Harmandiola globuli</i> , <i>H. tremulae</i> , <i>Incurvaria pectinea</i> , <i>Lasioptera rubi</i> , <i>Macrodiplosis dryobia</i> , <i>Macrosaccus robiniella</i> , <i>Neuroterus anthracinus</i> , <i>N. quercusbaccarum</i> , <i>Obolodiplosis robiniae</i> , <i>Parectopa robiniella</i> , <i>Parornix scoticella</i> , <i>Phyllocolpa oblita</i> , <i>Phyllonorycter joannisi</i> , <i>Ph. nicellii</i> , <i>Ph. sagitella</i> , <i>Ph. ulmifoliella</i> , <i>Plagiodera versicolora</i> , <i>Pontania pedunculi</i> , <i>Stenolechia gemmella</i> , <i>Stigmella aceris</i>

Встречаемость	Перечень видов
Виды, отмеченные на 1 пробной площади	<i>Aceria cephalonea</i> , <i>A. erinea</i> , <i>A. platanoidea</i> , <i>A. varia</i> , <i>Aculus craspedobius</i> , <i>A. tetanothrix</i> , <i>Agromyza alnibetulae</i> , <i>Andricus curvator</i> , <i>Attelabus nitens</i> , <i>Blennocampa phyllocolpa</i> , <i>Byctiscus betulae</i> , <i>Caliroa cinxia</i> , <i>Chrysomela populi</i> , <i>Cryptomyzus ribis</i> , <i>Dasineura rosaria</i> , <i>D. tiliae</i> , <i>Deporaus betulae</i> , <i>Didymomyia tiliacea</i> , <i>Drepanosiphum platanoidis</i> , <i>Eriophyes laevis</i> , <i>E. leiosoma</i> , <i>E. pyri</i> , <i>Fenusa pumila</i> , <i>Heterarthrus flavicollis</i> , <i>H. nemoratus</i> , <i>Iteomyia capreae</i> , <i>Leucoptera malifoliella</i> , <i>Lyonetia clerkella</i> , <i>Nematus tibialis</i> , <i>Panaphis juglandis</i> , <i>Parna apicalis</i> , <i>Phratora vitellinae</i> , <i>Phyllocnistis saligna</i> , <i>Ph. unipunctella</i> , <i>Ph. xenia</i> , <i>Phyllocoptes goniothorax</i> , <i>Ph. populi</i> , <i>Phyllonorycter oxyacanthae</i> , <i>Ph. pastorella</i> , <i>Ph. quercifoliella</i> , <i>Ph. rajella</i> , <i>Prionus coriarius</i> , <i>Retinia resinella</i> , <i>Stigmella nylandriella</i> , <i>S. roborella</i> , <i>Trichoermes walkeri</i>

Анализ распределения видов фитофагов по обследованным участкам республиканского ландшафтного заказника «Озеры» показал, что наибольшее количество видов (47) обнаружено на пробной площади О4 (сосновый лес за д. Рыбницей) (табл. 3).

Таблица 3

Распределение членистоногих-фитофагов по пробным площадям республиканского ландшафтного заказника «Озеры»

Table 3

Distribution of arthropod phytophages in the sample plots of the republican landscape reserve «Ozery»

