



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

3

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.

УДК 577.352.4

ПОВРЕЖДЕНИЕ СИНАПСОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА: МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ И СПОСОБЫ КОРРЕКЦИИ

С. В. ФЕДОРОВИЧ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

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

Заболевания центральной нервной системы являются значительной медицинской и социальной проблемой. Многие из них неизлечимы или трудно поддаются фармакологической коррекции. В основе заболеваний головного мозга часто лежат дисфункции синапсов различной природы (синаптопатии), приводящие к нарушению синаптической передачи и патологической модификации нервной ткани. Для изучения функциональных свойств синапсов применяются разнообразные модельные объекты, одними из наиболее часто используемых среди которых являются синапсосомы – изолированные пресинаптические окончания, сохраняющие интактную плазматическую мембрану и большинство внутриклеточных регуляторных и энергетических систем нейрона. В представленном обзоре проанализированы результаты собственных исследований и работы ведущих научных центров мира, раскрывающие ключевые аспекты патогенеза заболеваний головного мозга, с фокусом на данные, полученные с использованием синапсосом. Проведенный анализ показал, что в основе патогенеза различных заболеваний головного мозга лежат как накопление специфических белков, так и неспецифические физико-химические факторы. Наиболее важными примерами обоих типов воздействий являются синтез амилоидных пептидов, увеличение внеклеточной концентрации глутамата и снижение рН. Эти изменения характерны как для ишемического инсульта, так и для многих нейродегенеративных заболеваний. Установлено, что внеклеточное закисление приводит к образованию активных форм кислорода в электрон-транспортной цепи синапсосомальных митохондрий, а увеличение концентрации глутамата в инкубационной среде активирует НАДФН-оксидазу плазматической мембраны синапсосом,

Образец цитирования:

Федорович СВ, Демидчик ВВ. Повреждение синапсов центральной нервной системы при патологиях головного мозга: мембранные механизмы и способы коррекции. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;3:4–11. EDN: MRRDMP

For citation:

Fedorovich SV, Demidchik VV. Damage of central nervous system synapses at brain diseases: membrane mechanisms and methods of correction. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:4–11. Russian. EDN: MRRDMP

Авторы:

Сергей Викторович Федорович – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

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

Authors:

Sergei V. Fedorovich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology. fedorovich@bsu.by

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
<https://orcid.org/0000-0003-3765-8386>

стимулируя генерацию активных форм кислорода во внеклеточном пространстве. Гипогликемия, как осложнение сахарного диабета, ингибирует экзоцитоз в синапсосомах, что, вероятно, является защитным механизмом, а не повреждающим воздействием. Выявлен ряд факторов, которые могут быть использованы для коррекции дисфункций синапсов при заболеваниях центральной нервной системы. Так, для лечения эпилепсии может применяться кетогенная диета, когда в рационе пациентов углеводы заменяются жирами, что способствует синтезу кетоновых тел, в частности β -гидроксибутирата. С использованием синапсосом в качестве экспериментальной модели было продемонстрировано, что β -гидроксибутират ингибирует эндоцитоз, это может лежать в основе антиконвульсивного воздействия кетогенной диеты. Другим способом коррекции работы синапсов является применение ноотропных препаратов. Показано, что глицин и пирацетам, имеющие ноотропные свойства, способны индуцировать активацию пресинаптических рецепторов тормозных нейромедиаторов с последующим выходом ионов хлора из цитоплазмы и деполяризацией плазматической мембраны. Снижение порога деполяризации для высвобождения нейромедиаторов в некоторой степени объясняет ноотропное действие данных веществ. Таким образом, функционирование пресинаптического окончания нейрона можно нарушить или, наоборот, скорректировать при воздействии на специфические клеточные и мембранные мишени. Активация либо отключение идентифицированных мишеней могут быть основой терапии заболеваний головного мозга.

Ключевые слова: головной мозг; синапсы; синапсосомы; кетогенная диета; ноотропные препараты; гипогликемия.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке гранта ректора БГУ (на имя С. В. Федоровича). Авторы признательны студентке биологического факультета К. П. Кепель за помощь в подготовке рисунка.

DAMAGE OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM SYNAPSES AT BRAIN DISEASES: MEMBRANE MECHANISMS AND METHODS OF CORRECTION

S. V. FEDOROVICH^a, V. V. DEMIDCHIK^a

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

Corresponding author: S. V. Fedorovich (fedorovich@bsu.by)

Diseases of the central nervous system are a serious medical and social problem. Many of them are incurable or difficult to treat pharmacologically. Synapses damaging by different origin (synapthopathies) leading to malfunctioning synaptic transmission and pathological modification of nervous tissue often is underlied in brain diseases. Various objects are used to study the functional properties of synapses, one of the most popular being isolated neuronal presynaptic endings synaptosomes retaining intact plasma membrane and majority intracellular regulating and energetic system of neuron. This review analyses the results of our own research and the work of the world's leading scientific centres, revealing important aspects of the pathogenesis of the brain, focused on data obtained using synaptosomes. The analysis showed that the pathogenesis of various brain diseases is based on both the accumulation of specific proteins and non-specific physicochemical factors. The most important examples of both types of influences are amyloid peptide synthesis, increase in the extracellular concentration of glutamate and pH decrease. These changes are characteristic of both ischemic stroke and many neurodegenerative diseases. It has been established that extracellular acidification leads to the formation of reactive oxygen species in the electron transport chain of synaptosomal mitochondria, and an increase in the concentration of glutamate in the incubation medium activates NADPH oxidase of the plasma membrane of synaptosomes followed by reactive oxygen species generation in extracellular space. Hypoglycemia, a serious complication of diabetes mellitus, leads to inhibition of exocytosis in synaptosomes, which may be a protective mechanism rather than a damaging effect. Several factors were identified that can be used for synaptic dysfunction correction in diseases of the central nervous system. So, epilepsy can be treated by the ketogenic diet, when carbohydrates are replaced by fats in the ration, which leads to the synthesis of ketone bodies, primarily β -hydroxybutyrate. It was shown using synaptosomes as an experimental model, that β -hydroxybutyrate inhibits endocytosis, which may be the reason for the anticonvulsant effect of the ketogenic diet. Another way to correct the work of synapses are nootropic drugs. It has been shown that glycine and piracetam, which have nootropic properties, are able to induce the activation of presynaptic inhibitory receptors, followed by the efflux of chlorine ions from the cytosol and depolarisation of the plasma membrane. The lowering of the depolarisation threshold for the neurotransmitter release can explain the nootropic effect of these compounds. So, the functioning of the presynaptic terminal of a neuron can be impaired or vice versa corrected by specific targets manipulation. Activation or deactivation of identified targets can be the basis for various brain diseases therapy.

Keywords: brain; synapses; synaptosomes; ketogenic diet; nootropic drugs; hypoglycemia.

Acknowledgements. This work was supported by Belarusian State University rector's grant (S. V. Fedorovich). The authors grateful student at the faculty of biology K. P. Kepel for help with figure.

Заболевания центральной нервной системы являются большой медицинской и социальной проблемой. Различные неврологические нарушения считаются главной причиной инвалидности [1] и одной из основных причин смертности в мире (например, в 2019 г. они привели к 10 млн смертей [2]). Подсчитано, что только странам Евросоюза лечение заболеваний головного мозга ежегодно обходится в более чем 800 млрд евро [3]. К сожалению, для многих заболеваний центральной нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона и др., отсутствуют разработанные методы лечения, и возможна только симптоматическая терапия, лишь немного улучшающая качество жизни пациентов [4–6]. Для инсультов, болезни Паркинсона и шизофрении вероятность излечения и коррекции имеется, но возможности помочь больным часто также весьма ограничены [7–9]. В основе проблемы лежит плохая изученность механизмов повреждения нейронов, в первую очередь на уровне клетки и мембранных систем, что не позволяет расширить арсенал используемых методов терапии и диагностики заболеваний головного мозга.

Синапсы – это места контактов между нейронами. Их основной функцией является проведение и регуляция проведения нервного импульса между нервными клетками. При поступлении потенциала действия в пресинаптическое окончание нейронов происходит открытие потенциалчувствительных Ca^{2+} -каналов, что приводит к увеличению цитозольной концентрации кальция с последующим запуском экзоцитоза, слиянием мембран синаптических везикул и плазматической мембраны [10–12]. В результате этого нейромедиаторы, хранящиеся в синаптических везикулах, оказываются в синаптической щели и связываются с рецепторами на постсинаптических нейронах, приводя к передаче сигнала на соседний нейрон [11; 12]. Многие заболевания центральной нервной системы фактически обуславливаются нарушением работы синапсов. Например, при инсульте повреждения нейронов вызываются избыточным высвобождением важнейшего нейромедиатора – глутамата, что проявляется в феномене эксайтотоксичности, т. е. чрезмерной активации рецепторов глутамата N-метил-D-аспарататного (NMDA) типа, входе ионов кальция в цитоплазму и запуске апоптоза [9; 13]. В некоторых случаях нарушение функций головного мозга при инсульте может быть связано с так называемым разрушением синапсов (*synaptic failure*), при котором синапсы вообще перестают работать [14]. Важность повреждений синапсов в патогенезе заболеваний центральной нервной системы подтверждает тот факт, что когнитивный дефицит при болезни Альцгеймера связан прежде всего с уменьшением числа синапсов, а не количества нейронов [15].

Для изучения синапсов применяются различные экспериментальные модели. В частности, могут использоваться синапсы стандартных первичных нейрональных культур (например, синапсы нейронов мозжечка или коры головного мозга). Однако у этого подхода есть недостатки. Во-первых, стандартные синапсы слишком малы (их размер составляет менее 1 мкм), что затрудняет использование многих аналитических подходов [16]. Во-вторых, первичные культуры нейронов выделяют в основном из головного мозга однодневных животных или эмбрионов, что не позволяет экстраполировать результаты, полученные на этих модельных объектах, на физиологические процессы в зрелых нейронах [17]. Первого недостатка (малый размер синапсов) не имеют нейроны с гигантскими пресинаптическими окончаниями (например, биполярные нейроны сетчатки золотой рыбки или нейроны так называемой чашечки Хельда, структуры слуховой области головного мозга, и некоторые другие нейроны [18; 19]). В этом случае синапсы могут достигать размера 25 мкм. Однако неясно, насколько закономерности функционирования данных специализированных структур будут характерны для стандартных синапсов. В последние годы все большую распространенность приобретают исследования с использованием синаптосом – изолированных пресинаптических окончаний нейронов. По своей природе синаптосомы являются мембранной фракцией, выделенной из головного мозга с помощью дифференциального центрифугирования (метод разработан В. П. Уиттакером в 1958 г.) [20]. Синаптосомы способны к захвату и высвобождению нейромедиаторов, они имеют внутрисинаптические везикулы и митохондрии, которые могут выполнять свои функции [21–23], и тот же протеом, что и интактные пресинаптические окончания нейронов [16]. К преимуществам синаптосом как модельного объекта также можно отнести относительную простоту и дешевизну их получения. В отличие от первичных нейрональных культур синаптосомы можно выделять из организма взрослых животных, что позволяет более адекватно оценивать процессы, протекающие в зрелом головном мозге. Еще одним важным преимуществом использования изолированных пресинаптических окончаний нейронов в эксперименте является то, что они фактически представляют собой «усредненный» синапс, позволяющий изучать наиболее общие и фундаментальные закономерности, которые будут действовать для всех (или для большинства) типов интактных синаптических соединений вне зависимости от их морфологического и функционального разнообразия.

В основе патогенеза многих заболеваний центральной нервной системы лежит воздействие специфических факторов белковой природы. Примером могут быть роль амилоидных пептидов, являющихся продуктом расщепления амилоидного белка, в развитии болезни Альцгеймера [5; 15], роль синуклеина в развитии болезни Паркинсона [7] или роль прионов в развитии болезни Крейтцфельда – Якоба [24].

В то же время концепция «один ген – одна болезнь» уже считается несостоятельной. В качестве примера вероятного вовлечения одного гена в ряд заболеваний можно привести ген *DISC* (*disrupted in schizophrenia*). Как следует из названия, этот ген связан с развитием шизофрении, однако нарушение его работы может вносить вклад в патогенез депрессии и маниакально-депрессивного психоза [25].

Кроме белковых факторов, существуют неспецифические низкомолекулярные факторы, в частности накопление или потеря некоторых нейромедиаторов, резкое изменение рН или чрезмерная генерация активных форм кислорода (АФК) или активных форм азота. Например, высокая концентрация глутамата в синаптической щели может приводить к гибели нейронов при инсульте и многих нейродегенеративных заболеваниях [9; 13], а снижение рН внеклеточной среды может индуцировать повреждение нервных клеток при гипоксии головного мозга, болезни Альцгеймера, синдроме Дауна [26; 27].

В данном обзоре рассматриваются результаты экспериментов по изучению действия различных неспецифических физико-химических факторов, таких как снижение внутриклеточного рН, увеличение концентрации глутамата, гипогликемия, гипоксия, на функционирование пресинаптических окончаний нейронов головного мозга с использованием синаптосом в качестве экспериментальной модели.

Инсульт является третьей причиной смертности и первой причиной инвалидности во всем мире [28]. Ишемический инсульт возникает в результате острого нарушения кровотока, геморрагический инсульт – в результате кровоизлияния [28]. Ишемия головного мозга сопровождается снижением внеклеточного и внутриклеточного рН, а также увеличением высвобождения глутамата [29–31].

Защеление при гипоксии вызывается прежде всего переходом на анаэробный метаболизм и накоплением лактата [29; 30]. Внеклеточный и внутриклеточный рН в некоторых случаях (например, при гипергликемии) могут снижаться вплоть до значений рН 4,3 [29]. Защеление способно приводить к гибели нейронов [30]. Основной причиной гибели нервных клеток при этом выступает чрезмерный вход ионов кальция через ионные каналы ASIC (*acid sensitive ion channels*), активируемые при ацидификации [30]. Рост уровня кальция в цитоплазме запускает апоптотический каскад, приводя к самоуничтожению нейрона. В этом случае каналы ASIC фактически являются рецепторами для низких значений рН.

В пресинаптических окончаниях воздействие низких значений рН опосредовано другим рецептором – OGR1 (*ovarian cancer G protein-coupled receptor 1*) [32–34]. В зависимости от концентрации и функции основные нейромедиаторы (аминокислоты, пурины и др.) могут связываться с двумя классами сенсоров плазматической мембраны: ионотропными рецепторами (ионными каналами), характеризующимися высокими уровнями нейромедиаторов при высокой скорости реакции, и метаботропными рецепторами (системами, ассоциированными с G-белками), которым свойственны очень низкие уровни нейромедиаторов при низкой скорости реакции [32]. В первом случае активация рецепторов ведет к открытию ионных каналов и транспорту различных ионов через плазматическую мембрану, во втором случае происходит ряд биохимических реакций, в ходе которых синтезируются сигнальные молекулы либо открываются ионные каналы, регулируемые G-белками [32; 33]. В последние годы было обнаружено, что для протонов также имеются ионотропная и метаботропная системы рецепции [32–34]. Наряду с ионотропным H^+ -рецептором ASIC в нейронах обнаружены метаботропные H^+ -рецепторы, наиболее изученным и распространенным среди которых является рецептор OGR1 [33; 34]. Установлено, что в синаптосомах головного мозга крыс снижение внеклеточного рН приводит к активации рецептора OGR1 и связанного с ним фермента фосфолипазы C [32]. Образующийся инозитолтрифосфат обуславливает высвобождение ионов кальция из эндоплазматического ретикулума и их захват митохондриями, что в дальнейшем приводит к увеличению образования АФК и деполяризации синаптических митохондрий [32; 35; 36]. Окислительный стресс и митохондриальная дисфункция потенциально могут нарушить работу синапсов [37]. Важно отметить, что внутриклеточное защеление не вызывает окислительный стресс, так же как не приводит к деполяризации митохондриальных мембран в синаптосомах [35].

Важным повреждающим фактором при ишемии головного мозга является высокая концентрация глутамата в синаптической щели [13; 27]. Его источниками выступают как нейроны, так и астроциты [13; 27]. Причиной роста уровня глутамата являются деполяризация плазматической мембраны и уменьшение градиента ионов натрия из-за недостатка аденозинтрифосфата. Это приводит к электрохимическому перенаправлению транспорта глутамата на плазматической мембране, а также к экзоцитозу [13; 27]. Кроме того, избыточная активация рецепторов глутамата, прежде всего NMDA-типа, вызывает окислительный стресс [13; 27; 31]. Ранее считалось, что основным источником свободных радикалов в нейронах является электрон-транспортная цепь митохондрий [38]. Но в дальнейшем было показано, что основным источником АФК в нейронах в этом случае выступает фермент НАДФН-оксидаза [39]. Подобные явления отмечены и для пресинаптических окончаний [40]. В синаптосомах добавление глутамата ведет к активации ионотропных рецепторов глутамата NMDA- и AMPA-типа или КА-типа (последние два типа рецепторов активируются α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой и каиновоы кислотами соответственно) и далее к опосредованному НАДФН-оксидазой синтезу АФК [40].

В случае гипоксии может наблюдаться так называемое разрушение синапсов, при котором отмечается резкое снижение активности синапсов в нервной ткани [14]. Долгое время оставалось непонятным, какую природу носит данное явление, т. е. происходит оно в результате ингибирования высвобождения нейромедиаторов (пресинаптический механизм) или в ходе дисфункции процесса рецепции (постсинаптический механизм). Недавно было показано, что гипоксия ведет к ингибированию экзоцитоза и эндоцитоза [17]. Соответственно, более вероятным представляется пресинаптический механизм. В предыдущих работах авторов было обнаружено, что эндоцитоз при гипоксии ингибируется сильнее, чем экзоцитоз [17]. Эти результаты наряду с другими экспериментальными фактами позволяют сформулировать гипотезу, согласно которой эндоцитоз выступает в качестве метаболического сенсора в синапсах нейронов [27].

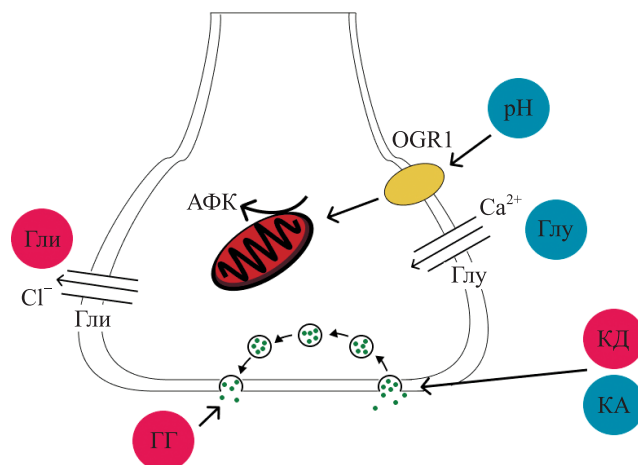
Основным триггером экзоцитоза и высвобождения нейромедиаторов являются вход ионов кальция через потенциалчувствительные каналы в цитоплазму пресинаптических окончаний и их связывание с важнейшим Ca^{2+} -сенсором – синаптотагмином-1 [10–12]. В то же время существуют варианты индукции экзоцитоза без увеличения цитозольной концентрации кальция и активации Ca^{2+} -сенсора [41]. К ним относятся гипертоническое сжатие и гипотоническое набухание пресинаптического окончания [22; 42]. Ранее авторами было показано, что схожим действием обладают антагонисты Ca^{2+} -каналов – ионы лантаноидов и рутениевый красный [42]. Молекулярные механизмы Ca^{2+} -независимого экзоцитоза пока не совсем понятны, хотя известно, что в отличие от механизмов физиологического Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза в их основе не лежат изменения в липидных рафтах плазматической мембраны [43]. В то же время высвобождение нейромедиаторов, индуцированное гипертоническим сжатием и действием лантаноида гадолия, зависит от наличия белков интегринов в синаптосомах [42]. До настоящего момента остается непонятным, почему такое большое количество разнородных факторов вызывают Ca^{2+} -независимый экзоцитоз. Можно предположить, что после стадий докинга и прайминга система плазматическая мембрана – синаптическая везикула находится в метастабильном состоянии. В случае физиологического экзоцитоза система сдвигается из равновесия после связывания синаптотагмина-1 с ионами кальция, а в других случаях – в результате изменения натяжения плазматической мембраны или связывания поливалентных катионов с внешней поверхностью пресинаптического окончания (такие катионы значительно модифицируют свойства липидного бислоя, снижая его текучесть). Кроме того, само существование двух форм экзоцитоза, только одна из которых является физиологической, возможно, в будущем позволит их разделить фармакологически. Это будет важно для разработки терапии заболеваний центральной нервной системы, сопровождающихся неконтролируемым избыточным высвобождением нейромедиаторов.