Пробная площадь	Перечень видов
О1	<i>Andricus curvator</i> , <i>Apoderus coryli</i> , <i>Contarinia petioli</i> , <i>Eriophyes laevis</i> , <i>E. tiliae</i> , <i>Incurvaria pectinea</i> , <i>Lasioptera rubi</i> , <i>Orchestes quercus</i> , <i>Phyllonorycter issikii</i> , <i>Ph. rajella</i> , <i>Ph. ulmifoliella</i> , <i>Plagioderia versicolora</i> , <i>Profenusa pygmaea</i> , <i>Stenolechia gemmella</i>
О2	<i>Aceria cephalonea</i> , <i>A. erinea</i> , <i>Acrocercops brongniardella</i> , <i>Aculus tetanothrix</i> , <i>Adelges tardus</i> , <i>Andricus foecundatrix</i> , <i>Apoderus coryli</i> , <i>Attelabus nitens</i> , <i>Caliroa cinxia</i> , <i>Callisto denticulella</i> , <i>Cameraria ohridella</i> , <i>Chrysomela lapponica</i> , <i>Cryptomyzus ribis</i> , <i>Cynips longiventris</i> , <i>Drepanosiphum platanoidis</i> , <i>Harmandiola globuli</i> , <i>H. tremulae</i> , <i>Heterarthrus flavicollis</i> , <i>Macrodiplosis dryobia</i> , <i>Macrosaccus robiniella</i> , <i>Nematus tibialis</i> , <i>Neuroterus numismalis</i> , <i>Obolodiplosis robiniae</i> , <i>Orchestes quercus</i> , <i>Parectopa robiniella</i> , <i>Phyllocnistis xenia</i> , <i>Phyllocolpa oblita</i> , <i>Phyllonorycter joannisi</i> , <i>Ph. nicellii</i> , <i>Ph. roboris</i> , <i>Pontania pedunculi</i> , <i>Profenusa pygmaea</i> , <i>Retinia resinella</i> , <i>Stenolechia gemmella</i> , <i>Stigmella aceris</i> , <i>Tischeria ekebladella</i>
О3	<i>Acrocercops brongniardella</i> , <i>Aculus craspedobius</i> , <i>Agelastica alni</i> , <i>Agromyza alnibetulae</i> , <i>Apoderus coryli</i> , <i>Callisto denticulella</i> , <i>Caloptilia alchimiella</i> , <i>C. hemidactylella</i> , <i>Cameraria ohridella</i> , <i>Cynips longiventris</i> , <i>Dasineura rosaria</i> , <i>D. tiliae</i> , <i>Didymomyia tiliacea</i> , <i>Eriophyes leiosoma</i> , <i>E. pyri</i> , <i>Fenusa pumila</i> , <i>Harmandiola tremulae</i> , <i>Neuroterus anthracinus</i> , <i>N. numismalis</i> , <i>N. quercusbaccarum</i> , <i>Orchestes quercus</i> , <i>Parornix scoticella</i> , <i>Phyllocnistis saligna</i> , <i>Phyllocoptes populi</i> , <i>Phyllonorycter issikii</i> , <i>Ph. joannisi</i> , <i>Ph. pastorella</i> , <i>Ph. quercifoliella</i> , <i>Ph. roboris</i> , <i>Ph. sagitella</i> , <i>Ph. ulmifoliella</i> , <i>Plagioderia versicolora</i> , <i>Profenusa pygmaea</i> , <i>Tischeria ekebladella</i> , <i>Trichoermes walkeri</i>
О4	<i>Aceria platanoidea</i> , <i>A. varia</i> , <i>Adelges tardus</i> , <i>Agelastica alni</i> , <i>Andricus foecundatrix</i> , <i>Blennocampa phyllocolpa</i> , <i>Byctiscus betulae</i> , <i>Caloptilia alchimiella</i> , <i>C. hemidactylella</i> , <i>Chrysomela lapponica</i> , <i>Ch. populi</i> , <i>Contarinia petioli</i> , <i>Deporaus betulae</i> , <i>Eriophyes tiliae</i> , <i>Harmandiola globuli</i> , <i>Heterarthrus nemoratus</i> , <i>Incurvaria pectinea</i> , <i>Iteomyia capreae</i> , <i>Lasioptera rubi</i> , <i>Leucoptera malifoliella</i> , <i>Lyonetia clerkella</i> , <i>Macrodiplosis dryobia</i> , <i>Macrosaccus robiniella</i> , <i>Neuroterus anthracinus</i> , <i>N. numismalis</i> , <i>N. quercusbaccarum</i> , <i>Obolodiplosis robiniae</i> , <i>Panaphis juglandis</i> , <i>Parectopa robiniella</i> , <i>Parna apicalis</i> , <i>Parornix scoticella</i> , <i>Phratora vitellinae</i> , <i>Phyllocnistis unipunctella</i> , <i>Phyllocolpa oblita</i> , <i>Phyllocoptes goniothorax</i> , <i>Phyllonorycter issikii</i> , <i>Ph. nicellii</i> , <i>Ph. oxyacanthae</i> , <i>Ph. roboris</i> , <i>Ph. sagitella</i> , <i>Pontania pedunculi</i> , <i>Prionus coriarius</i> , <i>Profenusa pygmaea</i> , <i>Stigmella aceris</i> , <i>S. nylandriella</i> , <i>S. roborella</i> , <i>Tischeria ekebladella</i>

На пробных площадях О2 (окрестности д. п. Подбелое) и О3 (окрестности аг. Озеры) отмечены 36 и 35 видов членистоногих-фитофагов соответственно. Наименьшее количество видов (14) обнаружено на пробной площади О1 (окрестности туристической базы «Химик»).

Из 14 видов, зарегистрированных на пробной площади О1, 3 вида фитофагов найдены только в этой местности. Среди 36 видов, отмеченных на пробной площади О2, уникальными оказались 11 видов фитофагов. На пробной площади О3 обнаружены 13 видов, встречающихся только в данной местности, а на пробной площади О4 таковыми являются 19 видов членистоногих-фитофагов.

На основе расчета индекса сходства Чекановского – Сёренсена построена дендрограмма сходства сообществ фитофагов на пробных площадях республиканского ландшафтного заказника «Озеры» (рис. 4). Наибольшее сходство наблюдается между сообществами фитофагов пробных площадей О2 и О4, что объясняется однотипным набором пород древесно-кустарниковых растений вокруг поселений сходного генезиса и размера.