С энергетической точки зрения головной мозг представляет собой очень затратный орган. Он занимает около 2 % от общей массы, но потребляет 20 % энергии организма и 20–25 % кислорода [27; 44]. В основном энергия тратится на ионный транспорт [27; 44]. Неудивительно, что нарушения метаболизма нейронов лежат в основе многих патологических состояний [27; 44]. В качестве примера можно привести гипогликемию. Около 30 % больных сахарным диабетом страдают от снижения уровня глюкозы в крови, связанного с лечением инсулином [45]. Острая гипогликемия приводит к коме и смерти, эпизоды умеренной гипогликемии вызывают нейродегенеративные изменения [45]. Механизм развития повреждения нейронов при снижении уровня глюкозы в крови не совсем понятен, но предполагается ведущая роль избыточного высвобождения глутамата [45]. Авторами показано, что гипогликемия приводит к ингибированию экзоцитоза и достаточно небольшой деполяризации плазматической мембраны синапсом по сравнению с массивной деполяризацией синаптических митохондрий [46]. Электрический потенциал плазматической мембраны поддерживается за счет использования в митохондриях эндогенных энергетических субстратов [46]. Их природа все еще непонятна. Следует отметить, что электрический потенциал самой маленькой органеллы синапсов (синаптической везикулы) в случае гипогликемии остается неизменным [46]. Можно предположить, что описанные изменения различных биофизических параметров и процессов носят защитный, адаптивный характер. К нейропротекторным изменениям, вероятно, также относится увеличение рН-градиента синаптических митохондрий [46]. Таким образом, предполагаем, что вклад эксайтотоксичности в повреждения нейронов при гипогликемии является незначительным, в то же время существует целый ряд защитных механизмов, позволяющих головному мозгу переживать краткие эпизоды гипогликемии.

В некоторых случаях для лечения заболеваний центральной нервной системы можно использовать направленные изменения метаболизма нервной ткани и организма в целом. Одним из способов изменения метаболизма является так называемая кетогенная диета [47; 48]. При использовании этого вида терапии производится замена углеводов на жиры в рационе [47; 48]. В результате в печени из жирных кислот образуются так называемые кетоновые тела – β -гидроксибутират (БГБ), ацетоацетат и ацетон. Основным кетоновым телом является БГБ [49]. Он и ацетоацетат далее могут использоваться митохондриями нейронов и кардиомиоцитов в качестве энергетического субстрата [47; 48]. Кетогенная диета применяется на практике прежде всего для лечения детской эпилепсии, но потенциально она также может использоваться

для терапии болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, нейротравмы [47; 48]. Какого-то единого молекулярного механизма, объясняющего нейропротекторные свойства кетоновых тел, похоже, не существует, но считается, что они могут положительно влиять на нейроны на уровне перепрограммирования метаболизма, активации специфических G-протеинсвязанных рецепторов, эпигенетической регуляции [27; 48]. Известно, что БГБ действует и непосредственно на синапсы. Авторами показано, что умеренные (4 ммоль/л) дозы БГБ могут частично ингибировать эндоцитоз [49]. Снижение скорости эндоцитоза способно приводить к уменьшению пула синаптических везикул при избыточной стимуляции, чем может объясняться антиконвульсивное действие кетогенной диеты [27; 48]. В то же время очень высокие (более 20 ммоль/л) концентрации кетоновых тел, которые наблюдаются при таком осложнении сахарного диабета, как кетоацидоз, несомненно, обладают нейротоксичностью [48; 50]. Было показано, что 25 ммоль/л БГБ, в отличие от 4 ммоль/л этого же вещества, вызывают деполяризацию плазматической мембраны, что отрицательно сказывается на работе синапсов [51]. Кроме того, в случае высоких концентраций происходит практически полное ингибирование эндоцитоза, что делает синапс фактически «одноразовым» [51]. Таким образом, действие кетоновых тел на синапсы может отличаться в зависимости от их концентрации.

Рецепторы нейромедиаторов в основном находятся на постсинаптических нейронах, но существует также пул пресинаптических рецепторов [52]. Их функция состоит в обратной регуляции высвобождения нейромедиаторов из пресинаптической терминали [52]. Как известно, нейромедиаторы делятся на возбуждающие и тормозные. Ионотропные рецепторы для тормозных нейромедиаторов представлены особыми Cl⁻-каналами. В постсинаптических нейронах их открытие приводит к гиперполяризации плазматической мембраны [53]. Но в пресинаптических окончаниях процессы развиваются иначе. В синапсосамах цитоплазматическая концентрация хлора составляет около 50 ммоль/л [54]. Такой высокий уровень хлора приводит к тому, что при открытии анионных каналов ионы хлора не входят в клетку, а выходят из клетки, это ведет к массивной деполяризации мембраны [53; 54]. Авторами показано, что тормозной нейромедиатор глицин и циклическое производное тормозного нейромедиатора гамма-аминомасляной кислоты пирацетам способствуют деполяризации, а не гиперполяризации плазматической мембраны синапсом [53; 55]. Следует отметить, что глицин и пирацетам часто используются в качестве ноотропных препаратов, но механизм их действия остается непонятным [56; 57]. Можно предположить, что небольшая деполяризация плазматической мембраны при действии глицина или пирацетама снижает порог потенциала действия, необходимый для высвобождения нейромедиаторов.



Основные молекулярные мишени физико-химических воздействий, локализованные на пресинаптическом окончании нейронов.

Снижение pH влечет за собой активацию рецептора OGR1, что приводит к образованию

АФК в митохондриях. Глутамат (Глу) вызывает вход ионов кальция в цитозоль.

Кетогенная диета (КД) способствует умеренному ингибированию эндоцитоза.

Кетоацидоз (КА) практически полностью блокирует эндоцитоз.

Гипогликемия (ГТ) ведет к ингибированию экзоцитоза, которое, вероятно, снижает повреждающее действие этого фактора. Глицин (Гли) вызывает выход ионов хлора из цитозоля.

Синим цветом отмечены нейротоксичные воздействия, красным цветом – потенциально нейропротекторные воздействия.

Гипотетическая модель построена на основе работ [10; 17; 21–23; 27; 32; 35; 36; 40; 46; 48; 49; 51; 54; 55]

Main molecular targets for different physicochemical factors, which are localised on neuronal presynaptic endings.

Lowering of pH leads to OGR1 receptor activation with following reactive oxygen species formation in mitochondria.

Glutamate (Глу) is induced calcium ion uptake in cytosol. Ketogenic diet (КД) promotes moderate endocytosis inhibiting.

Ketoacidosis (КА) virtually completely blocked endocytosis. Hypoglycemia (ГТ) leads to exocytosis inhibiting, which likely decrease damaging influence of this factor. Glycine (Гли) induce chlorine ion efflux from cytosol.

Neurotoxic influences are marked by blue colour, potentially neuroprotective influences are marked by red colour.

Hypothetic model was built according paper [10; 17; 21–23; 27; 32; 35; 36; 40; 46; 48; 49; 51; 54; 55]

Таким образом, функционирование пресинаптического окончания нейрона можно нарушить или, наоборот, скорректировать при воздействии на специфические мишени. Активация либо отключение идентифицированных мишеней могут быть основой для терапии различных заболеваний головного мозга. Наиболее важные потенциальные мишени, идентифицированные с использованием синаптосом в качестве экспериментальной модели, изображены на рисунке.

Библиографические ссылки / References

1. Feigin VL, Vos T, Nichols E, Owolabi MO, Carroll WM, Dichgans M, et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *The Lancet Neurology*. 2020;19(3):255–265. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30411-9.
2. Ding Chenyu, Wu Yuying, Chen Xiaoyong, Chen Yue, Wu Zanyi, Lin Zhangya, et al. Global, regional, and national burden and attributable risk factors of neurological disorders: the global burden of disease study 1990–2019. *Frontiers in Public Health*. 2022; 10:952161. DOI: 10.3389/fpubh.2022.952161.
3. Di Luca M, Olesen J. The cost of brain diseases: a burden or a challenge? *Neuron*. 2014;82(6):1205–1208. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.05.044.
4. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(9):710–723. DOI: 10.1038/nrn1971.
5. De Strooper B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiological Reviews*. 2010;90(2):465–494. DOI: 10.1152/physrev.00023.2009.
6. McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology*. 2018;25(1):24–34. DOI: 10.1111/ene.13413.
7. Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological Reviews*. 2011;91(4):1161–1218. DOI: 10.1152/physrev.00022.2010.
8. Oertel-Knöchel V, Bittner RA, Knöchel C, Prvulovic D, Hampel H. Discovery and development of integrative biological markers for schizophrenia. *Progress in Neurobiology*. 2011;95(4):686–702. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.05.006.
9. George PM, Steinberg GK. Novel stroke therapeutics: unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments. *Neuron*. 2015;87(2):297–309. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.041.
10. Hu K, Carroll J, Fedorovich S, Rickman C, Sukhodub A, Davletov B. Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion. *Nature*. 2002;415(6872):646–650. DOI: 10.1038/415646a.
11. Südhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*. 2004;27:509–547. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
12. Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*. 2013;80(3):675–690. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.022.
13. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. 2010;460(2):525–542. DOI: 10.1007/s00424-010-0809-1.
14. Hofmeijer J, van Putten MJAM. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure. *Stroke*. 2012;43(2):607–615. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.632943.
15. Spires-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2014;82(4):756–771. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.05.004.
16. Wilhelm BG, Mandad S, Truckenbrodt S, Kröhnert K, Schäfer C, Rammner B, et al. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*. 2014;344(6187):1023–1028. DOI: 10.1126/science.1252884.
17. Fedorovich S, Hofmeijer J, van Putten MJAM, le Feber J. Reduced synaptic vesicle recycling during hypoxia in cultured cortical neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017;11:32. DOI: 10.3389/fncel.2017.00032.
18. Wang L-Y, Augustine GJ. Presynaptic nanodomains: a tale of two synapses. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:455. DOI: 10.3389/fncel.2014.00455.
19. Moser T, Grabner CP, Schmitz F. Sensory processing at ribbon synapses in the retina and the cochlea. *Physiological Reviews*. 2020;100(1):103–144. DOI: 10.1152/physrev.00026.2018.
20. Hebb CO, Whittaker VP. Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *The Journal of Physiology*. 1958; 142(1):187–196. DOI: 10.1113/jphysiol.1958.sp006008.
21. Waseem TV, Konev SV, Fedorovich SV. Influence of hypotonic shock on glutamate and GABA uptake in rat brain synaptosomes. *Neurochemical Research*. 2004;29(9):1653–1658. DOI: 10.1023/b:nere.0000035799.79422.d1.
22. Waseem TV, Rakovich AA, Lavrukevich TV, Konev SV, Fedorovich SV. Calcium regulates the mode of exocytosis induced by hypotonic shock in isolated neuronal presynaptic endings. *Neurochemistry International*. 2005;46(3):235–242. DOI: 10.1016/j.neuint.2004.09.002.
23. Fedorovich SV, Waseem TV, Puchkova LV. Biogenetic and morphofunctional heterogeneity of mitochondria: the case of synaptic mitochondria. *Reviews in the Neurosciences*. 2017;28(4):363–373. DOI: 10.1515/revneuro-2016-0077.
24. Aguzzi A, Calella AM. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiological Reviews*. 2009;89(4):1105–1152. DOI: 10.1152/physrev.00006.2009.
25. Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(41):12768–12775. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3355-09.2009.
26. Yates CM, Butterworth J, Tennant MC, Gordon A. Enzyme activities in relation to pH and lactate in postmortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *Journal of Neurochemistry*. 1990;55(5):1624–1630. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04948.x.
27. Fedorovich SV, Waseem TV. Metabolic regulation of synaptic activity. *Reviews in the Neurosciences*. 2018;29(8):825–835. DOI: 10.1515/revneuro-2017-0090.
28. Corbyn Z. A growing global burden. *Nature*. 2014;510(7506):S2–S3. DOI: 10.1038/510S2a.
29. Kraig RP, Chesler M. Astrocytic acidosis in hyperglycemic and complete ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1990;10(1):104–114. DOI: 10.1038/jcbfm.1990.13.

30. Wemmie JA, Taugher RJ, Kreple CJ. Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(7):461–471. DOI: 10.1038/nrn3529.
31. Choi DW. Excitotoxicity: still hammering the ischemic brain in 2020. *Frontiers in Neuroscience*. 2020;14:579953. DOI: 10.3389/fnins.2020.579953.
32. Fedorovich SV, Dubouskaya TG, Waseem TV. Synaptic receptors for low pH in extracellular space: metabotropic receptors are an underestimated factor in stroke. *Neural Regeneration Research*. 2020;15(11):2033–2034. DOI: 10.4103/1673-5374.282249.
33. Zha X-M, Xiong Z-G, Simon RP. pH and proton-sensitive receptors in brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2022;42(8):1349–1363. DOI: 10.1177/0271678X221089074.
34. Ludwig M-G, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2003;425(6953):93–98. DOI: 10.1038/nature01905.
35. Pekun TG, Lemeshchenko VV, Lyskova TI, Waseem TV, Fedorovich SV. Influence of intra- and extracellular acidification on free radical formation and mitochondria membrane potential in rat brain synaptosomes. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2013;49(1):211–222. DOI: 10.1007/s12031-012-9913-3.
36. Dubouskaya TG, Hrynevich SV, Waseem TV, Fedorovich SV. Calcium release from intracellular stores is involved in mitochondria depolarization after lowering extracellular pH in rat brain synaptosomes. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2018;78(4):343–352. DOI: 10.21307/ane-2018-033.
37. Keating DJ. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*. 2008;104(2):298–305. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04997.x.
38. Reynolds IJ, Hastings TG. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience*. 1995;15(5):3318–3327. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.15-05-03318.1995.
39. Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience*. 2009;12(7):857–863. DOI: 10.1038/nn.2334.
40. Alekseenko AV, Lemeshchenko VV, Pekun TG, Waseem TV, Fedorovich SV. Glutamate-induced free radical formation in rat brain synaptosomes is not dependent on intrasynaptosomal mitochondria membrane potential. *Neuroscience Letters*. 2012;513(2):238–242. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.02.051.
41. Bouron A. Modulation of spontaneous quantal release of neurotransmitters in the hippocampus. *Progress in Neurobiology*. 2001;63(6):613–635. DOI: 10.1016/s0301-0082(00)00053-8.
42. Waseem TV, Lapatsina LP, Fedorovich SV. Influence of integrin-blocking peptide on gadolinium- and hypertonic shrinking-induced neurotransmitter release in rat brain synaptosomes. *Neurochemical Research*. 2008;33(7):1316–1324. DOI: 10.1007/s11064-007-9585-5.
43. Waseem TV, Kolos VA, Lapatsina LP, Fedorovich SV. Influence of cholesterol depletion in plasma membrane of rat brain synaptosomes on calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. *Neuroscience Letters*. 2006;405(1–2):106–110. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.06.029.
44. Harris JJ, Jolivet R, Attwell D. Synaptic energy use and supply. *Neuron*. 2012;75:762–777. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.08.019.
45. Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: an integrated view. *Neurochemistry International*. 2013;63(4):331–343. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.06.018.
46. Hrynevich SV, Pekun TG, Waseem TV, Fedorovich SV. Influence of glucose deprivation on membrane potentials of plasma membranes, mitochondria and synaptic vesicles in rat brain synaptosomes. *Neurochemical Research*. 2015;40(6):1188–1196. DOI: 10.1007/s11064-015-1579-0.
47. Gano LB, Patel M, Rho JM. Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. *Journal of Lipid Research*. 2014;55(11):2211–2228. DOI: 10.1194/jlr.R048975.
48. Fedorovich SV, Voronina PP, Waseem TV. Ketogenic diet versus ketoacidosis: what determines the influence of ketone bodies on neurons? *Neural Regeneration Research*. 2018;13(12):2060–2063. DOI: 10.4103/1673-5374.241442.
49. Hrynevich SV, Waseem TV, Hébert A, Pellerin L, Fedorovich SV. β -Hydroxybutyrate supports synaptic vesicle cycling but reduces endocytosis and exocytosis in rat brain synaptosomes. *Neurochemistry International*. 2016;93:73–81. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.12.014.
50. Kanikarla-Marie P, Jain SK. Hyperketonemia and ketosis increase the risk of complications in type 1 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;95:268–277. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.020.
51. Voronina PP, Adamovich KV, Adamovich TV, Dubouskaya TG, Hrynevich SV, Waseem TV, et al. High concentration of ketone body β -hydroxybutyrate modifies synaptic vesicle cycle and depolarizes plasma membrane of rat brain synaptosomes. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2020;70(1):112–119. DOI: 10.1007/s12031-019-01406-9.
52. Lovinger DM, Mateo Y, Johnson KA, Engi SA, Antonazzo M, Cheer JF. Local modulation by presynaptic receptors controls neuronal communication and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*. 2022;23(4):191–203. DOI: 10.1038/s41583-022-00561-0.
53. Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological Reviews*. 2007;87(4):1215–1284. DOI: 10.1152/physrev.00017.2006.
54. Waseem TV, Fedorovich SV. Presynaptic glycine receptors influence plasma membrane potential and glutamate release. *Neurochemical Research*. 2010;35(8):1188–1195. DOI: 10.1007/s11064-010-0174-7.
55. Fedorovich SV. Piracetam induces plasma membrane depolarization in rat brain synaptosomes. *Neuroscience Letters*. 2013;553:206–210. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.08.045.
56. Malík M, Tlustoš P. Nootropic as cognitive enhancers: types, dosage and side effects of smart drugs. *Nutrients*. 2022;14(16):3367. DOI: 10.3390/nu14163367.
57. File SE, Fluck E, Fernandes C. Beneficial effects of glycine (Bioglycin) on memory and attention in young and middle-aged adults. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1999;19(6):506–512. DOI: 10.1097/00004714-199912000-00004.

Физиология и клеточная биология

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

УДК 59.084

ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ГРУППЫ ПРИ СОДЕРЖАНИИ НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ В СТАНДАРТНЫХ ТЕСТАХ

К. П. АВИМОВА¹⁾, Д. Б. САНДАКОВ¹⁾

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

Исследовано, как условия содержания беспородных лабораторных мышей (одиночное, парное, групповое) влияют на их поведение в стандартных тестах, а также на динамику массы тела и количество кожных повреждений. Отмечено, что в тесте «открытое поле» мыши, содержащиеся в группе, демонстрировали более продолжительное время груминга и эпизодов замирания, а в тесте «норковая камера» они показали наименьшую эффективность исследовательского поведения. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» мыши, содержащиеся поодиночке и попарно, в закрытых рукавах проводили больше времени, чем в открытых, тогда как у мышей, содержащихся в группе, предпочтения закрытых рукавов не выявлено. В течение 30 дней эксперимента наименьшее количество кожных повреждений наблюдалось у мышей, содержащихся попарно, при этом у всех животных отмечена сходная динамика набора массы тела.

Ключевые слова: лабораторные мыши; условия содержания животных; одиночное содержание; групповое содержание; поведенческие тесты; открытое поле; норковая камера; подвешивание за хвост; приподнятый крестообразный лабиринт; социальный стресс.