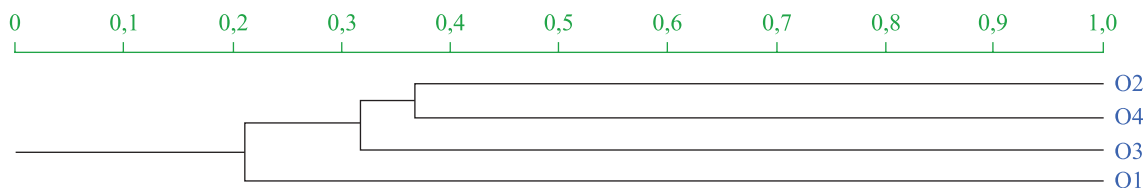


Рис. 4. Дендрограмма сходства сообществ фитофагов по видовому составу (индекс Чекановского – Сёренсена) на исследованных пробных площадях республиканского ландшафтного заказника «Озеры»

Fig. 4. Dendrogram of the similarity of phytophages communities in terms of species composition (Czekanowski – Sørensen index) in the studied sample plots of the republican landscape reserve «Ozery»

Наименьшее сходство отмечено с сообществом фитофагов, обитающих на пробной площади О1, где обнаружено и минимальное количество видов фитофагов.

Заключение

Комплекс членистоногих-фитофагов, повреждающих древесно-кустарниковые растения на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры», представлен 85 видами из 54 родов и 19 семейств. Среди них преобладают представители отряда Lepidoptera (29 видов, или 34 % от их общего числа) и семейства Gracillariidae (21 вид, или 25 %). Установленные виды членистоногих-фитофагов обитают на 24 таксонах древесно-кустарниковых растений (18 видов в качестве кормового растения используют дуб черешчатый, 10 видов – осину, 57 видов – остальные 22 таксона древесно-кустарниковых растений). Крайне высокой вредоносностью при высокой встречаемости характеризуются орехотворки *Neuroterus numismalis* и *N. quercusbaccarum*. Высокой вредоносностью отличаются листоеды *Chrysomela lapponica*, *Plagioderma versicolora* и галлица *Contarinia petioli*. Большинство зарегистрированных видов являются монофагами и относятся к филлобионтным, скрытоживущим формам. Вид *Profenusa pygmaea* из семейства Tenthredinidae, образующий мины на верхней стороне листовых пластинок дуба черешчатого, является наиболее распространенным видом на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры». На обследованных пробных площадях заказника установлено обитание 11 видов фитофагов-инвайдеров из 5 отрядов и 5 семейств, из них 4 вида связаны с робинией обыкновенной.

Библиографические ссылки

1. Голуб ВБ, Цуриков МН, Прокин АА. *Коллекции насекомых: сбор, обработка и хранение материала*. Москва: Товарищество научных изданий КМК; 2012. 339 с.
2. Бридсон Д, Форман Л, редакторы. *Гербарное дело = The herbarium handbook*. Еремеева ЕЮ, Гельтман ДВ, Соколова ИВ, переводчики; Гельтман ДВ, редактор. Кью: Королевский ботанический сад; 1995. XVI, 341 с.
3. Рупайс АА. *Определитель вредителей декоративных и плодовых деревьев и кустарников по повреждениям*. Рига: Зинатне; 1976. 323 с.
4. Гусев ВИ. *Определитель повреждений лесных, декоративных и плодовых деревьев и кустарников*. Москва: Лесная промышленность; 1984. 472 с.
5. Гусев ВИ, Римский-Корсаков МН. *Определитель повреждений лесных и декоративных деревьев и кустарников европейской части СССР*. 3-е издание. Гусев ВИ, редактор. Москва: Гослесбумиздат; 1951. 580 с.
6. Гусев ВИ. *Определитель повреждений плодовых деревьев и кустарников*. Москва: Агропромиздат; 1990. 239 с.

7. Гусев ВИ. *Определитель поврежденных деревьев и кустарников, применяемых в зеленом строительстве*. Москва: Агропромиздат; 1989. 208 с.
8. Хотько ЭИ, Панкевич ТП, Молчанова РВ, Ярчаковская СИ. *Справочник вредителей плодовых и ягодных культур*. Минск: Беларуская энцыклапедыя; 2005. 260 с.
9. Горленко СВ, Панько НА. *Формирование микофлоры и энтомофауны городских зеленых насаждений*. Дорожкин НА, редактор. Минск: Наука и техника; 1972. 167 с.
10. Рыжая АВ, Гляковская ЕИ. Членистоногие-фитофаги на территории республиканского ландшафтного заказника «Озерь» (Беларусь). В: Прищепчик ОВ, Маковецкая ЕВ, Буга СВ, Волкова ТВ, Дерунков АВ, Кулак АВ и др., редакторы. *Итоги и перспективы развития энтомологии в Восточной Европе. Сборник статей IV Международной научно-практической конференции, посвященной памяти Александра Михайловича Терешкина (1953–2020); 1–3 декабря 2021 г.; Минск, Беларусь*. Минск: А. Н. Вараксин; 2021. с. 316–322.
11. Hliakouskaya EI, Rhyzhaya AV. Invasive species of arthropod phytophages in Grodno Neman river region urbocoenoses (Belarus). In: Dgebuadze YuYu, Krylov AV, Perosyan VG, Karabanov DP, editors. *Invasion of alien species in Holarctic. Borok-VI. Book of abstracts of the Sixth International symposium; 2021 October 11–15; Borok – Uglich, Russia*. Kazan: Buk; 2021. p. 89.
12. Семенченко ВП, Буга СВ, Алехнович АВ, Барышникова СВ, Бойко СВ, Бородин ОИ и др. *Черная книга инвазивных видов животных Беларуси*. Семенченко ВП, Буга СВ, редакторы. Минск: Беларуская навука; 2020. 163 с.