Образец цитирования:

Авимова КП, Сандаков ДБ. Влияние размера группы при содержании на поведение мышей в стандартных тестах. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;3:12–23. EDN: OHLNDG

For citation:

Avimova KP, Sandakov DB. Influence of group size on mice behaviour in standard tests. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:12–23. Russian. EDN: OHLNDG

Авторы:

Ксения Петровна Авимова – магистрант кафедры биохимии биологического факультета. Научный руководитель – Д. Б. Сандаков.
Дмитрий Борисович Сандаков – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Kseniya P. Avimova, master's degree student at the department of biochemistry, faculty of biology.
avimova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8768-4537>
Dmitry B. Sandakov, PhD (biology), docent; associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
d.sandakov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1648-0275>

INFLUENCE OF GROUP SIZE ON MICE BEHAVIOUR IN STANDARD TESTS

K. P. AVIMOVA^a, D. B. SANDAKOV^a

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

Corresponding author: K. P. Avimova (avimova@gmail.com)

The influence of housing conditions (single, pair or group) on mice behaviour in standard tests (open field test, hole-board test, tail suspension test and elevated X-maze test) was studied. Group housing lead to increased time of grooming and freezing episodes in open field test. In hole-board test, group-housed mice demonstrated the least efficiency of exploratory activity. Single- and pair-housed mice were spending more time in closed arms of elevated X-maze (compared with open arms), and group-housed mice didn't show the preference of closed arms. After 30 days under different experimental conditions, the least skin damage level was observed in pair-housed mice. Meanwhile, the dynamics of weight gain was similar in all animals.

Keywords: laboratory mice; conditions for housing of animals; single housing; group housing; behavioural tests; open field test; hole-board test; tail suspension test; elevated X-maze test; social stress.

Введение

В биомедицинской и научной практике широко используются грызуны, в первую очередь мыши и крысы. Условия содержания животных могут сильно отличаться в зависимости от типа учреждения. Существующие руководства по содержанию лабораторных животных (в Европе действуют руководства, основанные на Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [1]) дают различные рекомендации по количеству особей в группах и площади клетки. Так, согласно руководству по содержанию лабораторных животных Федерации университетов по защите животных (*Universities Federation for Animal Welfare, UFAW*) потребность в жизненном пространстве (минимальная площадь клетки) для мышей при одиночном содержании составляет 330 см², при групповом содержании – 80 см² на каждую взрослую особь [2, p. 278].

Известно, что одиночное содержание мышей в лабораторной практике может приводить к аномальному поведению (стереотипиям, гиперактивности и т. п.) [3; 4], дефициту внимания [5]. Так, у содержащихся поодиночке животных наблюдается депрессивное поведение в тестах «принудительное плавание» [6–8] и «подвешивание за хвост» [6] и повышенная тревожность в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» [7] и «приподнятый круговой лабиринт» [8]. Исследовательская активность в тесте «открытое поле» может как повышаться [9], так и понижаться [7]. Отмечается повышенная экспрессия TLR, IL-6 и TNF- α в гиппокампе [10], IL-10, TNF- α и VEGF в плазме крови [11]. Депрессивное состояние и тревожность у грызунов-изолянтов обуславливаются ослаблением окситоцин-индуцированной ГАМК-ергической передачи в миндалевидном теле [8] и сопровождаются снижением активности каталазы и уровня цинка и меди в гиппокампе и префронтальной коре [12], уменьшением содержания серотонина в гиппокампе и повышением его оборота, ростом концентрации 5-гидроксииндолуксусной кислоты [9]. Вместе с тем в некоторых работах (см., например, [13]) демонстрируется противоположный эффект одиночного содержания. Авторы публикации [14] полагают, что это может зависеть от генетического дрейфа в разных линиях, а также от условий жизни в питомниках.

Групповое содержание может вызывать стресс и приводить к физиологическим и поведенческим нарушениям, если количество конспецификов в одном пространстве слишком велико или между ними часто происходят конфликты [15]. Стоит отметить, что обычно изучают именно эффект перенаселенности клетки, а не размер и состав группы мышей. Скученное содержание нередко используют как стрессирующий фактор [16] для анализа последствий социального стресса, причем не только у грызунов, но и у других видов (например, гуппи [17]). Стресс из-за слишком высокой плотности животных проявляется в изменении состава кишечной микробиоты у мышей [18] и степных полевок [19], росте уровня цитокинов в кишечнике у мышей [18], а также в иных физиологических реакциях (в частности, в повышении концентрации кортикостерона и серотонина в сыворотке крови [19], уменьшении тимуса и увеличении коры надпочечников [20]) и поведении (например, в большей скорости движения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт, чем у не стрессированных таким образом мышей, и в предпочтении в отличие от них темной половины в тесте «темно-светлая камера» [18]). Хронический стресс из-за перенаселенности клетки повышает тревожность, но не вызывает депрессии [21; 22]. Социальный

стресс, обусловленный высокой плотностью животных, усиливает агрессию и влияет на работу окситоцин-вазопрессиновой системы [23]. Впрочем, эффект скученного содержания по-разному сказывается на мышах разных линий [24; 25], кроме того, многое зависит от длительности эксперимента (см., например, [26]).

Цель настоящей работы – изучение особенностей поведения мышей в стандартных тестах при одиночном, парном и групповом содержании.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные. В эксперименте участвовали 18 взрослых самцов беспородных лабораторных мышей, выращенных в виварии биологического факультета БГУ. Экспериментальные протоколы и правила работы с животными утверждены на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета БГУ (протокол № 13 от 19 марта 2020 г.).

Условия содержания. До начала эксперимента мыши содержались в общих клетках в условиях вивария. В первый день эксперимента мыши были случайно отобраны и рассажены по стандартным пластиковым клеткам (размер дна 20 × 30 см) следующим образом: 6 мышей в клетке – групповое содержание (1 клетка), 2 мыши в клетке – парное содержание (3 клетки), 1 мышь в клетке – одиночное содержание (6 клеток). В результате были сформированы 3 экспериментальные группы по 6 мышей. Во время эксперимента клетки стояли в отдельном помещении, где не было других животных. В течение 30 дней мыши содержались в следующих условиях: кормление *ad libitum*, естественное освещение, смена воды каждые 3 дня, смена субстрата раз в неделю, но не позднее чем за 5 дней до начала поведенческих тестов. Кроме того, раз в 3 дня выполнялись взвешивание и фотографирование животных. На 31–33-й день проводились поведенческие тесты (по одному тесту в день).

Тест «открытое поле». Использовалась установка размером 50 × 50 см с высотой стенок 40 см (без крышки), пол которой был разделен на квадраты размером 10 × 10 см. Мыши помещались посередине противоположной от видеокамеры стенки. Продолжительность теста составляла 4 мин. Мыши, державшиеся попарно и в группе, после тестирования помещались в отдельную клетку и возвращались в жилую клетку только после прохождения теста всеми мышами клетки. После каждой мыши установка очищалась от экскрементов, дважды протиралась чистой влажной салфеткой и вытиралась насухо. Анализировались пройденная дистанция, время вертикальной двигательной активности, средняя скорость движения, время пребывания в центре арены, длительность эпизодов неподвижности, продолжительность груминга.

Тест «норковая камера». Использовалось стандартное 16-луночное пластиковое поле размером 50 × 50 см (диаметр лунки 3 см), установленное на высоте 1 м от пола. Мышь помещалась в центр поля. Длительность теста составляла 3 мин. Возвращение мышей в клетку и очистка поля проводились так же, как в тесте «открытое поле». При анализе фиксировались количество заглядываний в лунки, количество повторных заглядываний в лунки, число непосещенных лунок.

Тест «подвешивание за хвост». С помощью лейкопластыря мыши прикреплялись за хвост к краю стола головой вниз. Длительность теста составляла 6 мин. При анализе фиксировались латентный период первой неподвижности, суммарное время неподвижности, количество эпизодов неподвижности и средняя продолжительность эпизода неподвижности.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Лабиринт (длина рукава 30 см, ширина рукава 5 см, высота стенки закрытых рукавов 30 см) был закреплен на штативе на высоте 1 м от пола. Длительность теста составляла 5 мин. После каждого животного пол и стенки лабиринта очищались так же, как и другие установки. При проведении теста учитывалось количество заходов в открытые и закрытые рукава, а также время, проведенное в каждом типе рукавов.

Анализ данных. Для анализа поведения мышей в тесте «открытое поле» использовалась программа *ANY-maze Video Tracking System 7.10 (Stoelting, США)*¹. Полученные данные представлены в виде медианы и интерквартильной широты. Для визуализации результатов построены ящичковые диаграммы Тьюки («ящички» показывают интерквартильную широту с медианой, «усы» – размах между 5-м и 95-м перцентилями, точки – потенциальные выбросы [27, р. 60–63]).

Для статистической проверки нулевой гипотезы (H_0 : условия содержания не влияют на результаты поведенческих тестов) вычислялась разность медиан (*difference between medians*) между всеми группами попарно и строились доверительные интервалы (ДИ) для полученных значений (методика описана в работе [28, chap. 5]). Статистически достоверной считали такую разность медиан, 99 % ДИ для которой не включал в себя ноль. Отмечали тенденцию к различиям, если 95 % ДИ для разности медиан не включал в себя ноль.

¹См.: <https://www.any-maze.com/>.

Делать поправки на множественные сравнения авторы посчитали нецелесообразным [28, chap. 13; 29], выбрав вместо этого более строгий критерий значимости (тождественный $\alpha = 0,01$) и приводя показатель величины эффекта (ДИ).

В случаях, где тестировались парные выборки (при сравнении поведения мышей одной и той же группы на разных минутах, например, в тесте «открытое поле»), не всегда было возможно вычислить 95 % ДИ и 99 % ДИ из-за малого количества испытуемых животных, поэтому проводился тест Вилкоксона для парных выборок. Статистически достоверной считалась разница при уровне значимости $p < 0,01$. При значении $0,01 < p < 0,05$ отмечалась тенденция к различиям. Для определения биологического эффекта вычислялась разность медиан для парных выборок и менее широкие ДИ (предложенные утилитой *wilcox.test*²).

Данные в тексте представлены как разность медиан с указанием в скобках соответствующего ДИ (например, 5 (99 % ДИ 3–7) с).

Расчеты проводились в среде R 4.2.0. Для описательных статистик использовалась утилита *quantile*³ из пакета *stats*⁴, для вычисления ДИ и проведения теста Вилкоксона для парных выборок – утилита *wilcox.test* из того же пакета, для построения графиков – утилита *ggboxplot*⁵ из пакета *ggpubr*⁶.

Результаты

Изменение массы тела. Было установлено, что мыши всех экспериментальных групп достоверно набрали массу, причем это не зависело от условий содержания: через 30 дней после рассадки они стали весить на 7,23 (99 % ДИ 5,82–6,83) г больше. Интересно, что при групповом содержании некоторые мыши в первые дни эксперимента теряли вес, но спустя неделю догоняли других животных, и динамика увеличения массы тела соответствовала таковой у остальных групп (рис. 1).

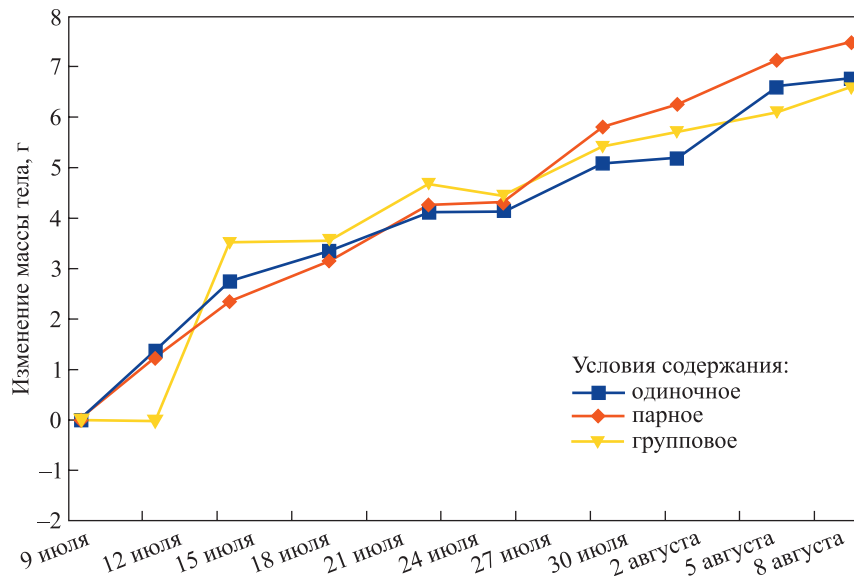


Рис. 1. Динамика массы тела у мышей в течение 30 дней при одиночном, парном и групповом содержании

Fig. 1. Body mass dynamics in mice during 30 days for single, pair and group housing

Повреждения кожи. Оценку повреждений кожи мышей проводили раз в 3 дня. На рис. 2 и 3 показано состояние кожного покрова животных на 3-й и 30-й день эксперимента соответственно.

Мыши, содержащиеся попарно, не имели значительных повреждений кожи ни в начале, ни в конце эксперимента. При групповом содержании в первые дни эксперимента у животных было мало повреждений кожи, но затем у некоторых особей они становились больше и (или) появлялись новые отметины. Часть мышей, содержащихся поодиночке, в конце эксперимента также имели повреждения, появившиеся в течение 30 дней.

²См.: <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/wilcox.test>.

³См.: <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/quantile>.

⁴См.: <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2>.

⁵См.: <https://www.rdocumentation.org/packages/ggpubr/versions/0.4.0/topics/ggboxplot>.

⁶См.: <https://www.rdocumentation.org/packages/ggpubr/versions/0.4.0>.



Рис. 2. Состояние кожи мышей на 3-й день эксперимента при одиночном, парном и групповом содержании
Fig. 2. Skin condition of mice on the 3rd day of the experiment for single, pair and group housing

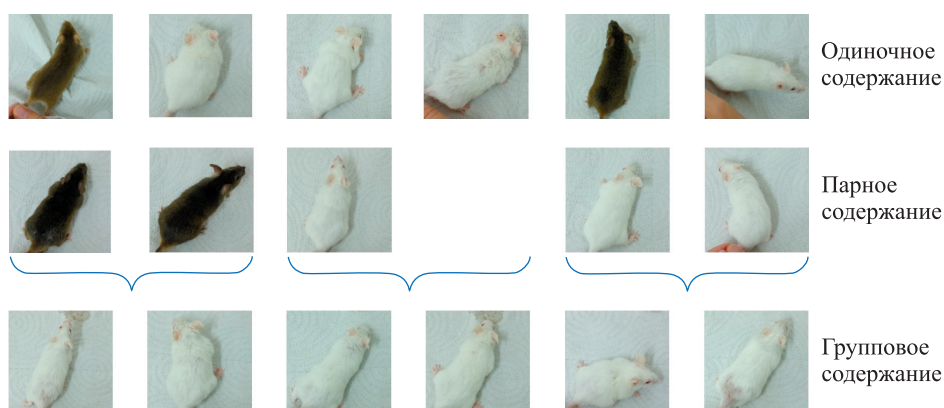


Рис. 3. Состояние кожи мышей на 30-й день эксперимента при одиночном, парном и групповом содержании (фотография одного из самцов парного содержания отсутствует, так как он выбыл из эксперимента до его окончания)
Fig. 3. Skin condition of mice on the 30th day of the experiment for single, pair and group housing (a photograph of one of the males in pair housing is missing, as he dropped out of the experiment before its end)

Поведение в тесте «открытое поле». Мыши, содержащиеся в группе, были наименее подвижными во время теста, хотя разница с животными остальных экспериментальных групп не достигла статистической значимости. Наиболее подвижными оказались мыши, содержащиеся поодиночке. Мыши, содержащиеся попарно, показали промежуточные результаты (рис. 4).

Эмоциональный статус животных оценивался по продолжительности эпизодов неподвижности и груминга. Мыши, содержащиеся в группе, имели тенденцию к более длительному замиранию, чем мыши, содержащиеся поодиночке: разница продолжительности эпизодов неподвижности между этими экспериментальными группами составила 8 (95 % ДИ 2,4–19,6) с. Кроме того, животные, содержащиеся в группе, значительно больше времени тратили на груминг, чем животные, содержащиеся поодиночке: в данном случае разница достигала 17 (99 % ДИ 4,8–101,1) с.

Суммарное время пребывания в центре арены достоверно не различалось у животных разных экспериментальных групп. Поминутный анализ поведения показал, что на 2-й минуте теста содержащиеся поодиночке мыши проводили в центральной части арены на 6,6 (99 % ДИ 0,5–12,3) с больше, чем содержащиеся попарно мыши. Хотя в остальное время и суммарно содержащиеся поодиночке особи находились в центре дольше, чем содержащиеся попарно особи, эти различия больше нигде не достигают статистической значимости.

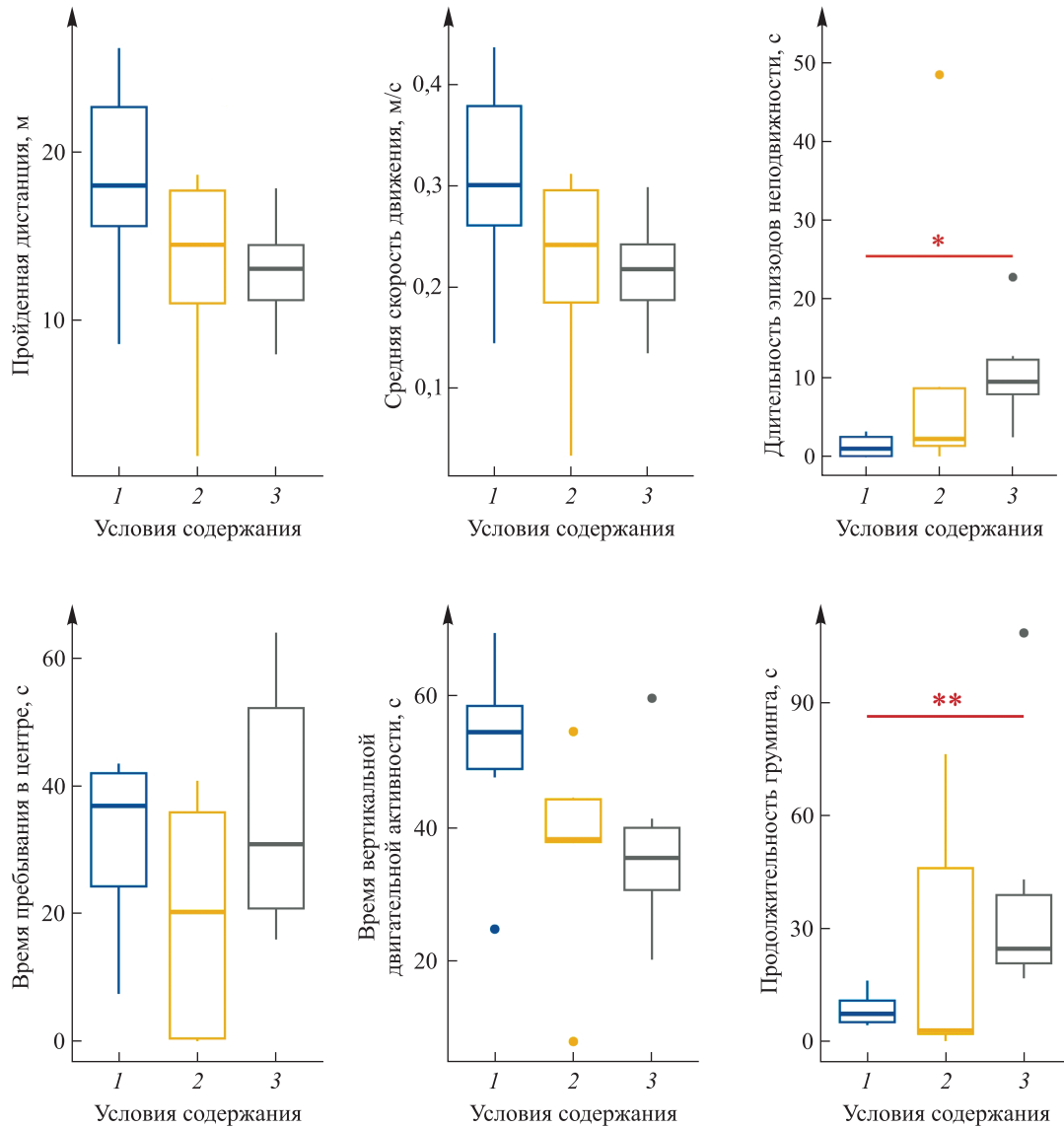


Рис. 4. Поведение мышей в тесте «открытое поле». Условия содержания: 1 – одиночное; 2 – парное; 3 – групповое. Звездочкой обозначена тенденция к различиям ($0,01 < p < 0,05$), двумя звездочками отмечены значимые различия ($p < 0,01$)

Fig. 4. Behaviour of mice in the open field test. Housing conditions: 1 – single; 2 – pair; 3 – group. An asterisk indicates a tendency to significance ($0.01 < p < 0.05$), two asterisks indicate significant differences ($p < 0.01$)

Поведение в тесте «норковая камера». Общий уровень исследовательской активности, о котором можно судить по количеству заглядываний в лунки, достоверно не отличался у мышей при одиночном, парном и групповом содержании (рис. 5). Отмечена тенденция (на уровне значимости менее 0,05, но более 0,01) к снижению эффективности исследовательского поведения у мышей, содержащихся в группе. Об этом свидетельствует более высокое количество необследованных лунок у данных животных (см. рис. 5), разность медиан в экспериментальных группах по указанному показателю составила 4,4 (95 % ДИ 0,0002–8,9000).

Поведение в тесте «подвешивание за хвост». Статистически достоверных различий в поведении мышей разных экспериментальных групп не обнаружено (рис. 6). Медианы основных поведенческих параметров были очень близки, за исключением средней продолжительности эпизода неподвижности: у мышей, содержащихся в группе, эпизоды неподвижности оказались заметно более длительными, чем у мышей, содержащихся поодиночке и попарно (см. рис. 6).

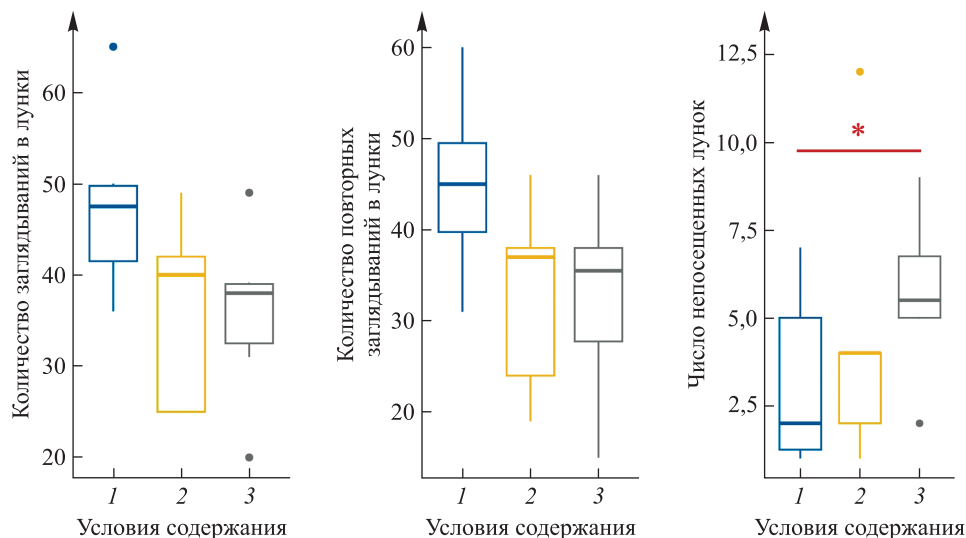


Рис. 5. Поведение мышей в тесте «норковая камера». Условия содержания: 1 – одиночное; 2 – парное; 3 – групповое. Звездочкой обозначена тенденция к различиям ($0,01 < p < 0,05$)

Fig. 5. Behaviour of mice in the hole-board test. Housing conditions: 1 – single; 2 – pair; 3 – group. An asterisk indicates a tendency to significance ($0.01 < p < 0.05$)

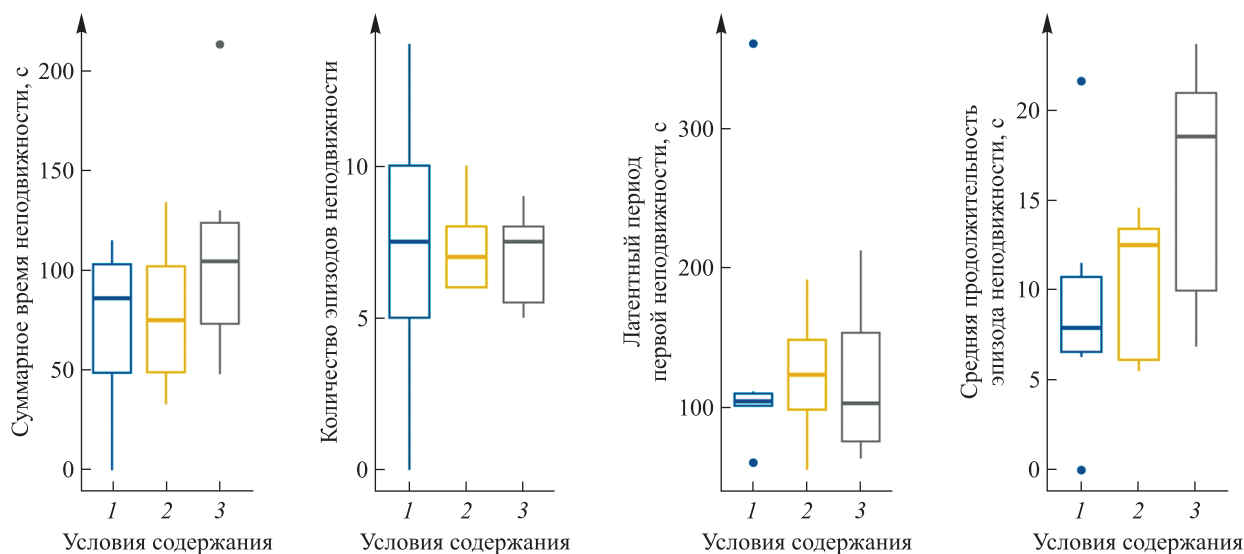


Рис. 6. Поведение мышей в тесте «подвешивание за хвост». Условия содержания: 1 – одиночное; 2 – парное; 3 – групповое

Fig. 6. Behaviour of mice in the tail suspension test. Housing conditions: 1 – single; 2 – pair; 3 – group

Поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Мыши всех экспериментальных групп отдавали предпочтение закрытым рукавам. При исследовании лабиринта все животные не только посещали закрытые рукава чаще, чем открытые (разность медиан составила 7,99 (99 % ДИ 2,99–11,99) раза), но и находились в них на 216 (99 % ДИ 161–255) с дольше (рис. 7).

Тенденция к предпочтению закрытых рукавов лабиринта наиболее выражена у мышей, содержащихся поодиночке: разность медиан (суммарное время пребывания в закрытых и открытых рукавах) составила 255,9 (99 % ДИ 180–300) с (см. рис. 7). Чуть меньше эта тенденция проявляется у мышей, содержащихся попарно: соответствующая разность медиан достигает 232 (99 % ДИ 85–290) с. У мышей, содержащихся в группе, разница между суммарным временем пребывания в закрытых и открытых рукавах составляет всего 162,44 с и не является статистически значимой (99 % ДИ –19...+292) (см. рис. 7).

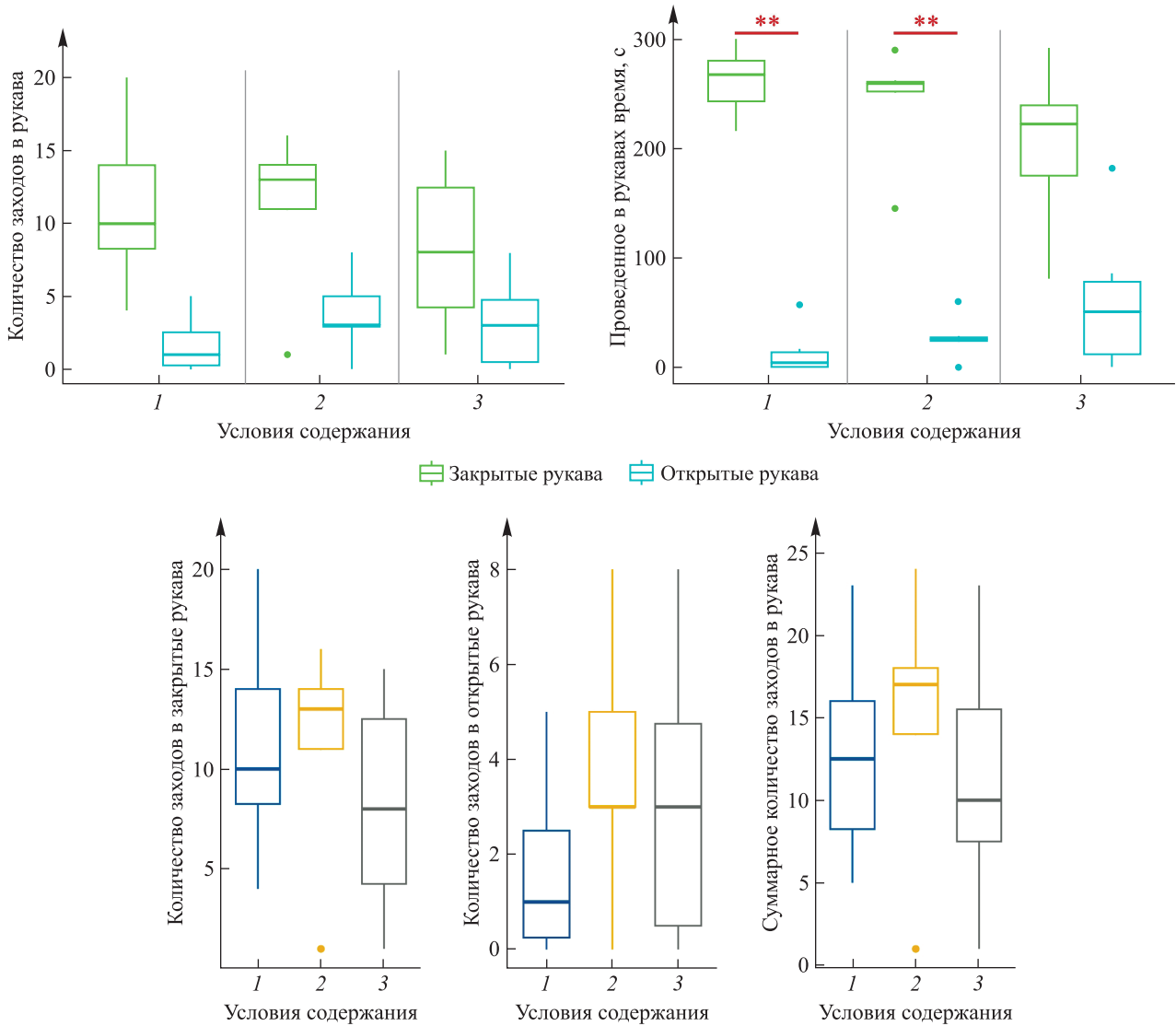


Рис. 7. Поведение мышей в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».
Условия содержания: 1 – одиночное; 2 – парное; 3 – групповое.
Двумя звездочками отмечены значимые различия ($p < 0,01$)

Fig. 7. Behaviour of mice in the elevated X-maze test.
Housing conditions: 1 – single; 2 – pair; 3 – group.
Two asterisks indicate significant differences ($p < 0.01$)

Животные всех экспериментальных групп демонстрируют схожий уровень активности в лабиринте, о чем свидетельствуют близкие значения суммарного количества заходов в рукава (см. рис. 7).

Обсуждение

Изменение массы тела. Хотя у всех животных за время эксперимента масса тела увеличилась, в первые несколько дней у мышей, оказавшихся в клетке по 6 особей, масса тела снижалась. Авторы связывают это с социальным стрессом: первые дни после формирования группы мыши тратят на установление стабильной иерархии доминирования [30].

Повреждения кожи. Мыши, содержащиеся попарно, дрались мало, а полученные до рассадки по клеткам или в первые дни после этого ранки затянулись. Видимо, социальные отношения установились быстро и оставались стабильными в течение 30 дней. Сходная динамика наблюдалась и у мышей, содержащихся в группе: агонистические столкновения между животными, судя по всему, не приводили к серьезным травмам у большинства особей. Лишь одна из мышей имела обширные залысины в нижней части спины, но нельзя с уверенностью утверждать, что это результат укусов других животных, а не чрезмерного груминга.

Что касается мышей, содержащихся поодиночке, то у некоторых из них повреждения кожи сохранились и через 30 дней. Можно предположить, что это следствие чрезмерного аутогруминга, который может быть связан со стрессом от одиночного содержания и являться признаком депрессии [31].

Чтобы избежать агрессивных столкновений между животными, в литературе рекомендуют использовать неагрессивные линии [32], уделять внимание совместимости животных (содержать вместе только знакомых животных, по возможности сиблингов [33], а также группировать мышей до наступления половой зрелости [34]), но рандомизация при формировании экспериментальных групп может привести к тому, что в одной клетке окажутся враждебные друг другу особи.

Помимо предварительного отбора совместимых животных или исключения агрессивных особей, ряд авторов предлагают модифицировать обстановку в клетках содержания. Новые предметы (например, картонные коробки или трубки) [35], гнездовой материал [36] или перегородки [37] структурируют среду и дают животным возможность проявлять более богатый репертуар видоспецифичного поведения (строить гнезда, прятаться в коробках, исследовать предметы и др. [38]), позволяют им избегать постоянного контакта и уклоняться от конфликтов [37]. С другой стороны, по некоторым данным, обогащение среды (*environmental enrichment*) может усиливать территориальную агрессию мышей [39; 40] и провоцировать социальную нестабильность [40].

Поведение в тесте «открытое поле». Установлено, что горизонтальная и вертикальная двигательная активность мышей несколько снижается при переходе от одиночного к парному и от парного к групповому содержанию. Для животных, содержащихся в группе, отмечена достоверно более высокая продолжительность груминга и эпизодов неподвижности.

Известно, что одиночное содержание усиливает исследовательское поведение и вызывает у мышей гиперактивность в условиях новизны (но не в знакомой обстановке) [4]. Вполне возможно, исследовательская мотивация подавляет другое поведение (например, груминг). Мыши, содержащиеся попарно и в группе, находились в более разнообразной среде и поэтому, вероятно, были менее мотивированы изучать новую обстановку. Ресоциализация помогает уменьшить вызванную одиночеством гиперактивность [41] и иные поведенческие и физиологические проявления социальной изоляции [42; 43]. Также известно, что обогащение среды и хендлинг уменьшают (или даже предотвращают [44]) вызванную длительной изоляцией депрессию [45–47]. Несколько противоречивые результаты в оценке двигательной активности можно было бы объяснить тем, что животных регулярно доставали из клеток для взвешивания и фотографирования. Но в таком случае высокая локомоторная активность мышей, содержащихся поодиночке, не обуславливается обедненной средой: манипуляции, хендлинг привносят разнообразие в жизнь животных, поэтому скорее следовало ожидать снижения двигательной активности.

Как правило, груминг в тестовых условиях объясняют привыканием животного к новой обстановке. Обычно при этом животные начинают цепочку действий с самой первой фазы (умывание мордочки) и постепенно переходят на другие части тела [48], но не все исследования это подтверждают. Так, авторы работы [49] в опыте с крысами предположили, что четкая последовательность движений (рострально-каудальная) при груминге проявляется лишь в первые минуты, когда силен стресс новизны, спустя некоторое время груминг становится «неорганизованным» (нешаблонным).

По нашим наблюдениям, некоторые мыши проводили за грумингом значительное время и последовательность действий при этом была рострально-каудальной, но у части животных эпизоды груминга длились всего 1–2 с и включали в себя несколько движений первой фазы, после чего сменялись другой активностью. Таких эпизодов могло быть несколько в течение теста. Авторы склонны считать груминг в первые минуты тестирования смещенной реакцией на стрессовые условия.

В проведенном эксперименте условия содержания мышей не повлияли на время их нахождения в центре арены. Обычно выход в центр и пребывание там считаются показателем тревожности и анализируются при испытаниях анксиолитических препаратов. Хотя медианные значения в разных экспериментальных группах могли существенно отличаться, значимых различий не выявлено, вероятно, из-за большого разброса данных при малом размере выборки.

Поведение в тесте «норковая камера». Активнее всего заглядывали в лунки мыши, содержащиеся поодиночке. С одной стороны, это может говорить о высокой двигательной активности животных, а с другой стороны, указывает на то, что именно они испытывали наибольший стресс при тестировании и стремились сбежать с арены. О высоком уровне стресса содержащихся поодиночке мышей косвенно может свидетельствовать и наибольшее количество повторных заглядываний в одни и те же лунки, т. е. снижение эффективности исследовательского поведения.

Поведение в тесте «подвешивание за хвост». В этом тесте не обнаружено значимых различий ни по одной из метрик, однако отмечено, что больше времени без движения проводили мыши, содержащиеся в группе. Это опровергает наше начальное предположение о том, что длительная социальная изоляция приводит к повышению депрессивности, и не согласуется с выводами авторов работы [6], а также других исследователей, которые наблюдали депрессивное состояние у грызунов-изолянтов (см., например, [45–47]).

В обзоре [50], посвященном моделям социального стресса, отмечено, что в моделях хронического социального стресса (парадигма «резидент – интродер», ежедневная смена самцов в клетках с самками, система открытой норы) животные проявляют пассивное поведение в тесте «подвешивание за хвост» и в тестах на поведенческое отчаяние (*forced swim test, behavioural despair test*). Авторы работы [51] отмечают, что групповое содержание усиливает неподвижность и чувствительность к антидепрессантам у самцов мышей в вышеназванных тестах, и делают вывод об их чувствительности к условиям содержания. Эти же авторы утверждают, что в естественных условиях мыши не стремятся взаимодействовать друг с другом, не делят территорию с половозрелыми самцами, поэтому социальный стресс, в отличие от изоляции, вызывает у них депрессию. В нашем предыдущем исследовании [52], однако, содержащиеся попарно мыши проводили много времени рядом, хотя в клетках было достаточно места, чтобы избегать контакта. В настоящей работе наблюдалось похожее поведение: мыши, содержащиеся попарно, отдыхали рядом, мыши, содержащиеся в клетке шестером, не находились на равном расстоянии друг от друга, а держались вместе и подальше от доминанта. Агрегацию у мышей отмечали в естественных [53] и лабораторных [54] условиях.

Поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Явное предпочтение мышами закрытых рукавов лабиринта вполне ожидаемо. Как правило, мыши избегают открытых пространств, держась поближе к стенкам. Эта особенность поведения заметна и в тестах «открытое поле» (животные гораздо больше времени проводят на периферии, чем в центре) и «норковая камера» (некоторые животные в попытках найти убежище настойчиво пытаются заглядывать в одну и ту же лунку, даже если спрятаться в ней не удастся).