References

1. Golub VB, Tsurikov MN, Prokin AA. *Kolleksii nasekomykh: sbor, obrabotka i khranenie materiala* [Collections of insects: collection, processing and storage of material]. Moscow: Scientific Press KMK; 2012. 339 p. Russian.
2. Bridson D, Forman L, editors. *The herbarium handbook*. Eremeeva HYu, Geltman DV, Sokolova IV, translators; Geltman DV, editor. Kew: Royal Botanic Gardens; 1995. XVI, 341 p. Russian.
3. Rupais AA. *Opredelitel' vreditel'ev dekorativnykh i plodovykh derev'ev i kustarnikov po povrezhdeniyam* [Key to pests of ornamental and fruit trees and shrubs by damage]. Riga: Zinatne; 1976. 323 p. Russian.
4. Gusev VI. *Opredelitel' povrezhdenii lesnykh, dekorativnykh i plodovykh derev'ev i kustarnikov* [Determinant of damage to forest, ornamental and fruit trees and shrubs]. Moscow: Lesnaya promyshlennost'; 1984. 472 p. Russian.
5. Gusev VI, Rimskii-Korsakov MN. *Opredelitel' povrezhdenii lesnykh i dekorativnykh derev'ev i kustarnikov evropeiskoi chasti SSSR* [Determinant of damage to forest and ornamental trees and shrubs of the European part of the USSR]. 3rd edition. Gusev VI, editor. Moscow: Goslesbumizdat; 1951. 580 p. Russian.
6. Gusev VI. *Opredelitel' povrezhdenii plodovykh derev'ev i kustarnikov* [Determinant of damage to fruit trees and shrubs]. Moscow: Agropromizdat; 1990. 239 p. Russian.
7. Gusev VI. *Opredelitel' povrezhdenii derev'ev i kustarnikov, primenyaemykh v zelenom stroitel'stve* [Determinant of damage to trees and shrubs used in green building]. Moscow: Agropromizdat; 1989. 208 p. Russian.
8. Khot'ko EI, Pankevich TP, Molchanova RV, Yarchakovskaya SI. *Spravochnik vreditel'ev plodovykh i yagodnykh kul'tur* [Directory of pests of fruit and berry crops]. Минск: Belaruskaja jencyklapedyja; 2005. 260 p. Russian.
9. Gorlenko SV, Pan'ko NA. *Formirovanie mikoflory i entomofauny gorodskikh zelenykh nasazhdenii* [Formation of mycoflora and entomofauna of urban green spaces]. Dorozhkin NA, editor. Минск: Nauka i tekhnika; 1972. 167 p. Russian.
10. Rhyzhaya AV, Hliakouskaya KI. [Arthropod phytophages on the territory of the republican landscape reserve «Ozery» (Belarus)]. In: Prishchepchik OV, Makovetskaya EV, Buga SV, Volkova TV, Derunkov AV, Kulak AV, et al., editors. *Itogi i perspektivy razvitiya entomologii v Vostochnoi Evrope. Sbornik statei IV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi pamyati Aleksandra Mikhailovicha Tereshkina (1953–2020); 1–3 dekabrya 2021 g.; Minsk, Belarus'* [Results and prospects for the development of entomology in Eastern Europe. Collection of articles of the 4th International scientific and practical conference dedicated to the memory of Alexander Mikhailovich Tereshkin (1953–2020); 2021 December 1–3; Minsk, Belarus]. Минск: А. Н. Вараксин; 2021. p. 316–322. Russian.
11. Hliakouskaya EI, Rhyzhaya AV. Invasive species of arthropod phytophages in Grodno Neman river region urbocoenoses (Belarus). In: Dgebuadze YuYu, Krylov AV, Perosyan VG, Karabanov DP, editors. *Invasion of alien species in Holarctic. Borok-VI. Book of abstracts of the Sixth International symposium; 2021 October 11–15; Borok – Uglich, Russia*. Kazan: Buk; 2021. p. 89.
12. Semenchenko VP, Buga SV, Alekhovich AV, Baryshnikova SV, Boiko SV, Borodin OI, et al. *Chernaya kniga invazivnykh vidov zivotnykh Belarusi* [Black book of invasive animal species of Belarus]. Semenchenko VP, Buga SV, editors. Минск: Belaruskaja navuka; 2020. 163 p. Russian.