На время нахождения в открытых и закрытых рукавах влияет уровень тревожности животных. Мыши, содержащиеся поодиночке и попарно, явно предпочитали закрытые рукава открытым, в то время как у мышей, содержащихся в группе, это предпочтение хотя и сохранялось, но было выражено в значительно меньшей степени. Кроме того, именно содержащиеся поодиночке животные проводили в открытых рукавах лабиринта меньше всего времени. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей. Так, авторы публикации [55] показали, что групповое содержание, в отличие от одиночного содержания, помогает снизить тревогу, вызванную социальным поражением. Это выражалось в поведении крыс в тесте «крестообразный лабиринт»: содержащиеся поодиночке животные проводили в закрытых рукавах больше времени, чем содержащиеся попарно животные. В работе [56] исследовалось влияние диазепамов на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». После применения препарата одиночно содержащиеся крысы проводили в открытых рукавах больше времени по сравнению с контрольной группой, при этом диазепам не повлиял на крыс группового содержания. Применение пентилентетразола (анксиогенный агент) ожидаемо произвело противоположный эффект, причем для животных, содержащихся в группе, он оказался большим, чем для животных, содержащихся поодиночке. Эксперимент, проведенный в рамках работы [57], также показал, что одиночное содержание усиливает тревожное поведение мышей. В противоположность этому авторы публикации [58] пришли к выводу, что изоляция в течение 1–3 нед. не изменила поведения мышей, хотя и слегка ослабила их тревожность.

Заключение

При одной и той же площади клетки условия содержания мышей (одиночное, парное, групповое) оказывают влияние на некоторые параметры их поведения в стандартных тестах. Мыши, содержащиеся в группе, демонстрировали более продолжительное время груминга и эпизодов замирания в тесте «открытое поле» и наименьшую эффективность исследовательского поведения в тесте «норковая камера». В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» животные, содержащиеся поодиночке и попарно, проводили в закрытых рукавах больше времени, чем в открытых, тогда как у животных, содержащихся в группе, предпочтения закрытых рукавов не выявлено.

В течение 30 дней эксперимента наименьшее количество кожных повреждений отмечено у мышей, содержащихся попарно.

Таким образом, наилучшим способом содержания лабораторных мышей является парное содержание: во-первых, в данном случае животные имеют минимум кожных повреждений, во-вторых, они чаще всего показывают средние результаты в поведенческих тестах.

Библиографические ссылки / References

1. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [Internet]. Strasbourg: Council of Europe; 1991 [cited 2021 January 28]. Available from: <https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/123>.
2. Hubrecht RC, Kirkwood J. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010. 848 p.

3. Jones MA, Mason G, Pillay N. Early social experience influences the development of stereotypic behaviour in captive-born striped mice *Rhabdomys*. *Applied Animal Behaviour Science*. 2010;123(1–2):70–75. DOI: 10.1016/J.APPLANIM.2009.12.009.
4. Sullens DG, Gilley K, Jensen K, Vichaya E, Dolan SL, Sekeres MJ. Social isolation induces hyperactivity and exploration in aged female mice. *PLOS ONE*. 2021;16(2):e0245355. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0245355.
5. Ouchi H, Ono K, Murakami Y, Matsumoto K. Social isolation induces deficit of latent learning performance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Behavioural Brain Research*. 2013;238:146–153. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.10.029.
6. Liu N, Wang Y, An AY, Banker C, Qian Y-H, O'Donnell JM. Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling. *European Journal of Neuroscience*. 2020;52(1):2694–2704. DOI: 10.1111/EJN.14565.
7. Song MK, Lee JH, Kim Y-J. Effect of chronic handling and social isolation on emotion and cognition in adolescent rats. *Physiology & Behavior*. 2021;237:113440. DOI: 10.1016/j.physbeh.2021.113440.
8. Han RT, Kim Y-B, Park E-H, Kim JY, Ryu C, Kim HY, et al. Long-term isolation elicits depression and anxiety-related behaviors by reducing oxytocin-induced GABAergic transmission in central amygdala. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;11:246. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00246.
9. Brenes JC, Fornaguera J, Sequeira-Cordero A. Environmental enrichment and physical exercise attenuate the depressive-like effects induced by social isolation stress in rats. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:804. DOI: 10.3389/fphar.2020.00804.
10. Alshammari TK, Alghamdi H, Alkhader LF, Alqahtani Q, Alrasheed NM, Yacoub H, et al. Analysis of the molecular and behavioral effects of acute social isolation on rats. *Behavioural Brain Research*. 2020;377:112191. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112191.
11. Du Preez A, Law T, Onorato D, Lim YM, Eiben P, Musaelyan K, et al. The type of stress matters: repeated injection and permanent social isolation stress in male mice have a differential effect on anxiety- and depressive-like behaviours, and associated biological alterations: 1. *Translational Psychiatry*. 2020;10(1):1–17. DOI: 10.1038/s41398-020-01000-3.
12. Famitafreshi H, Karimian M. Modulation of catalase, copper and zinc in the hippocampus and the prefrontal cortex in social isolation-induced depression in male rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2019;79(2):184–192. DOI: 10.21307/ane-2019-016.
13. Vöikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes, Brain and Behavior*. 2005;4(4):240–252. DOI: 10.1111/J.1601-183X.2004.00106.X.
14. Åhlgren J, Voikar V. Experiments done in Black-6 mice: what does it mean? *Lab Animal*. 2019;48(6):171–180. DOI: 10.1038/s41684-019-0288-8.
15. Love J, Zelikowsky M. Stress varies along the social density continuum. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2020;14:582985. DOI: 10.3389/fnsys.2020.582985/full.
16. Gururajan A, Reif A, Cryan JF, Slattery DA. The future of rodent models in depression research. *Nature Reviews Neuroscience*. 2019;20(11):686–701. DOI: 10.1038/s41583-019-0221-6.
17. Aparna S, Patri M. Benzo[a]pyrene exposure and overcrowding stress impacts anxiety-like behavior and impairs learning and memory in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology*. 2021;36(3):352–361. DOI: 10.1002/tox.23041.
18. Delaroque C, Chervy M, Gewirtz AT, Chassaing B. Social overcrowding impacts gut microbiota, promoting stress, inflammation, and dysglycemia. *Gut Microbes*. 2021;13(1):2000275. DOI: 10.1080/19490976.2021.2000275.
19. Liu J, Huang S, Li G, Zhao J, Lu W, Zhang Z. High housing density increases stress hormone- or disease-associated fecal microbiota in male Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *Hormones and Behavior*. 2020;126:104838. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2020.104838.
20. Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Falk W, Neumann ID. Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology*. 2006;147(10):4968–4976. DOI: 10.1210/EN.2006-0347.
21. Keenan RJ, Chan J, Donnelly PS, Barnham KJ, Jacobson LH. The social defeat/overcrowding murine psychosocial stress model results in a pharmacologically reversible body weight gain but not depression – related behaviours. *Neurobiology of Stress*. 2018;9:176–187. DOI: 10.1016/J.YNSTR.2018.09.008.
22. Lin E-JD, Sun M, Choi EY, Magee D, Stets CW, During MJ. Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;51:318–330. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2014.10.007.
23. Huang S, Li G, Pan Y, Song M, Zhao J, Wan X, et al. Density-induced social stress alters oxytocin and vasopressin activities in the brain of a small rodent species. *Integrative Zoology*. 2021;16(2):149–159. DOI: 10.1111/1749-4877.12467.
24. Laber K, Veatch LM, Lopez MF, Mulligan JK, Lathers DM. Effects of housing density on weight gain, immune function, behavior, and plasma corticosterone concentrations in BALB/c and C57BL/6 mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2008;47(2):16–23.
25. Lee Y-A, Obara T, Bondonny L, Toniolo A, Miville J, Yamaguchi Y, et al. The effects of housing density on social interactions and their correlations with serotonin in rodents and primates. *Scientific Reports*. 2018;8(1):3497. DOI: 10.1038/s41598-018-21353-6.
26. Whittaker AL, Howarth GS, Hickman DL. Effects of space allocation and housing density on measures of wellbeing in laboratory mice: a review. *Laboratory Animals*. 2012;46(1):3–13. DOI: 10.1258/la.2011.011049.
27. Chambers JM, Cleveland WS, Kleiner B, Tukey PA. *Graphical methods for data analysis*. 1st edition. Belmont: Wadsworth International Group; 1983. 395 p. DOI: 10.1201/9781351072304.
28. Altman DG, Machin D, Bryant TN, Gardner MJ, editors. *Statistics with confidence: confidence intervals and statistical guidelines*. 2nd edition. London: BMJ Books; 2000. 240 p.
29. Nakagawa S. A farewell to Bonferroni: the problems of low statistical power and publication bias. *Behavioral Ecology*. 2004;15(6):1044–1045. DOI: 10.1093/BEHECO/ARH107.
30. Fan Z, Zhu H, Zhou T, Wang S, Wu Y, Hu H. Using the tube test to measure social hierarchy in mice. *Nature Protocols*. 2019;14(3):819–831. DOI: 10.1038/s41596-018-0116-4.
31. Smolinsky AN, Bergner CL, LaPorte JL, Kalueff AV. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. In: Gould TD, editor. *Mood and anxiety related phenotypes in mice*. Totowa: Humana Press; 2009. p. 21–36 (Neuromethods; volume 42). DOI: 10.1007/978-1-60761-303-9_2.
32. Weber EM, Zidar J, Ewaldsson B, Askevik K, Udén E, Svensk E, et al. Aggression in group-housed male mice: a systematic review. *Animals*. 2023;13(1):143. DOI: 10.3390/ani13010143.
33. Bartolomucci A, Palanza P, Parmigiani S. Group housed mice: are they really stressed? *Ethology Ecology & Evolution*. 2010;14(4):341–350. DOI: 10.1080/08927014.2002.9522735.

34. Annas A, Bengtsson C, Törnqvist E. Group housing of male CD1 mice: reflections from toxicity studies. *Laboratory Animals*. 2013;47(2):127–129. DOI: 10.1177/0023677213476278.
35. Ambrose N, Morton DB. The use of cage enrichment to reduce male mouse aggression. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2000;3(2):117–125. DOI: 10.1207/S15327604JAWS0302_4.
36. Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Laboratory Animals*. 1997;31(2):133–143. DOI: 10.1258/002367797780600152.
37. Tallent BR, Law LM, Rowe RK, Lifshitz J. Partial cage division significantly reduces aggressive behavior in male laboratory mice. *Laboratory Animals*. 2018;52(4):384–393. DOI: 10.1177/0023677217753464.
38. Nevison CM, Hurst JL, Barnard CJ. Strain-specific effects of cage enrichment in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Animal Welfare*. 1999;8(4):361–379. DOI: 10.1017/S0962728600021989.
39. Haemisch A, Gärtner K. Effects of cage enrichment on territorial aggression and stress physiology in male laboratory mice. *Acta Physiologica Scandinavica, Supplement*. 1997;640:73–76. PMID: 9401611.
40. Haemisch A, Voss T, Gärtner K. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiology & Behavior*. 1994;56(5):1041–1048. DOI: 10.1016/0031-9384(94)90341-7.
41. Gentsch C, Lichtsteiner M, Frischknecht HR, Feer H, Siegfried B. Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiology & Behavior*. 1988;43(1):13–16. DOI: 10.1016/0031-9384(88)90091-1.
42. Rivera DS, Lindsay CB, Oliva CA, Codocedo JF, Bozinovic F, Inestrosa NC. Effects of long-lasting social isolation and re-socialization on cognitive performance and brain activity: a longitudinal study in *Octodon degus*. *Scientific Reports*. 2020;10(1):18315. DOI: 10.1038/s41598-020-75026-4.
43. Rivera DS, Lindsay CB, Oliva CA, Bozinovic F, Inestrosa NC. «Live together, die alone»: the effect of re-socialization on behavioural performance and social-affective brain-related proteins after a long-term chronic social isolation stress. *Neurobiology of Stress*. 2021;14:100289. DOI: 10.1016/j.ynstr.2020.100289.
44. Stanislavljević A, Perić I, Gass P, Inta D, Lang UE, Borgwardt S, et al. Fluoxetine modulates neuronal activity in stress-related limbic areas of adult rats subjected to the chronic social isolation. *Brain Research Bulletin*. 2020;163:95–108. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.07.021.
45. Filipović D, Novak B, Xiao J, Yan Y, Yeoh K, Turck CW. Chronic fluoxetine treatment of socially isolated rats modulates prefrontal cortex proteome. *Neuroscience*. 2022;501:52–71. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2022.08.011.
46. Garzón J, Del Río J. Hyperactivity induced in rats by long-term isolation: further studies on a new animal model for the detection of antidepressants. *European Journal of Pharmacology*. 1981;74(4):287–294. DOI: 10.1016/0014-2999(81)90047-9.
47. Guarnieri LO, Pereira-Caixeta AR, Medeiros DC, Aquino NSS, Szawka RE, Mendes EMAM, et al. Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. *Translational Psychiatry*. 2020;10(1):33. DOI: 10.1038/s41398-020-0701-5.
48. Rojas-Carvajal M, Fornaguera J, Mora-Gallegos A, Brenes JC. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. *Animal Behaviour*. 2018;137:225–235. DOI: 10.1016/j.anbehav.2018.01.018.
49. Komorowska J, Pellis SM. Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. *Behavioural Processes*. 2004;67(2):287–293. DOI: 10.1016/j.beproc.2004.05.001.
50. Chaouloff F. Social stress models in depression research: what do they tell us? *Cell and Tissue Research*. 2013;354(1):179–190. DOI: 10.1007/s00441-013-1606-x.
51. Karolewicz B, Paul IA. Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. *European Journal of Pharmacology*. 2001;415(2–3):197–201. DOI: 10.1016/S0014-2999(01)00830-5.
52. Avimova KP, Sandakov DB. The influence of the stereotypic forms of activity in mice behaviour in standard behavioural tests. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;3:47–58. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-3-47-58.
53. Lidicker WZ. Social behaviour and density regulation in house mice living in large enclosures. *The Journal of Animal Ecology*. 1976;45(3):677. DOI: 10.2307/3575.
54. Van Loo PLP, de Groot AC, Van Zutphen BFM, Baumans V. Do male mice prefer or avoid each other's company? Influence of hierarchy, kinship, and familiarity. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2010;4(2):91–103. DOI: 10.1207/S15327604JAWS0402_1.
55. Nakayasu T, Ishii K. Effects of pair-housing after social defeat experience on elevated plus-maze behavior in rats. *Behavioural Processes*. 2008;78(3):477–480. DOI: 10.1016/J.BEPROC.2008.02.007.
56. Da Silva NL, Ferreira VMM, De Padua Carobrez A, Morato GS. Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. *Physiology & Behavior*. 1996;60(6):1391–1396. DOI: 10.1016/S0031-9384(96)00254-5.
57. Pasquarelli N, Voehringer P, Henke J, Ferger B. Effect of a change in housing conditions on body weight, behavior and brain neurotransmitters in male C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*. 2017;333:35–42. DOI: 10.1016/J.BBR.2017.06.018.
58. Rodgers RJ, Cole JC. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiology & Behavior*. 1993;54(4):729–736. DOI: 10.1016/0031-9384(93)90084-S.

ДРОЖЖЕВЫЕ ГРИБЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ МИКОПАТОГЕНОВ ВИНОГРАДА

Н. Н. ВОЛЫНЧУК¹⁾, Л. Ф. КАБАШНИКОВА²⁾

¹⁾Полесский государственный университет,
ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Беларусь

²⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Из эписферы и эндосферы различных органов винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) сорта Альфа были выделены 77 штаммов дрожжевых грибов, из которых 6 штаммов после вторичного скрининга проявляли антагонистическое действие по отношению к послеуборочным микопатогенам винограда *Botrytis cinerea* БИМ F-71 и *Fusarium oxysporum* БИМ F-609Г. Средний показатель ингибирования мицелия *B. cinerea* БИМ F-71 аборигенными дрожжевыми биоагентами составил 75,1 %, средний показатель ингибирования мицелия *F. oxysporum* БИМ F-609Г – 65,3 %. Анализ минимальной ингибирующей концентрации показал, что концентрация 10^5 КОЕ/мл достаточна для снижения развития обоих патогенов всеми штаммами дрожжевых грибов. Из исследованных механизмов антагонистического действия дрожжевых грибов присутствовал синтез уреазы, целлюлазы, амилазы и частично протеазы. Выработки летучих органических соединений немиецелиальными грибами в отношении *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г не выявлено.

Ключевые слова: виноград; *Botrytis*; *Fusarium*; дрожжевые грибы; биоконтроль.

YEAST FUNGI AS PROMISING AGENTS FOR BIOCONTROL OF MYCOPATHOGENS IN GRAPES

N. N. VOLYNCHUK^a, L. F. KABASHNIKOVA^b

^aPolessky State University, 23 Dniaprowskaj flacilii Street, Pinsk 225710, Belarus

^bInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: N. N. Volynchuk (volynchuk.n@mail.ru)

From the episphere and endosphere of various organs of cultivated grapes (*Vitis vinifera* L.) variety Alpha, 77 strains of yeast fungi were isolated, of which 6 strains after secondary screening showed antagonistic activity against postharvest mycopathogens of grapes *Botrytis cinerea* BIM F-71 and *Fusarium oxysporum* BIM F-609G. The average rate of

Образец цитирования:

Волынчук НН, Кабашникова ЛФ. Дрожжевые грибы как перспективные агенты биоконтроля микопатогенов винограда. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023; 3:24–33.

EDN: RCUKUM

For citation:

Volynchuk NN, Kabashnikova LF. Yeast fungi as promising agents for biocontrol of mycopathogens in grapes. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:24–33. Russian.

EDN: RCUKUM

Авторы:

Наталья Николаевна Волынчук – аспирантка кафедры биотехнологии биотехнологического факультета. Научный руководитель – Л. Ф. Кабашникова.

Людмила Федоровна Кабашникова – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, доцент; заведующий лабораторией прикладной биофизики и биохимии.

Authors:

Natalia N. Volynchuk, postgraduate student at the department of biotechnology, biotechnological faculty.

volynchuk.n@mail.ru

Ljudmila F. Kabashnikova, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, docent; head of the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

kabashnikova@mail.ru

inhibition of the mycelium of *B. cinerea* BIM F-71 by native yeast bioagents was 75.1 %, the average rate of inhibition of the mycelium of *F. oxysporum* BIM F-609G – 65.3 %. Analysis of the minimum inhibitory concentration showed that the concentration of 10^5 CFU/mL is sufficient to reduce the development of both pathogens by all yeast strains. Of the studied mechanisms of the antagonistic action of yeast fungi, there was a synthesis of urease, cellulase, amylase and partially protease. Production of volatile organic compounds by non-filamentous fungi against *B. cinerea* BIM F-71 and *F. oxysporum* BIM F-609G was not revealed.

Keywords: grapes; *Botrytis*; *Fusarium*; yeast fungi; biocontrol.

Введение

Виноград культурный (*Vitis vinifera* L.) является одной из наиболее распространенных и ценных плодовых культур в мире. Примерно 80 % всей мировой продукции винограда идет на вино, 20 % потребляется в свежем виде и подвергается сушке [1]. Виноградная лоза относится к числу наиболее поражаемых болезнями растений из-за таких особенностей возделывания культуры, как значительные площади массивов насаждений, большое разнообразие сортов, отсутствие плодосмена, возраст растений и др. [2]. Потери урожая в виноградарстве (до 25 % от общего объема производства в промышленно развитых странах и более 50 % в развивающихся странах) связаны с грибными патогенами из родов *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, которые также являются источником микотоксинов. Некротрофный фитопатогенный гриб *B. cinerea* Pers., вызывающий серую гниль и продуцирующий поликетидный микотоксин и ботциновую кислоту, особенно актуален для виноделия [3; 4], поскольку в зависимости от условий развития он может влиять на качество вина как положительно (благородная серая гниль), так и отрицательно. Кроме прямого влияния на состав и качество вина, данный гриб может оказывать и косвенное действие, ведь применяемые против серой гнили фунгициды, частично оставаясь на ягодах винограда до момента их сбора, в дальнейшем могут задерживать спиртовое брожение и отрицательно сказываться на вкусовых качествах вина [5]. В последнее время особую опасность для винограда и других многолетних сельскохозяйственных культур представляют также грибы рода *Fusarium*, установленные в качестве возбудителей усыхания генеративных органов винограда, которые вызывают значительное снижение урожая и даже полную гибель растения. Наиболее распространенными патогенами данного рода на винограде являются *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg и *F. oxysporum* Schltdl. [6; 7]. Для снижения вредоносности фузариоза и серой гнили винограда необходима разработка мер контроля. Отдельно стоит отметить, что технологии контроля должны отвечать требованиям современного адаптивного земледелия, включающего в себя биологический метод.