УДК 595.7+615.36

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАСЕКОМЫХ ПРОТИВ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Х. БОЗДОГАН¹⁾, Х. А. КУЭЛЛАР-КАРДОЗО²⁾

¹⁾Кыршехирский университет им. Ахи Эврана,
ул. Терме, 100, 40100, г. Кыршехир, Турция

²⁾Университет Ла Саль, ул. 2, 10-70, Богота, Колумбия

Кратко анализируются литературные данные, посвященные использованию насекомых из отрядов Hymenoptera (перепончатокрылые), Coleoptera (жесткокрылые), Diptera (двукрылые), Lepidoptera (чешуекрылые), Orthoptera (прямокрылые) и Blattodea (таракановые) в онкологических исследованиях.

Ключевые слова: насекомые; злокачественная опухоль; энтомотерапия; болезнь; онкология.

USING INSECTS AGAINST CANCER

H. BOZDOĞAN^a, J. A. CUÉLLAR-CARDOZO^b

^aKırşehir Ahi Evran University, Terme Caddesi, No. 100, Kırşehir 40100, Turkey

^bLa Salle University, Carrera 2, No. 10-70, Bogotá, Colombia

Corresponding author: H. Bozdoğan (hakan.bozdogan@ahievran.edu.tr)

In this work, the usage areas of some insect orders such as Hymenoptera, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Orthoptera and Blattodea in oncological studies are discussed with some parameters.

Keywords: insects; cancer; entomotherapy; disease; oncology.

Образец цитирования:

Боздоган Х, Куэллер-Кардозо ХА. Использование насекомых против злокачественных опухолей. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:91–94 (на англ.).
EDN: СКВАЈА

For citation:

Bozdoğan H, Cuéllar-Cardozo JA. Using insects against cancer. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:91–94.
EDN: СКВАЈА

Авторы:

Хакан Боздоган – доктор наук (энтомология); доцент кафедры растениеводства и животноводства профессиональной школы технических наук.

Хосе Алехандро Куэллер-Кардозо – магистр водных ресурсов исследовательской группы биоразведки и биоразнообразия Колумбии отдела фундаментальных наук.

Authors:

Hakan Bozdoğan, doctor of science (entomology); associate professor at the department of plant and animal production, vocational school of technical sciences.

hakan.bozdogan@ahievran.edu.tr

<https://orcid.org/0000-0002-6836-4383>

José Alejandro Cuéllar-Cardozo, master in water resources at the research group of bioprospection and biodiversity of Colombia, department of basic sciences.

josecuellar1094@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5831-6038>

Introduction

Cancer is actually a set of diseases related to an uncontrolled process in cell division where excessive and uncoordinated growth occurs, which can cause damage to the patient and even death [1; 2]. Currently, cancer is the main cause of death from disease worldwide [3], due to factors such as the complexity in the detection and treatment of those affected, which added to the fact of acquired resistance to drugs, make this condition a global public health problem [3; 4]. Therefore, the research and development of new technologies for the management of the disease is a priority issue on the agenda of many countries [3; 5].

Historical role of insects in oncological studies

In many cultures, especially in South and East Asia, insects have represented an important component of the diet and ancestral medicine of various peoples, so it was not unreasonable to think of their application in the treatment of diseases, including cancer [5; 6]. Initially, these investigations were focused on the consumption of insects in the diet, their nutritional contribution and their relationship with changes in the development of certain types of cancer, mainly limited to tissues related to the digestive system [6–8]. In this way, as new medicinal properties of insects are discovered, more and better research is being presented that highlights the use of chemical components of entomological origin in the detection and treatment of multiple types of cancer, in a process called entomotherapy [5; 6; 9; 10].

Current assessments in the application of insects in cancer

Currently, research linking insects to cancer can be divided into two main areas: tumor detection studies and symptom treatment analyses with entomochemical agents. Research in the first area, among which the work [11], highlights the use of insects as detectors of tumor activity in tissues from volatile organic components. A case of the above occurs with the use of ants and fruit flies, insects that have developed olfactory sensors allowing them to detect chemical compounds and those originating from cancerous activity, even with greater efficiency and faster training compared to the use of trained dogs for cancer detection [11–13]. At present, the use of insects as detectors is in the preliminary stages, so it is expected that more research will be focused on this topic in the coming years.

Research in the second area regarding the use of insects in tumor treatments are based on the fact that insects are organisms that evolved a variety of complex bioactive compounds that have been applied in drug design [10]. Multiple investigations have taken advantage of the antiproliferative, antiangiogenic and cytotoxic effects of some of these compounds as ways of fighting cancer, where several promising cases can be listed with taxonomic groups such as Hymenoptera (ants, wasps and bees), Coleoptera (beetles), Diptera (flies), Lepidoptera (butterflies and moths), Orthoptera (grasshoppers) and Blattodea (cockroaches) [4–6; 10; 14].