Дрожжевые грибы, как микроорганизмы с высоким биотехнологическим потенциалом, являются объектами различных научных исследований. За последние 35 лет проводилась обширная исследовательская деятельность по их изучению в качестве экологически чистой альтернативы синтетическим фунгицидам в виноградарстве [8; 9]. Описаны следующие механизмы действия штаммов дрожжевых грибов против микопатогенов: конкуренция за питательные вещества или пространство, истощение запасов железа [8–10], производство внеклеточных литических ферментов и летучих органических соединений (ЛОС) [11], толерантность к активным формам кислорода [8], образование биопленок [11; 12], микопаразитизм [13; 14], индуцирование устойчивости растений путем накопления фитоалексинов и синтеза белков, связанных с патогенезом [15].

Основная цель настоящей работы заключалась в оценке антагонистического потенциала и механизма действия аборигенных дрожжевых грибов винограда культурного сорта Альфа по отношению к двум видам послеуборочных микромицетов – *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609G.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на базе кафедры биотехнологии биотехнологического факультета Полесского государственного университета. Образцы тканей винограда без видимых повреждений и поражений асептически отбирались весной – летом 2022 г. на плантации Пинского винодельческого завода (пос. Садовый, Пинский р-н, Брестская обл.). На площади примерно 70 га произрастают более 70 сортов винограда, однако значительную ее часть (63 га) занимает винный сорт Альфа (табл. 1).

Таблица 1

Важнейшие сорта винограда, произрастающего на плантации
Пинского винодельческого завода

Table 1

The most important varieties of grapes growing
on the plantation of the Pinsk Winery

Сорт	Процент от общей площади	Генетическая формула
Альфа	90,0	50 % <i>V. labruska</i> L. 50 % <i>V. riparia</i> L.
Тажный изумруд	4,3	100 % <i>V. riparia</i> L.
Бианка	1,4	78 % <i>V. vinifera</i> L. 15 % <i>V. rupestris</i> L.
Московский устойчивый	1,4	25 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. amurensis</i> L. 25 % <i>V. labruska</i> L.
Фиолетовый августовский	1,4	75 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. amurensis</i> L.
Кристалл	0,7	53 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. amurensis</i> L.
Маршал Фош	0,7	50 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. riparia</i> L. 25 % <i>V. rupestris</i> L.

Характеристика сорта Альфа. Срок созревания 110–145 дней. Морозоустойчивость до -35°C . Урожайность 150–180 ц/га. Сахаристость 15–18 %. Кислотность 10–13 г/л. Кусты сформированы в виде четырехрукавного горизонтального кордона. Система ведения шпалерная, вертикальная. Расстояние между кустами 1,2 м, ширина междурядья 2,5 м. Покровные культуры состоят из смеси многолетних трав. Виноградник неорошаемый, неукрывной (рис. 1).



Рис. 1. Виноград сорта Альфа: а – гроздь; б – общий вид куста
Fig. 1. Alpha grapes: a – bunch of the grapes; b – general view of the bush

Анализ антагонистической активности *in vitro*. Использовали двойной скрининг антагонистической активности на агаровой среде. Антагонистическую активность изолятов дрожжевых грибов исследовали в отношении двух микопатогенов винограда и других сельскохозяйственных растений – *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Их вирулентность также была подтверждена путем искусственной инокуляции на поврежденном винограде. Культуры микромицетов высевали на картофельно-сахарозную агаризованную (КСА) среду. Чашки Петри инкубировали при температуре 25°C под постоянным белым светом не менее 10 сут. После этого споры собирали в растворе Tween-20 (0,1 об. %). Концентрацию конидиальной суспензии доводили до $6 \cdot 10^6$ спор на 1 мл. При первом скрининге 5 мкл свежей конидиальной суспензии

микопатогена инокулировали в центр чашки Петри со средой КСА (диаметр чашки 90 мм). Затем по 5 мкл свежих культур дрожжевых грибов помещали на расстоянии 2,5 см от центра (6 вариантов на 1 чашку). Далее чашки Петри инкубировали при температуре 25 °С под постоянным белым светом в течение 10 сут. Чистая зона вокруг колоний дрожжевых грибов интерпретировалась как полное подавление роста фитопатогенов. Штаммы, проявляющие ингибирующую активность при первичном скрининге, были отобраны для второго этапа. При вторичном скрининге в чашку Петри добавляли сначала 10 мл среды КСА, затем 5 мл мягкой среды КСА (7 г/л агара) с конечной концентрацией дрожжевых клеток 10⁶ КОЕ/мл. Когда агар застывал, в чашки инокулировали 5 мкл свежей конидиальной суспензии тестируемых грибов. Далее чашки инкубировали при условиях первичного скрининга. После инкубации измеряли площадь грибных патогенов с помощью программы *ImageJ* и рассчитывали процент ингибирования фитопатогена дрожжевыми грибами как разность площади колонии в контрольном и опытном вариантах, деленную на площадь колонии в контроле и умноженную на 100. Эксперименты повторяли трижды для подтверждения воспроизводимости результатов.

Оценка минимальной ингибирующей концентрации. Оценка исходной концентрации дрожжевых клеток, способных ингибировать рост микромицетов, проводили с помощью следующего теста. Свежие культуры дрожжевых грибов, прошедших второй этап селекции, выращивали на среде YEPD при температуре 25 °С в течение 3 сут. Чашки со средой КСА готовили для каждого штамма с различной концентрацией клеток (от 10³ до 10⁶ КОЕ/мл). В центр чашки Петри наносили по 10 мкл конидиальной суспензии (3 · 10⁵ спор на 1 мл) *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г. Планшеты инкубировали при температуре 25 °С и постоянном освещении в течение 7 сут. Результаты считались положительными, когда дрожжи были способны ингибировать общий рост микромицетов на протяжении всего времени инкубации. Проводили контрольные опыты без инокуляции клеток дрожжевых грибов. Эксперимент повторяли трижды.

Исследование механизма действия дрожжей. Чтобы установить причину наблюдаемого ингибирующего эффекта, исследовали ферментативную активность потенциальных штаммов дрожжевых грибов и синтез ЛОС.

Исследование синтеза ЛОС. Для изучения данного механизма использовали трехсекционные чашки Петри, содержащие по 5 мл среды КСА в каждом секторе. В один сектор инокулировали 20 мкл суспензии (10⁶ КОЕ/мл) дрожжевых грибов и инкубировали чашки Петри при температуре 25 °С в течение 3 сут. Затем в остальные два сектора инокулировали по 20 мкл конидиальной суспензии (6 · 10⁶ спор на 1 мл) каждого микопатогена. В качестве контроля использовали чашки без дрожжевых грибов. Чашки Петри дважды оборачивали стерильной пищевой пленкой для предотвращения выхода воздуха и инкубировали при температуре 25 °С под постоянным белым светом в течение 5 сут. Снижение радиального роста по отношению к контрольному тесту рассчитывали через 6 сут. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Определение амилолитической активности. В агар Чапека – Докса добавляли растворимый крахмал с массовой долей 1 %. Далее наносили каждый исследуемый изолят на поверхность плотной среды в чашки Петри, инкубировали при температуре 25 °С в течение 3 сут и для визуализации эффекта покрывали поверхность раствором йода (йод – 5 г, йодид калия – 10 г, дистиллированная вода – 100 мл) [16]. При использовании разводили реактив дистиллированной водой в соотношении 1 : 10.

Определение целлюлозолитической активности. Активность целлюлазы изучали на среде, содержащей 7 г/л КН₂РО₄, 2 г/л К₂НРО₄, 0,1 г/л MgSO₄ · 7H₂O, 1 г/л (NH₄)₂SO₄, 0,6 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л карбоксиметилцеллюлозы и 15–20 г/л агара [17]. Чашки Петри инкубировали при температуре 25 °С в течение 3 сут, затем культуры заливали 5 мл раствора йода и промывали дистиллированной водой для визуализации зоны гидролиза.

Определение протеолитической активности. Протеолитическую активность подтверждали согласно методике, изложенной в работе [18]. Культуры инокулировали в чашки Петри с пептонной средой с добавлением 1 % желатина как источника белка и инкубировали при температуре 25 °С в течение 3 сут.

Определение уреазной активности. Уреазный скрининг проводили по методике, описанной в работе [19], с некоторыми модификациями. Питательную среду Кристенсена (пептон – 1 г/л, глюкоза – 1 г/л, NaCl – 5 г/л, КН₂РО₄ – 2 г/л, феноловый красный – 0,012 г/л, агар – 20 г/л (рН 6,8)) распределяли в микропробирки объемом 1,5 мл и добавляли каплю 20 % раствора мочевины, стерилизованного фильтрованием. Затем штаммы инокулировали и инкубировали при температуре 25 °С в течение 5 сут. Гидролиз мочевины вызывает изменение цвета среды с оранжево-желтого на розовато-красный.

Определение липолитической активности. Продукция липазы была подтверждена после нанесения штамма на среду КСА с добавлением 1 % Tween-20 [18] в качестве липидного субстрата и инкубации при температуре 25 °С в течение 3 сут.

Результаты и их обсуждение

Из эписферы и эндосферы разных органов винограда культурного сорта Альфа были выделены 77 штаммов немикелиальных грибов. Из эндосферы изолированы 15 штаммов. Наибольшее количество эпифитных дрожжевых грибов выделены из корней и штамба (рис. 2).

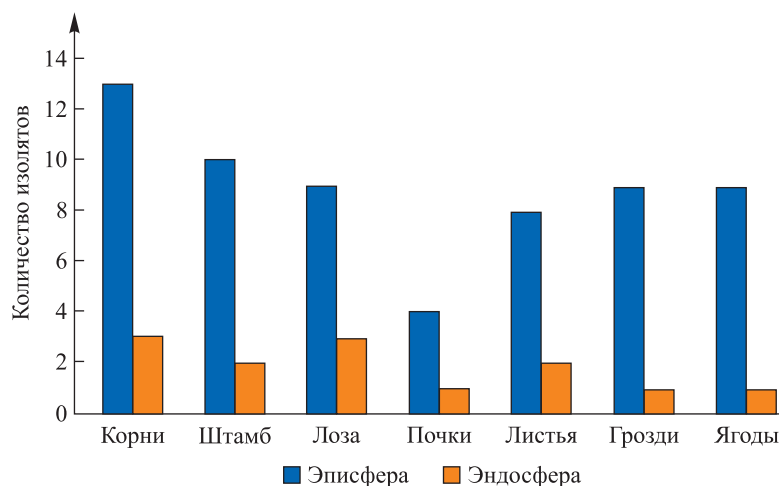


Рис. 2. Количество дрожжевых грибов, выделенных из разных органов *V. vinifera* L.

Fig. 2. The number of yeast fungi isolated from different organs of *V. vinifera* L.

Все изоляты дрожжевых грибов подвергали предварительному анализу *in vitro* для выявления антагонистической активности в отношении *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г. При первичном скрининге 27 из 77 изолятов (35,1 %) показали эффект замедления или ингибирования роста двух протестированных микопатогенов. Из 27 отобранных дрожжей-антагонистов 12 штаммов были выделены из корней и штамба, что составило 15,6 % от общего количества изолятов (табл. 2). Дрожжевые грибы, выделенные из эписферы и эндосферы почек винограда, не демонстрировали антагонистической активности ни к одному исследованному микопатогену. По результатам первичного скрининга 18,2 % от общего количества дрожжевых грибов не ингибировали рост микромицетов вообще, 35,0 % демонстрировали антагонизм лишь к *F. oxysporum* БИМ F-609Г, а 27,3 % – лишь к *B. cinerea* БИМ F-71.

Таблица 2

Антагонистическая активность штаммов дрожжевых грибов
 в отношении *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г на 10-е сутки культивирования

Table 2

Antagonistic activity of yeast fungi strains
 against *B. cinerea* BIM F-71 and *F. oxysporum* BIM F-609G on the 10th days of cultivation

Орган растения	Общее количество изолятов	Количество (доля, %) изолятов с ингибиторной активностью		Процент изолятов с ингибиторной активностью от общего количества изолятов
		Первичный скрининг	Вторичный скрининг	
Корни	16	6 (37,5)	1 (16,6)	6,3
Штамб	12	6 (50,0)	1 (16,6)	8,3
Лоза	12	3 (25,0)	2 (66,6)	16,7
Почки	5	0 (0)	0 (0)	0
Листья	10	4 (40,0)	1 (25,0)	10,0
Грозди	10	4 (40,0)	0 (0)	0
Ягоды	12	4 (33,3)	1 (25,0)	8,3

После вторичного скрининга лишь 6 изолятов (7,8 % от общего количества), выделенных из корней, штамба, лозы, листьев и ягод винограда сорта Альфа, проявляли явное ингибирование роста мицелия обоих микопатогенов. Степень ингибирования варьировала в зависимости от патогена и дрожжевого антагониста. Антагонистическая активность выделенных штаммов дрожжевых грибов против *B. cinerea* БИМ F-71 находилась в диапазоне от 69,9 до 79,1 %, а против *F. oxysporum* БИМ F-609Г – в диапазоне от 52,1 до 71,8 % (табл. 3).

Таблица 3

Процент ингибирования роста *B. cinerea* БИМ F-71
и *F. oxysporum* БИМ F-609Г дрожжевыми грибами, прошедшими вторичный скрининг

Table 3

Percentage of growth inhibition of *B. cinerea* BИM F-71
and *F. oxysporum* BИM F-609G by yeast fungi that passed the secondary screening

Номер штамма	Орган растения	Процент ингибирования роста	
		<i>B. cinerea</i> БИМ F-71	<i>F. oxysporum</i> БИМ F-609Г
17	Листья (эписфера)	77,70 ± 1,22	71,80 ± 2,02
27	Лоза (эндосфера)	73,60 ± 1,10	61,20 ± 1,33
32	Корни (эндосфера)	78,20 ± 2,34	69,60 ± 1,20
36	Штамб (эписфера)	72,20 ± 2,08	70,60 ± 0,82
37	Лоза (эписфера)	79,10 ± 1,46	66,60 ± 0,64
64	Ягоды (эписфера)	69,90 ± 1,28	52,10 ± 1,24

Таким образом, средний показатель ингибирования мицелия *B. cinerea* БИМ F-71 составил 75,1 %, максимальный процент ингибирования его роста демонстрировал штамм № 37. Средний показатель ингибирования мицелия *F. oxysporum* БИМ F-609Г составил 65,3 %, что в 1,4 раза меньше показателя ингибирования серой гнили винограда. Среди исследованных дрожжевых грибов наиболее эффективным против фузариоза оказался штамм № 17. Эпифитный штамм № 64 демонстрировал наименьшие показатели ингибирования грибных возбудителей фузариоза и серой гнили согласно использованной методике анализа.

Оценка минимальной ингибирующей концентрации показала, что из 6 изолятов дрожжевых грибов 2 штамма (№ 37 и 64) значительно замедляли рост гиф *B. cinerea* БИМ F-71 только при концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл, а 4 штамма (№ 17, 27, 32 и 36) – как при концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл, так и при концентрации 10^3 – 10^4 КОЕ/мл в указанных условиях культивирования (табл. 4). Однако рост микомицета *F. oxysporum* БИМ F-609Г при концентрации 10^3 КОЕ/мл был полностью снижен только 1 штаммом (№ 36), а при концентрации 10^4 КОЕ/мл – 2 штаммами (№ 36 и 37). Остальные штаммы (№ 17, 27, 32 и 64) уменьшали рост фитопатогенного гриба *F. oxysporum* БИМ F-609Г лишь при концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл.

Таблица 4

Ингибирование роста *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г
различными концентрациями штаммов дрожжевых грибов на 7-е сутки культивирования

Table 4

Growth inhibition of *B. cinerea* BИM F-71 and *F. oxysporum* BИM F-609G
by various concentrations of yeast fungi strains on the 7th days of cultivation

Номер штамма	Ингибирование роста <i>B. cinerea</i> БИМ F-71 при концентрации				Ингибирование роста <i>F. oxysporum</i> БИМ F-609Г при концентрации			
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^6	10^5	10^4	10^3
17	+	+	+	+	+	+	–	–
27	+	+	+	+	+	+	–	–
32	+	+	+	+	+	+	–	–
36	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	–	–	+	+	+	–
64	+	+	–	–	+	+	–	–

Примечания: 1. Знак «плюс» обозначает способность ингибировать общий рост микопатогена при определенной концентрации, а знак «минус» – неспособность ингибировать общий рост микопатогена при заданной концентрации. 2. Единица измерения концентрации – КОЕ/мл.

Анализ минимальной ингибирующей концентрации, определяемой как самая низкая концентрация дрожжевых грибов, приводящая к полному подавлению роста микромицетов, показал, что концентрация 10^5 КОЕ/мл достаточна для снижения развития *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г всеми штаммами дрожжевых грибов. Это значительно ниже, чем у других дрожжей-антагонистов [13; 20; 21]. Однако необходимы дальнейшие исследования по оценке влияния условий роста на значения минимальной ингибирующей концентрации в полевых условиях.

Поскольку в биоконтролирующую активность дрожжей-антагонистов вовлечено несколько механизмов действия, были исследованы основные из них. Известно, что штаммы видов *Meyerozyma guilliermondii* (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki, *Hanseniopsis clermontiae* Čadež, Poot, Raspor & M. T. Sm., *H. uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff ex M. T. Sm., *Pichia kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev, *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud могут продуцировать β -1,3-глюканазу и хитиназу, активные против *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *Penicillium expansum* Link и *B. cinerea*, особенно когда клеточная стенка плесневых грибов представляет собой единственный источник углерода [17; 20; 22]. Также сообщалось, что механизмы действия дрожжей против *B. cinerea* в основном связаны с ферментативной активностью, конкуренцией за железо или питательные вещества и продуцированием ЛОС. Таким образом, дрожжевые грибы, прошедшие второй этап скрининга, оценивали на наличие или отсутствие ферментативной активности и выработку ЛОС (табл. 5).

Таблица 5

Некоторые механизмы антагонистического действия дрожжевых грибов

Table 5

Some mechanisms of antagonistic action of yeast fungi

Номер штамма	Выработка ЛОС		Ферментативная активность				
	В отношении <i>B. cinerea</i> БИМ F-71	В отношении <i>F. oxysporum</i> БИМ F-609Г	Протеаза	Амилаза	Липаза	Целлюлаза	Уреаза
17	–	–	–	+	–	+	+
27	–	–	–	–	–	+	+
32	–	–	±	+	–	+	+
36	–	–	±	+	–	+	+
37	–	–	±	+	–	+	+
64	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. Знак «плюс» обозначает положительную реакцию, знак «минус» – отрицательную реакцию, а знак «плюс-минус» – слабую реакцию.

Известно, что выработка ЛОС и гидролитических ферментов дрожжевыми грибами может изменить баланс резидентной микробиоты и дестабилизировать микробный состав виноградного суслу. В наших исследованиях штаммы-антагонисты не продуцировали ЛОС в отношении патогенных микромицетов *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г, а штаммы № 32, 36 и 37 демонстрировали очень слабый синтез протеазы при заданных условиях культивирования. Следует отметить, что зона гало (просветления) активных продуцентов целлюлозолитических энзимов составила 11–13 мм. Штамм № 64, входящий в состав микробиома карпосферы *V. vinifera* L. и имеющий отрицательные данные относительно исследованных нами механизмов антагонизма, вероятно, конкурирует с изученными фитопатогенами за питательные вещества и пространство, как доказано и другими учеными [23; 24]. Этот штамм также может быть перспективен в биологизированном растениеводстве, так как имеются данные о том, что штаммы дрожжевых грибов, выделенные из винограда, ингибируют грибы рода *Botrytis* и не конкурируют при этом с *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen, поэтому могут использоваться в качестве перспективных агентов биоконтроля без изменения процессов ферментации [24; 25].