In the particular case of the order Hymenoptera, several investigations have been recorded in various families, such as the Formicidae, primarily the species *Solenopsis invicta* and *S. geminata*, which have cataloged the production of an alkaloid with the ability to inhibit pathological angiogenesis and thus, stop tumor growth [10; 15]. In the same hand, chemical compounds found in the genus *Tetraponera* have been used as cytotoxics in breast and colon cancer treatments [16]. On the other hand, the venom of various species of bees (known as apitoxin) has been used as an inducer of apoptosis in tumors from mammary gland, skin, bone marrow and kidney tissues [17–20]. Lastly, the group of wasps has been the least studied, since only the use of extracts of the species *Polistes mandarinus* as a cytotoxic in the control of cervical cancer has been recorded [21].

In the case of the order Coleoptera, multiple species have been described, among them *Epicauta hirticornis*, *Mylabris variabilis*, *Ulomoides dermestoides* and *Allomyrina dichotoma* stand out, from which compounds with activity as tumor growth inhibitors and promoters of cell apoptosis in mammary gland, stomach, lung, liver, prostate, cervix, ovary and colon tissues have been extracted [22–26]. In the case of the order Diptera, studies have been focused on two species, *Musca domestica* and *Sarcophaga argyrostoma*, where it has been observed that hemolymph and adipose cells from the larvae have a retarding and cytotoxic effect on tumor growth [5; 27].

Regarding other insect orders, studies have been more focused on a particular species. In the order Lepidoptera, the species *Byasa polyeuctes* has been described to present papilistatin, which is a carcinogenic growth-inhibiting compound in medical cases of leukemia [28]. On the other hand, in the order Orthoptera, the use of *Gryllus bimaculatus* extract has been described as a cytotoxic and inducer of apoptosis in cancer cells in the lungs [6]. Finally, the order Blattodea has presented a particular case where a single species, *Eupolyphaga sinensis*, whose adults produce a series of alkaloids and acetyldopamine dimers, has an inhibitory effect on the growth of tumors of more than 15 different types of cancer between which highlights lung, liver, colon, prostate, ovary, glioma, melanoma and mammary gland [26; 29; 30].

Conclusions

While the fight against cancer cells continues at full speed from many branches today, new alternatives are being developed with living groups, including insects, in order to try the untested. When the physiological and biochemical contents of insects, which symbolise an extremely crowded living group, are considered more comprehensively, specially defined proteins, immune system components and specially defined defense cells that can play an active role in the fight against cancer cells will be developed and shed light on possible new fighting methods.

Considering the existence of undiscovered insect species as well as the number of known insect species, these six-legged creatures increase the possibility of being hopeful on the way to the fight against the cancer of (created by) neoplastic cells. Although the limited outputs at hand do not yield satisfactory results for now, long-term studies are needed to explore the insect – cancer interaction.

References

1. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(11):767–775. DOI: 10.1038/nrc3368.
2. Wronski SL. Defining cancer survivor and cancer survivorship: the who, what, and when. *Psicooncologia*. 2015;12(1):7–18. DOI: 10.5209/rev_PSIC.2015.v12.n1.48900.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics – 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
4. Tonk M, Vilcinskas A, Rahnamaeian M. Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(17):7397–7405. DOI: 10.1007/s00253-016-7718-y.
5. Mahmoud S, El-Khashab LA, Moselhy W, Zayed A, Salama M. *In vitro* anti-cancer activity of larval hemolymph and fat body of flesh fly *Sarcophaga argyrostoma* (Diptera: Sarcophagidae). *Advances in Entomology*. 2020;8(2):93–105. DOI: 10.4236/ae.2020.82007.
6. Lim Hyun Jung, Byun Eui-Hong. Evaluation of anti-cancer activity of *Gryllus bimaculatus* water extract on non-small cancer lung cell via apoptosis. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2021;26(4):453–458. DOI: 10.3746/pnf.2021.26.4.453.
7. Govorushko S. Global status of insects as food and feed source: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2019;91:436–445. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.07.032.
8. Stull VJ. Impacts of insect consumption on human health. *Journal of Insects as Food and Feed*. 2021;7(5):695–713. DOI: 10.3920/JIFF2020.0115.
9. Dossey AT. Insects and their chemical weaponry: new potential for drug discovery. *Natural Product Reports*. 2010;27(12):1737–1757. DOI: 10.1039/c005319h.
10. Noble K, Rohaj A, Abegglen LM, Schiffman JD. Cancer therapeutics inspired by defense mechanisms in the animal kingdom. *Evolutionary Applications*. 2020;13(7):1681–1700. DOI: 10.1111/eva.12963.
11. Piqueret B, Bourachot B, Leroy C, Devienne P, Mehta-Grigoriou F, d’Ettorre P, et al. Ants detect cancer cells through volatile organic compounds. *iScience*. 2022;25(3):103959. DOI: 10.1016/j.isci.2022.103959.
12. Piqueret B, Sandoz J-C, d’Ettorre P. Ants learn fast and do not forget: associative olfactory learning, memory and extinction in *Formica fusca*. *Royal Society Open Science*. 2019;6(6):190778. DOI: 10.1098/rsos.190778.
13. Strauch M, Lüdke A, Münch D, Laudes T, Galizia CG, Martinelli E, et al. More than apples and oranges – detecting cancer with a fruit fly’s antenna. *Scientific Reports*. 2014;4:3576. DOI: 10.1038/srep03576.
14. Seabrooks L, Hu L. Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2017;7(4):409–426. DOI: 10.1016/j.apsb.2017.05.001.
15. Arbiser JL, Kau T, Konar M, Narra K, Ramchandran R, Summers SA, et al. Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. *Blood*. 2007;109(2):560–565. DOI: 10.1182/blood-2006-06-029934.
16. Bosque I, Gonzalez-Gomez JC, Loza MI, Brea J. Natural tetraonerines: a general synthesis and antiproliferative activity. *The Journal of Organic Chemistry*. 2014;79(9):3982–3991. DOI: 10.1021/jo500446f.
17. Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Bernardo K, et al. Bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007;56(5):627–640. DOI: 10.1007/s00262-006-0220-0.
18. Moon Dong-Oh, Park Sung-Yong, Choi Yung Hyun, Kim Nam Deuk, Lee Chan, Kim Gi-Young. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. *Toxicol*. 2008;51(1):112–120. DOI: 10.1016/j.toxicol.2007.08.015.
19. Wang Chen, Chen Taoyong, Zhang Ning, Yang Mingjin, Li Bai, Lü Xiang, et al. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IκBα kinase-NFκB. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(6):3804–3813. DOI: 10.1074/jbc.M807191200.
20. Jeong Yun-Jeong, Choi Yongsoo, Shin Jae-Moon, Cho Hyun-Ji, Kang Jeong-Han, Park Kwan-Kyu, et al. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;68:218–225. DOI: 10.1016/j.fct.2014.03.022.
21. Ahn MY, Ryu KS, Lee YW, Kim YS. Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Archives of Pharmacal Research*. 2000;23(5):477–481. DOI: 10.1007/BF02976576.
22. Crespo R, Villaverde ML, Girotti JR, Güerci A, Juárez MP, de Bravo MG. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(1):204–209. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.056.

23. Kim Young Min, Ku Min Jeong, Son Young-Jin, Yun Jung-Mi, Kim Seong Hwan, Lee Sang Yeol. Anti-metastatic effect of cantharidin in A549 human lung cancer cells. *Archives of Pharmacal Research*. 2013;36(4):479–484. DOI: 10.1007/s12272-013-0044-3.

24. Verma AK, Prasad SB. Antitumor effect of blister beetles: an ethnomedicinal practice in Karbi community and its experimental evaluation against a murine malignant tumor model. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;148(3):869–879. DOI: 10.1016/j.jep.2013.05.032.

25. Lee Ji-Eun, Jo Da-Eun, Lee An-Jung, Park Hye-Kyung, Youn Kumju, Yun Eun-Young, et al. Hepatoprotective and antineoplastic properties of *Protaetia brevitarsis* larvae. *Entomological Research*. 2014;44(6):244–253. DOI: 10.1111/1748-5967.12075.

26. Zhang Yanmin, Zhan Yingzhan, Zhang Dongdong, Dai Bingling, Ma Weina, Qi Junpeng, et al. *Eupolyphaga sinensis* Walker displays inhibition on hepatocellular carcinoma through regulating cell growth and metastasis signaling. *Scientific Reports*. 2014;4:5518. DOI: 10.1038/srep05518.

27. Hou Lixia, Shi Yonghui, Zhai Pei, Le Guowei. Antibacterial activity and *in vitro* anti-tumor activity of the extract of the larvae of the housefly (*Musca domestica*). *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;111(2):227–231. DOI: 10.1016/j.jep.2006.11.015.

28. Pettit GR, Ye Q, Herald DL, Hogan F, Pettit RK. Antineoplastic agents. 573. Isolation and structure of papilistatin from the papilionid butterfly *Byasa polyeuctes termessa*. *Journal of Natural Products*. 2010;73(2):164–166. DOI: 10.1021/np9004689.

29. Jiang Hai-Long, Luo Xiao-Hong, Wang Xiao-Zheng, Yang Jun-Li, Yao Xiao-Jun, Crews P, et al. New isocoumarins and alkaloid from Chinese insect medicine, *Eupolyphaga sinensis* Walker. *Fitoterapia*. 2012;83(7):1275–1280. DOI: 10.1016/j.fitote.2012.06.005.

30. Wang Feng-Xia, Wu Ning, Wei Jian-Teng, Liu Jia, Zhao Jin, Ji Ai-Guo, et al. A novel protein from *Eupolyphaga sinensis* inhibits adhesion, migration, and invasion of human lung cancer A549 cells. *Biochemistry and Cell Biology*. 2013;91(4):244–251. DOI: 10.1139/bcb-2013-0002.

Received 27.09.2022 / revised 13.03.2023 / accepted 12.06.2023.