Заключение

Из эписферы и эндосферы разных органов винограда культурного сорта Альфа, произрастающего на плантации Пинского винодельческого завода, были выделены 77 штаммов дрожжевых грибов. По результатам первичного скрининга антагонистическое действие по отношению к *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum*

БИМ F-609Г проявляли 35,1 % от общего количества немикелиальных грибов, по результатам вторичного скрининга – 7,8 %. Средний показатель ингибирования роста мицелия *B. cinerea* БИМ F-71 составил 75,1 %, а *F. oxysporum* БИМ F-609Г – 65,3 %. Анализ минимальной ингибирующей концентрации показал, что концентрация 10^5 КОЕ/мл достаточна для снижения развития обоих патогенов всеми штаммами дрожжевых грибов. Из исследуемых механизмов антагонистического действия присутствовал синтез уреазы, целлюлазы, амилазы и частично протеазы. Все штаммы характеризовались отсутствием выработки ЛОС и липолитических ферментов. Дальнейшее исследование у аборигенных изолятов дрожжевых грибов антагонизма к патогенам винограда будет способствовать выявлению перспективных видов для разработки новых стратегий по предотвращению или сокращению до- и послеуборочных потерь винограда, а также проверке использования отдельных штаммов дрожжей в качестве альтернативы химическим фунгицидам в соответствии с особыми требованиями Международной организации винограда и вина.

Библиографические ссылки

1. Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(1):139–148. DOI: 10.1073/pnas.1317377110.
2. Yurchenko EG, Savchuk NV, Porotikova EV, Vinogradova SV. First report of grapevine (*Vitis* sp.) cluster blight caused by *Fusarium proliferatum* in Russia. *Plant Disease*. 2020;104(3):991. DOI: 10.1094/PDIS-05-19-0938-PDN.
3. Yang Q, Diao J, Solairaj D, Ngea Guillaume Legrand N, Zhang H. Investigating possible mechanisms of *Pichia caribbica* induced with ascorbic acid against postharvest blue mold of apples. *Biological Control*. 2020;141:104129. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104129.
4. Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY, Marvanová L. Recommendations on generic names competing for use in *Leotiomycetes* (Ascomycota). *IMA Fungus*. 2014;5:91–120. DOI: 10.5598/ima fungus.2014.05.01.11.
5. Dalmais B, Schumacher J, Moraga J, Le Pêcheur P, Tudzynski B, Collado IG, et al. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*. 2011;12(6):564–579. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x.
6. Юрченко ЕГ, Савчук НВ, Буровинская МВ. Фузариозное усыхание генеративных органов винограда: особенности патогенеза и вредоносность. *Магарач. Виноградарство и виноделие*. 2020;22(4):344–349.
7. Юрченко ЕГ, Якуба ГВ, Насонов АИ, Савчук НВ, Астапчук ИЛ, Буровинская МВ. Анализ скрининга аборигенных штаммов-антагонистов *Trichoderma* spp. для использования в биотехнологиях контроля новых заболеваний яблони и винограда в Краснодарском крае. *Научные труды СКФНЦСВВ*. 2022;34:158–165. DOI: 10.30679/2587-9847-2022-34-158-165.
8. Jamalizadeh M, Etebarian HR, Aminian H, Alizadeh A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Bulletin OEPP*. 2011;41(1):65–71. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2011.02438.x.
9. Spadaro D, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;47:39–49. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.11.003.
10. Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 2015;47:85–92. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.013.
11. Cordero-Bueso G, Mangieri N, Maghradze D, Foschino R, Valdetara F, Cantoral JM, et al. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2025. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02025.
12. Wisniewski M, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El-Ghaouth A, Stevens C. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G. *Biological control: a global perspective*. [S. l.]: CABI Books; 2007. p. 262–273. DOI: 10.1079/9781845932657.0262.
13. Nally M, Pesce VM, Maturano YP, Muñoz CJ, Combina M, Toro ME. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*. 2012;64(1):40–48. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2011.09.009.
14. Sipiczki M, Pfliegler WP, Holb IJ. *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. *PLOS ONE*. 2013;8(6):e67384. DOI: 10.1371/journal.pone.0067384.
15. Fernandez-San Millan A, Gamir J, Larraya L, Farran I, Veramendi J. Towards understanding of fungal biocontrol mechanisms of different yeasts antagonistic to *Botrytis cinerea* through exometabolomic analysis. *Biological Control*. 2022;174:105033. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105033.
16. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 1975;67(3):597–607. DOI: 10.1080/00275514.1975.12019782.
17. Abe CAL, Faria CB, De Castro FF, De Souza SR, dos Santoset FC, dos Santos FC, et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):15328–15346. DOI: 10.3390/ijms160715328.
18. Hasan S, Ahmad A, Purwar A, Khan N, Kundan R, Gupta G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*. 2013;9(5):238–242. DOI: 10.6026/97320630009238.
19. Seeliger HPR. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *Journal of Bacteriology*. 1956;72(2):127–131. DOI: 10.1128/jb.72.2.127-131.1956.
20. Zhang H, Zheng X, Yu T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*. 2007;18(4):287–291. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.10.007.

21. Galli V, Romboli Y, Barbato D, Mari E, Venturi M, Guerrini S, et al. Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries. *Sustainability*. 2021;13(16):9389. DOI: 10.3390/su13169389.
22. Ruiz-Moyano S, Martin A, Villalobos MC, Calle A, Serradilla MJ, Córdoba MG. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. 2016;57:45–53. DOI: 10.1016/j.fm.2016.01.003.
23. Pinto C, Custodio V, Nunes M, Songy A, Rabenoelina F, Courteaux B, et al. Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3047. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03047.
24. Bozoudi D, Tsaltas D. The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*. 2018;4(4):185–198. DOI: 10.3390/fermentation4040085.
25. Sipiczki M. Overwintering of vineyard yeasts: survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:212. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00212.

References

1. Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(1):139–148. DOI: 10.1073/pnas.1317377110.
2. Yurchenko EG, Savchuk NV, Porotikova EV, Vinogradova SV. First report of grapevine (*Vitis* sp.) cluster blight caused by *Fusarium proliferatum* in Russia. *Plant Disease*. 2020;104(3):991. DOI: 10.1094/PDIS-05-19-0938-PDN.
3. Yang Q, Diao J, Solairaj D, Ngea Guillaume Legrand N, Zhang H. Investigating possible mechanisms of *Pichia caribbica* induced with ascorbic acid against postharvest blue mold of apples. *Biological Control*. 2020;141:104129. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104129.
4. Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY, Marvanová L. Recommendations on generic names competing for use in *Leotiomycetes* (Ascomycota). *IMA Fungus*. 2014;5:91–120. DOI: 10.5598/imafungus.2014.05.01.11.
5. Dalmais B, Schumacher J, Moraga J, Le Pêcheur P, Tudzynski B, Collado IG, et al. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*. 2011;12(6):564–579. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x.
6. Yurchenko EG, Savchuk NV, Burovinskaya MV. Fusarium cluster blight of grapes: features of pathogenesis and harmfulness. *Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie*. 2020;22(4):344–349. Russian.
7. Yurchenko EG, Yakuba GV, Nasonov AI, Savchuk NV, Astapchuk IL, Burovinskaya MV. Screening analysis of native antagonist strains *Trichoderma* spp. for use in biotechnologies for the control of new diseases of apple and grapes in the Krasnodar Region. *Scientific Works of North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making*. 2022;34:158–165. Russian. DOI: 10.30679/2587-9847-2022-34-158-165.
8. Jamalzadeh M, Etebarian HR, Aminian H, Alizadeh A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Bulletin OEPP*. 2011;41(1):65–71. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2011.02438.x.
9. Spadaro D, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;47:39–49. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.11.003.
10. Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 2015;47:85–92. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.013.
11. Cordero-Bueso G, Mangieri N, Maghradze D, Foschino R, Valdetara F, Cantoral JM, et al. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2025. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02025.
12. Wisniewski M, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El-Ghaouth A, Stevens C. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G. *Biological control: a global perspective*. [S. l.]: CABI Books; 2007. p. 262–273. DOI: 10.1079/9781845932657.0262.
13. Nally M, Pesce VM, Maturano YP, Muñoz CJ, Combina M, Toro ME. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*. 2012;64(1):40–48. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2011.09.009.
14. Sipiczki M, Pfliegler WP, Holb IJ. *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. *PLOS ONE*. 2013;8(6):e67384. DOI: 10.1371/journal.pone.0067384.
15. Fernandez-San Millan A, Gamir J, Larraya L, Farran I, Veramendi J. Towards understanding of fungal biocontrol mechanisms of different yeasts antagonistic to *Botrytis cinerea* through exometabolomic analysis. *Biological Control*. 2022;174:105033. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105033.
16. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 1975;67(3):597–607. DOI: 10.1080/00275514.1975.12019782.
17. Abe CAL, Faria CB, De Castro FF, De Souza SR, dos Santos FC, dos Santos FC, et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):15328–15346. DOI: 10.3390/ijms160715328.
18. Hasan S, Ahmad A, Purwar A, Khan N, Kundan R, Gupta G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*. 2013;9(5):238–242. DOI: 10.6026/97320630009238.
19. Seeliger HPR. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *Journal of Bacteriology*. 1956;72(2):127–131. DOI: 10.1128/jb.72.2.127-131.1956.
20. Zhang H, Zheng X, Yu T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*. 2007;18(4):287–291. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.10.007.
21. Galli V, Romboli Y, Barbato D, Mari E, Venturi M, Guerrini S, et al. Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries. *Sustainability*. 2021;13(16):9389. DOI: 10.3390/su13169389.

22. Ruiz-Moyano S, Martin A, Villalobos MC, Calle A, Serradilla MJ, Córdoba MG. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. 2016;57:45–53. DOI: 10.1016/j.fm.2016.01.003.
23. Pinto C, Custodio V, Nunes M, Songy A, Rabenoelina F, Courteaux B, et al. Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3047. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03047.
24. Bozoudi D, Tsaltas D. The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*. 2018;4(4):185–198. DOI: 10.3390/fermentation4040085.
25. Sipiczki M. Overwintering of vineyard yeasts: survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:212. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00212.

Получена 24.08.2023 / исправлена 29.09.2023 / принята 30.09.2023.
Received 24.08.2023 / revised 29.09.2023 / accepted 30.09.2023.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.21+636.93+639.113

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ДИКОЙ И ФЕРМЕРСКОЙ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИСИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*VULPES VULPES*) В БЕЛАРУСИ

А. Е. ГРЕБЕНЧУК¹⁾, А. С. ПАРФЕНОВА²⁾, О. Н. ЛУКАШКОВА¹⁾, И. С. ЦЫБОВСКИЙ³⁾

¹⁾Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь,
ул. Кальварийская, 43, 220073, г. Минск, Беларусь

²⁾Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь,
ул. Филимонова, 25, 220114, г. Минск, Беларусь

³⁾БелЮрОбеспечение, пр. Дзержинского, 16, 220069, г. Минск, Беларусь

Лисица обыкновенная (*Vulpes vulpes*) является охотничьим видом, а также разводится на зверофермах для производства пушнины. Изучено генетическое разнообразие 412 особей (265 биологических образцов рыжей морфы и 147 биологических образцов черно-бурой морфы) лисицы обыкновенной. На основе исследования полиморфизма ДНК разработана панель из 12 STR-локусов и 2 локусов половой принадлежности, которая применима для идентификации биологических образцов особей дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной. Анализ генетической структуры вида с использованием данной тест-системы показал, что исследуемые выборки формируют два генетических кластера, анализ молекулярной дисперсии между выборками выявил достоверные значения генетической дифференциации ($F_{ST} = 0,275$; $p = 0,000$). Проведена оценка уровня генетической интрогрессии между животными, выращенными на зверофермах в Беларуси, и особями местной дикой популяции. Полученные результаты указывают на низкую вероятность генетической интрогрессии и отсутствие угрозы генетической целостности этого вида. Установлено, что 3 локуса (vWF.X, Nuct10 и CPN4) у лисицы обыкновенной являются мономорфными, причем размеры аллелей отличаются от таковых у других псовых, что дает возможность использовать эти локусы при дифференциации представителей семейства псовых и в качестве внутреннего контроля видовой

Образец цитирования:

Гребенчук АЕ, Парфенова АС, Лукашкова ОН, Цыбовский ИС. Характеристика генетической структуры дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*) в Беларуси. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023; 3:34–46.
EDN: UJJAOD

For citation:

Hrebianchuk AE, Parfionava NS, Lukashkova VM, Tsybovsky IS. Characteristics of the genetic structure of wild and farm populations of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:34–46. Russian.
EDN: UJJAOD

Сведения об авторах см. на с. 46.

Information about the authors see p. 46.

принадлежности исследуемых образцов. Разработана методика ДНК-идентификации лисицы обыкновенной, которая успешно применяется в экспертной практике при расследовании фактов незаконной охоты, нападения животных и иных правонарушений в Республике Беларусь.

Ключевые слова: лисица обыкновенная; генетическое разнообразие; микросателлиты; полиморфизм; идентификация; интрогрессия.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь (№ гос. регистрации 2019195). Авторы выражают признательность работникам республиканского государственно-общественного объединения «Белорусское общество охотников и рыболовов» и сотрудникам зверохозяйств Республики Беларусь за помощь в формировании коллекции биологических образцов.

CHARACTERISTICS OF THE GENETIC STRUCTURE OF WILD AND FARM POPULATIONS OF THE RED FOX (*VULPES VULPES*) IN BELARUS

A. E. HREBIANCHUK^a, N. S. PARFIONAVA^b, V. M. LUKASHKOVA^a, I. S. TSYBOVSKY^c

^aState Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus,
43 Kalvaryjskaja Street, Minsk 220073, Belarus

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

^cBelJurZabesjachjenne, 1b Dziarzhynskaga Avenue, Minsk 220069, Belarus

Corresponding author: A. E. Hrebianchuk (iamsanya94@mail.ru)

The red fox (*Vulpes vulpes*) is a hunting species, and is also bred on fur farms for the production of furs. In this work, was evaluated the polymorphism of DNA from the biological material of 412 individuals (265 samples of red morph and 147 samples of silver morph) of the red fox. Based on the study of polymorphism, a panel of 12 STR loci and 2 sex loci was developed, which is applicable for the identification of biological samples of individuals from wild and farm populations of the red fox. Analysis of the genetic structure of the species using this test system showed that two genetic clusters represent the most probable number of populations. No evidence of genetic admixture between farm and wild red foxes was found, analysis of molecular variance between samples revealed significant differentiation values ($F_{ST} = 0.275$; $p = 0.000$). The level of genetic introgression between the animals grown on fur farms in Belarus and the individuals of local wild population was studied. Research results indicate a low likelihood of genetic introgression between farm and wild populations of the red fox and no threat to the genetic integrity of this species. It was established that 3 loci (vWF.X, Nyct10 and CPH4) in DNA of the red fox were monomorphic with allele sizes different from those of other canids, which indicates the possibility of their use in differentiating animals of the Canidae family and as an internal control of the species of the studied samples. The use of the test system is framed in the form of a method for DNA identifying the red fox, which is successfully used in expert practice in investigating the facts of illegal hunting, animal attacks and other cases in the Republic of Belarus.

Keywords: red fox; genetic diversity; microsatellites; polymorphism; identification; introgression.

Acknowledgements. This work was carried out with the financial support of the State Committee on Science and Technology of the Republic of Belarus (state registration No. 2019195). The authors express their gratitude to the employees of the republican state-public association «Belarusian Society of Hunters and Fishermen» and employees of animal farms of the Republic of Belarus for their assistance in forming a collection of biological samples.

Введение

В Беларуси лисица обыкновенная (*Vulpes vulpes*) – широко распространенный и довольно многочисленный вид (его общая численность к началу сезона охоты находится на уровне 25 000–28 000 особей¹). Однако численность лисицы обыкновенной непостоянна, и в среднем раз в 5 лет бывают ее подъемы, что определяется наличием мышевидных грызунов, особенностями погоды и другими причинами [1, р. 132]. Согласно данным Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь за сезон охоты добывается 80–90 % поголовья лисицы обыкновенной в Беларуси². Вместе с тем ежегодный отстрел не приводит к уменьшению численности, поскольку под прессом искусственного сокращения плотности этот вид может компенсировать свои потери за счет увеличения размера выводка [1, р. 134].

¹Отчет о ведении охотничьего хозяйства за 2021 год / М-во лесного хоз-ва Респ. Беларусь. Минск, 2021. 6 с.

²Там же.

В настоящее время лисица обыкновенная принадлежит к видам, которым присвоен охранный статус «вызывающие наименьшее беспокойство» [1, р. 135]. Однако даже устойчивая популяция может терять свою генетическую целостность в случае интрогрессивной гибридизации (включения генов одного вида (подвида, морфы) в генофонд другого вида (подвида, морфы)). Имеется ряд исследований хищных видов млекопитающих, популяции которых находятся под угрозой генетической интрогрессии со стороны одичавших одомашненных животных [2–4]. В Беларуси, несмотря на падение мирового спроса на меховые изделия, по-прежнему функционирует звероводство, в том числе фермерское разведение лисиц, численность которых находится в пределах 500–2500 особей³. И фермерская, и дикая популяции принадлежат к одному и тому же виду, между ними отсутствует репродуктивная изоляция. Угроза генетической целостности популяции лисицы обыкновенной в природе исходит от фермерских лисиц, проникающих в дикие популяции в качестве беглецов. Несмотря на изолированную среду содержания, особи из фермерских популяций вступают в контакт с местными дикими популяциями, потенциально влияя на них. Из-за возможного прессинга животных, разводимых человеком, важно понимать генетическую структуру диких популяций и выявлять потенциальную генетическую интрогрессию [5].

Генетическая интрогрессия между фермерскими и дикими популяциями лисицы обыкновенной становилась объектом нескольких исследований. Учеными из США [6; 7] и Канады [8] показано отсутствие влияния генофонда фермерских лисиц на генетическую целостность диких популяций. Исследователи из Польши [9] пришли к выводу, что на юго-востоке страны между животными фермерских и диких популяций имеет место невысокий уровень интрогрессии, в то время как другие ученые [5] указали на отсутствие угрозы генетической целостности этого вида в Польше.

В Беларуси популяционная генетика лисицы обыкновенной ранее не изучалась. Основная цель настоящего исследования – установить современное состояние генетического и аллельного разнообразия, популяционной структуры вида и степень интрогрессии генофонда фермерских лисиц обыкновенных в дикую популяцию в условиях Беларуси.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования и выделение ДНК. Работа выполнялась на базе Научно-практического центра Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь. Для изучения популяционной структуры рыжей (дикой) морфы и черно-бурой (фермерской) морфы лисицы обыкновенной были исследованы 412 биологических образцов мышечной и хрящевой тканей животных. Образцы от неродственных черно-бурых лисиц (всего 147 образцов, из них 77 образцов принадлежали самцам, 70 образцов – самкам) отобраны на четырех зверофермах, расположенных в Минской, Брестской, Витебской и Могилёвской областях, в то время как места изъятия образцов рыжих лисиц (всего 265 образцов, из них 165 образцов принадлежали самцам, 100 образцов – самкам) равномерно распределены по территории страны. Все образцы получены легально: образцы фермерских лисиц собраны по завершении сельскохозяйственного сезона, а образцы диких лисиц – после плановых отстрелов или гибели животных в результате дорожно-транспортных происшествий.

Выделение ДНК из биоматериала осуществляли по методике, предусматривающей инкубацию образцов в лизирующем буфере с последующей очисткой ДНК на силикагеле [10].