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

УДК 579.252.5(075.8)+575.133(075.8)

Титок М. А. Внехромосомные генетические структуры бактерий [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 03 «Микробиология», специализация 1-31 01 03 02 «Молекулярная микробиология» / М. А. Титок ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2023. 280 с. : ил. Библиогр.: с. 279–280. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/297359>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 19.05.2023, № 004719052023.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 03 «Микробиология» специализации 1-31 01 03 02 «Молекулярная микробиология». Содержание ЭУМК предполагает изучение роли внехромосомных генетических структур бактерий в горизонтальном переносе генов, механизмов, определяющих устойчивость к антибиотикам, синтез токсинов, деградацию органических соединений, образование опухолей у растений, а также особенностей функциональной организации систем, определяющих стабильное поддержание плазмид в клетках бактерий и их распространение (репликация, конъюгация, сегрегация и др.).

УДК 575.088.7(075.8)

Современные аспекты генетического анализа [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление спец. 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)» / БГУ ; сост.: А. В. Лагодич, О. В. Лагодич. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2023. 101 с. : ил. Библиогр.: с. 100–101. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/299312>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.06.2023, № 006021062023.

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)», биологического факультета Белорусского государственного университета. Содержание ЭУМК предполагает изучение принципов реализации генетической информации в биологических системах, разных подходов и методов ее анализа, демонстрацию возможностей по их применению, выявление факторов, влияющих на наследование признаков, выработку алгоритмов и рекомендаций по выбору соответствующих методов для анализа и интерпретации результатов генетических экспериментов.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- Мацкевич В. С., Демидчик В. В.* Механизм трансмембранного и дальнего транспорта никеля в высших растениях 4

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

- Доронькина А. С., Жаворонок И. П., Михальчук А. Л., Богдан В. Г.* Оценка антиноцицептивного действия амидов жирных кислот при фармакологической блокаде рецепторов PPAR α в условиях экспериментальной периферической нейропатии 30

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Шяо Чэнюе, Евтушенко А. Н.* Вирулентные свойства пектобактерий, выделенных из образцов растений на территории Беларуси 44
- Чао Юй, Корик Е. О., Лагодич А. В.* Оценка эффективности инактивации шикиматкиназы у рекомбинантных штаммов – продуцентов шикимовой кислоты *Bacillus subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA..... 52

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

- Цуриков А. Г., Голубков В. В., Белый П. Н., Болсун И. М.* Ревизия лишайников рода *Bryoria* Беларуси. II. *Bryoria implexa* s. l. 65
- Рыжая А. В., Гляковская Е. И.* Комплексы членистоногих-фитофагов на территории республиканского ландшафтного заказника «Озеры» (Гродненская область, Беларусь)..... 81

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Боздоган Х., Куэллар-Кардозо Х. А.* Использование насекомых против злокачественных опухолей..... 91
- Аннотации депонированных в БГУ работ..... 95

CONTENTS

REVIEWS

- Mackievic V. S., Demidchik V. V.* Mechanism of transmembrane and long-distance transport of nickel in higher plants 4

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

- Doronkina A. S., Zhavoronok I. P., Mikhal'chuk A. L., Bogdan V. G.* Assessment of antinociceptive actions of fatty acid amides in pharmacological blockade of PPAR α receptors in experimental peripheral neuropathy 30

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

- Shao Chengyue, Evtushenkov A. N.* Virulent properties of pectobacteria isolated from plant samples on the territory of Belarus 44
- Chao Yu, Korik E. O., Lahodzich A. V.* Evaluation of the efficiency of shikimate kinase inactivation in recombinational strains – producers of shikimic acid *Bacillus subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA..... 52

BIODIVERSITY

- Tsurykau A. H., Golubkov V. V., Bely P. N., Bolsun I. M.* Revision of the lichen genus *Bryoria* in Belarus. II. *Bryoria implexa* s. l..... 65
- Rhyzhaya A. V., Hliakouskaya K. I.* Arthropod phytophages complexes on the territory of the republican landscape reserve «Ozery» (Grodno Region, Belarus)..... 81

SHORT COMMUNICATIONS

- Bozdoğan H., Cuéllar-Cardozo J. A.* Using insects against cancer 91
- Indicative abstracts of the papers deposited in BSU..... 95

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

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

**Экспериментальная биология
и биотехнология.
№ 2. 2023**

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. Пижкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 30.06.2023.

Тираж 85 экз. Заказ 212.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского
государственного университета».
ЛП № 02330/117 от 14.04.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, г. Минск.

© БГУ, 2023

**Experimental Biology
and Biotechnology.
No. 2. 2023**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliezhnasci Ave.,
Minsk 220030.

Correspondence address: 4 Niezaliezhnasci 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 30.06.2023.

Edition 85 copies. Order number 212.

Republic Unitary Enterprise
«Publishing Center of the Belarusian State University».
License for publishing No. 02330/117, 14 April, 2014.
6 Chyrvonaarmiejskaja Str., Minsk 220030.

© BSU, 2023