Конструирование тест-системы и генотипирование STR-локусов. Отобранные для исследования локусы были сгруппированы в тест-систему на основе ранее опубликованных характеристик и структур праймеров. Тест-система включала локусы, разработанные для лисицы обыкновенной (1 локус), енотовидной собаки (2 локуса) и собаки домашней (9 локусов), имеющие в своем составе различные типы тандемов: гексануклеотидные (локус vWF.X [11]), тетрануклеотидные (локусы FH2001 [12], FH2010 [13], FH2309 [14], FH2328, FH2361 [15], Pez16 [11]), тринуклеотидные (локусы Nyct10, Nyct11 [16]) и динуклеотидные (локусы CRN4 [17], FH3241 [18], V602 [19]) тандемы. Для определения половой принадлежности использовали локусы, расположенные на X- и Y-хромосомах, – DBX [20] и SRY [21] соответственно. Конечный состав реакционной смеси общим объемом 10 мкл был следующим: 10 ммоль/л трис-HCl (рН 8,6), 25 ммоль/л KCl, 2,1 ммоль/л MgCl₂, 0,2 ммоль/л каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0,2–1,0 мкмоль/л каждой пары праймеров, 0,15 единицы активности ДНК-полимеразы, 1,5 нг/мкл BSA, 0,3 % Triton X-100 и 1–10 нг ДНК. Амплификацию проводили на программируемых термоциклерах C1000 (BioRad, США) по следующей схеме: 1) начальная инкубация (5 мин при 95 °C); 2) 30 циклов, состоящих из денатурации (30 с при 95 °C), отжига праймеров (40 с при 60 °C) и элонгации (1 мин при 72 °C); 3) финальная элонгация (30 мин при 72 °C).

Характерное для каждого из образцов сочетание аллелей выявляли путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в генетическом анализаторе ABI Prizm 3500 (Applied Biosystems, США). Размеры

³Наличие пушных зверей в организациях, занимающихся клеточным разведением пушных зверей, на начало года [Электронный ресурс]. URL: <http://dataportal.belstat.gov.by/Indicators/Preview?key=221065> (дата обращения: 17.03.2023).

выявленных аллелей (в парах нуклеотидов (п. н.)) в исследуемых локусах определяли с использованием внутреннего стандарта размера Orange 500 bp (*NimaGen*, Нидерланды), а также программного пакета *GeneMapper ID-X 1.6*.

Секвенирование аллелей локусов. Для выявления возможных изоаллелей и микровариантов последовательностей, а также для тандемного исчисления аллелей локусов тест-системы, принятого в судебной экспертизе, определяли их первичную структуру путем секвенирования методом Сэнгера [22]. Секвенирование проводили на приборе ABI Prizm 3500 с применением набора для секвенирования BrilliantDye™ Terminator v3.1 (*NimaGen*). Полученные результаты анализировали с помощью пакета программ *Sequencing Analysis 5.4 (Applied Biosystems)*. Сравнительный анализ последовательностей аллелей исследованных локусов ДНК выполняли с использованием ресурсов базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank [23] и программного продукта *BioEdit 7.0.5.3* [24]. Последовательности каждого локуса сконструированной тест-системы, имеющие минимальный и максимальный молекулярный размер аллелей, внесены в базу данных GenBank с присвоением соответствующего номера доступа.

Статистический анализ результатов. Первоначальную проверку массивов генотипов лисицы обыкновенной на наличие нескольких образцов ДНК одного животного осуществляли с помощью функции *Matches* в статистическом макросе *GenAlEx 6.5* [25; 26].

Анализ на репрезентативность выборок проводили с использованием функции *H-individual (GenAlEx 6.5)*. Для установления наличия возможных ошибок в интерпретации генетических профилей у локусов со статтер-фрагментами, а также в случае выпадения аллелей, присутствия нуль-аллелей и артефактов ПЦР проводили анализ с помощью программ *Micro-Checker 2.2.1* [27] и *Cervus 3.0.7* [28].

Основной анализ генетического разнообразия, включавший в себя выявление уровня полиморфизма, расчет частот встречаемости аллелей STR-локусов, значений наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, оценку соответствия равновесию Харди – Вайнберга, проверку на наличие сцепленного наследования аллельных признаков, анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) и анализ значений *F*-статистик Райта, выполняли с использованием программных пакетов *Cervus 3.0.7* и *Arlequin 3.5.1.3* [29].

Определение популяционной структуры проводили с применением алгоритма Монте-Карло по схеме марковских цепей в программе *Structure 2.3.4* [30], используя модель *No admixture model*, с дальнейшим определением истинного количества кластеров методом Эванно [31]. Выбор стартовой точки марковской цепи осуществляли в течение 1 млн итераций, а построение марковской цепи – в течение 2,5 млн итераций для предполагаемого числа групп в выборке (*K*) от 1 до 6 в шестикратной повторности для каждой величины *K*. Для визуализации популяционной структуры проводили многомерный анализ по матрице генетических дистанций (PCoA) в статистическом макросе *GenAlEx 6.5*.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что генетические профили образцов животных из выборки дикой популяции более гетерозиготные, чем генетические профили образцов животных из выборки фермерской популяции (рис. 1).

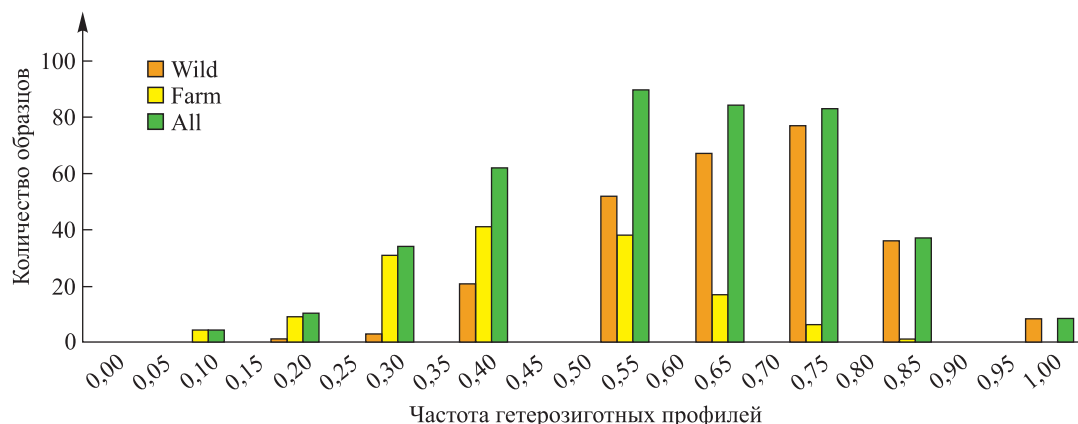


Рис. 1. Распределение частот гетерозиготных профилей в выборках дикой (Wild) и фермерской (Farm) морф и объединенной выборке (All) лисицы обыкновенной, полученное с использованием сконструированной тест-системы

Fig. 1. Frequency distribution of heterozygous profiles in samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs and pooled sample (All) of the red fox, obtained using the designed test system

Медиана частот гетерозиготных профилей для дикой популяции составила 0,667 (среднее значение 0,694), для фермерской – 0,444 (среднее значение 0,469). Наблюдаемый феномен может объясняться существованием панмиксии в дикой популяции и направленной селекционной работой с фермерскими животными.

При статистическом анализе на репрезентативность выборок дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной отмечено, что распределение частот гетерозиготных профилей в исследуемых выборках, равно как и в объединенной выборке, соответствует распределению Гаусса, поскольку подчиняется правилу трех сигм. Оценка сцепленного наследования аллельных признаков локусов тест-системы, проведенная с использованием программного пакета *Arlequin 3.5.1.3*, показала отсутствие сцепленного наследования аллелей.

Таким образом, данные результаты свидетельствуют о том, что выборки животных репрезентативны, а наследование аллелей локусов тест-системы происходит независимо друг от друга.

В ходе проведенного секвенирования аллелей STR-локусов были получены нуклеотидные последовательности всех выявленных аллелей у дикой и фермерской морф лисицы обыкновенной.

Установлено, что локус V602 характеризуется тандемом, состоящим из двух различных динуклеотидных повторов, – (СТ)_n(АС)₁₆, но лишь один из этих повторов – (СТ)_n – является варибельным. Неожиданный результат получен при секвенировании аллелей локуса FH2361. При переносе данного маркера на ДНК лисицы обыкновенной аллели с исходно тетра-нуклеотидным тандемом (AAAG)_n у собаки домашней визуализируются как динуклеотидные и имеют тандемное строение (AG)_n. При анализе нуклеотидной последовательности локуса половой принадлежности DBX, расположенного на X-хромосоме, у лисицы обыкновенной выявлена делеция в 2 п. н. по сравнению с гомологичной последовательностью собаки домашней, волка обыкновенного и енотовидной собаки. В нетандемной части локуса FH2001 у лисицы обыкновенной обнаружены три делетированных участка по сравнению с последовательностями локуса у вида-источника – собаки домашней (рис. 2).

Identity	1	10	20	30	34	37	40	50	60	70	80									
V.v. 7a	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	T---	AAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	----	----
V.v. 8del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT
V.v. 10del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT
V.v. 11del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT
V.v. 12del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT
V.v. 13del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT
V.v. 14del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT
C.l.f.	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT

Identity	90	101	106	110	120	130	133	140	150	157									
V.v. 7a	----	----	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 8del	----	----	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 10del	ATCT	----	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 11del	ATCT	ATCT	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 12del	ATCT	ATCT	ATCT	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 13del	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 14del	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
C.l.f.	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	CAAT	CTAT	TGTA	TCTA	TCTA	TCTA	CCTA	TCTA	TCGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A

Рис. 2. Участок последовательности локуса FH2001 у лисицы обыкновенной (V.v. 7a; V.v. 8del; V.v. 10del; V.v. 11del; V.v. 12del; V.v. 13del; V.v. 14del) и собаки домашней (C.l.f.)

Fig. 2. Sequence of the FH2001 locus of the red fox (V.v. 7a; V.v. 8del; V.v. 10del; V.v. 11del; V.v. 12del; V.v. 13del; V.v. 14del) and the dog (C.l.f.)

Две делеции (см. рис. 2, позиции 101–106 и 130–133) обнаружены во всех идентифицированных аллелях как в выборке дикой популяции, так и в выборке фермерской популяции лисицы обыкновенной. Одна делеция (см. рис. 2, позиция 34–37) выявлена лишь у аллеля с числом тандемных повторов, равным семи. Особо следует отметить, что в пуле всех секвенированных аллелей локуса FH2001 на ДНК лисицы обыкновенной аллель с семью тандемными повторами, но без выявленной делеции не обнаружен, равно как и любые другие аллели без делетированных участков в позициях 101–106 и 130–133. Последнее обстоятельство дает основание полагать, что в локусе FH2001 не будет выявлено размерной гомоплазии и микровариантов последовательностей при проведении идентификационных исследований.

Полученные нуклеотидные последовательности аллелей депонированы в базу данных GenBank (табл. 1), а также идентифицированы в тандемном исчислении в целях унификации панели локусов к различному приборному оборудованию.

Таблица 1

**Структура тандемов микросателлитных локусов
тест-системы и номера доступа
к последовательностям аллелей в базе данных GenBank**

Table 1

**The structure of tandems of microsatellite loci
of the test system and access numbers
to allele sequences in the GenBank database**

Локус	Структура тандема	Номер доступа в базе данных GenBank
CPH4	(CA) ₃	OQ7077940
FH2001	(GATA) _n	OQ7077945, OQ7077947, OQ7077946
FH2010	(AATG) _n	OQ7077950, OQ7077951
FH2309	(GAAA) _n	OQ7077943, OQ7077944
FH2328	(GAAA) _n	OQ7077954, OQ7077955
FH2361	(AG) _n	OQ7077952, OQ7077953
FH3241	(TG) _n	OQ7077958, OQ7077959
Nyct10	(GCT) ₆	OQ7077939
Nyct11	(TGC) _n	OQ7077948, OQ7077949
Pez16	(GAAA) _n	OQ7077956, OQ7077957
V602	(CT) _n (AC) ₁₆	OQ7077941, OQ7077942
vWF.X	(AGGAAT) ₂	OQ7077938
DBX	–	OQ7077960
SRY	–	OQ7077961

Выявленное распределение аллелей указало на возможное наличие нуль-аллелей в 2 локусах – FH2309 (в выборке дикой популяции) и FH2001 (в обеих выборках). Согласно результатам исследования нуль-аллелей STR-локусов и их влияния на оценку популяционной дифференциации нуль-аллели с частотами встречаемости от 5 до 8 % оказывают незначительное влияние на классические оценки популяционной дифференциации, но нуль-аллели с более высокими частотами встречаемости будут смещать данные параметры [32]. Частота встречаемости возможных нуль-аллелей в локусе FH2309 в выборке дикой популяции лисицы обыкновенной составила 6,23 %, в связи с чем результаты его генотипирования привлекли внимание при дальнейшем анализе.

Локус FH2001 характеризовался достаточно высокой частотой вероятных нуль-аллелей: 15,04 % для выборки фермерской популяции и 23,33 % для выборки дикой популяции. Одной из причин наблюдаемого феномена могла быть ошибка в дизайне праймеров в случае, когда нуклеотидная последовательность лисицы обыкновенной отличается от консервативной эталонной последовательности, на основе которой разработаны данные праймеры [33]. Однако использование праймеров нового дизайна, место посадки которых было смещено как в направлении от 5'-конца, так и в направлении от 3'-конца, привело к воспроизведению генотипов всех образцов ДНК гомозиготного профиля в этом локусе в обеих выборках животных, что указывает на отсутствие нуль-аллелей.

Суммарно в объединенной выборке лисицы обыкновенной с применением предложенной тест-системы идентифицированы 103 аллеля (100 аллелей выявлены в выборке дикой популяции и 57 аллелей – в выборке фермерской популяции) (табл. 2).

Установлено, что 3 локуса (vWF.X, Nyct10 и CPH4) у лисицы обыкновенной являются мономорфными с молекулярными размерами аллелей, отличными от таковых у других видов псовых, что дает возможность использовать их в качестве внутреннего контроля видовой принадлежности исследуемых образцов или при дифференциации представителей семейства псовых. Остальные локусы были полиморфными и имели от 3 (локусы FH2309 и Nyct11 в выборке фермерской популяции) и 5 (локус FH2010 в выборке дикой популяции) до 10 (локус V602 в выборке фермерской популяции) и 16 (локус Pez16 в выборке дикой популяции) аллелей на локус. Среднее количество аллелей на локус в выборке дикой популяции составило 11,11, а в выборке фермерской популяции – 6,33 (рис. 3).

Таблица 2

Количество выявленных аллелей в исследованных выборках
 и показатели информативной ценности локусов тест-системы

Table 2

The number of identified alleles in the samples
 and polymorphism information content of the loci of the test system

Локус	Выборка дикой морфы лисицы обыкновенной		Выборка фермерской морфы лисицы обыкновенной	
	N_A	PIC	N_A	PIC
FH2001	13	0,848	5	0,408
FH2010	5	0,563	6	0,456
FH2309	7	0,669	3	0,394
FH2328	11	0,833	8	0,722
FH2361	12	0,757	6	0,190
FH3241	15	0,830	8	0,400
Nyct11	7	0,352	3	0,150
Pez16	16	0,894	8	0,633
V602	14	0,864	10	0,622
Среднее значение	11,11	0,734	6,33	0,442

Примечание. Используемые обозначения: N_A – количество выявленных аллелей в локусе; PIC – показатель информативной ценности локуса.

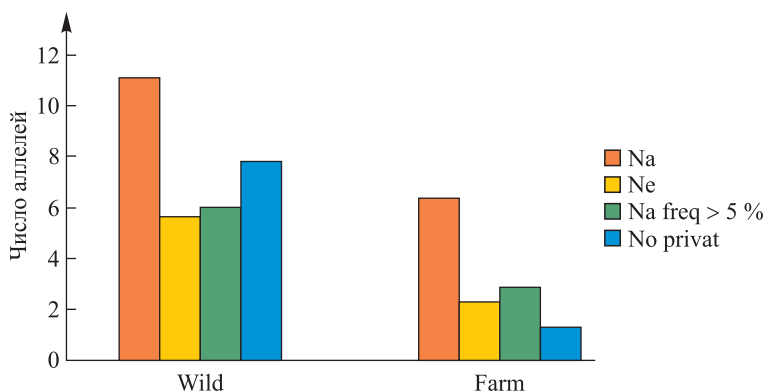


Рис. 3. Характеристика полиморфизма локусов тест-системы в выборках дикой (Wild) и фермерской (Farm) морфы лисицы обыкновенной (Na – среднее число выявленных аллелей; Ne – среднее число эффективных аллелей на локус; Na freq > 5 % – среднее число аллелей с частотой встречаемости более 5 %; No privat – число уникальных для выборки аллелей)

Fig. 3. Characterisation of the polymorphism of the test system loci in samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs of the red fox (Na – average number of identified alleles; Ne – average number of effective alleles per locus; Na freq > 5 % – average number of alleles with a frequency of occurrence of more than 5 %; No privat – the number of alleles unique for the sample)

Более низкое аллельное разнообразие в выборке фермерской морфы может указывать на наличие инбридинга вследствие искусственного отбора и генетического дрейфа, который в ряде случаев приводит к существенному снижению разнообразия [34]. Мутационный процесс противодействует дрейфу, но ввиду жесткой направленности отбора при разведении пушных животных с определенными фенотипическими характеристиками сложно добиться равновесия генетических процессов вследствие элиминации из разведения особей с выявленными мутациями в том или ином признаке. Оптимальные параметры генетического разнообразия аллельных профилей отмечены в выборке дикой морфы, что свидетельствует о естественном развитии и наличии мутационно-дрейфового равновесия в природной популяции.

Согласно работе [35] показатель PIC для высокоинформативного локуса должен превышать 0,5, для достаточно информативного локуса он может быть менее 0,5, но обязательно более 0,25. Для наименее информативного локуса (Nuct11) в выборке дикой популяции лисицы обыкновенной показатель PIC был равен 0,352 (см. табл. 2). Минимальное значение показателя PIC для выборки фермерской популяции выявлено у локуса Nuct11 (0,150). Такое значение обусловлено существованием сильно выраженного мажорного аллеля. Максимальное значение показателя PIC отмечено у локуса Pez16 (0,894) для дикой морфы и у локуса FH2328 (0,722) для фермерской морфы, что объясняется большим количеством выявленных аллелей с относительно равномерным распределением в выборках. Среднее значение показателя PIC для выборок дикой и фермерской морф составило 0,734 и 0,442 соответственно. Таким образом, полученные данные следует считать значимыми для интерпретации результатов и оценки уровня изменчивости.

Для 2 из 9 исследованных полиморфных локусов (FH2309 и FH2010) аллельное распределение в выборке дикой популяции лисицы обыкновенной не соответствовало распределению Харди – Вайнберга ($p < 0,05$). После введения поправки Бонферрони значения p становятся статистически незначимыми только для локуса FH2010 (табл. 3). Локус FH2309 демонстрирует устойчивое отклонение от равновесия Харди – Вайнберга в обеих выборках лисицы обыкновенной.

Таблица 3

Значения показателей гетерозиготности и индексов фиксации локусов тест-системы в выборках дикой и фермерской морф лисицы обыкновенной

Table 3

Values of heterozygosity and fixation indices of test system loci in samples of wild and farm morphs of the red fox

Локус	Выборка дикой морфы лисицы обыкновенной			Выборка фермерской морфы лисицы обыкновенной			F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
	H_O	H_E	p	H_O	H_E	p			
FH2001	0,635	0,765	0,909	0,388	0,522	0,387	0,333	0,404	0,107
FH2010	0,611	0,633	0,007	0,469	0,486	0,875	0,032	0,129	0,101
FH2309	0,608	0,700	0,001	0,510	0,514	0,001	0,077	0,157	0,087
FH2328	0,823	0,851	0,816	0,762	0,760	0,992	0,014	0,083	0,071
FH2361	0,747	0,789	0,671	0,163	0,197	0,380	0,074	0,369	0,318
FH3241	0,849	0,850	0,047	0,401	0,414	0,881	0,009	0,223	0,216
Nuct11	0,351	0,369	0,398	0,163	0,162	0,398	0,029	0,566	0,553
Pez16	0,876	0,904	0,815	0,667	0,686	0,831	0,028	0,104	0,078
V602	0,849	0,877	0,622	0,701	0,661	0,614	-0,010	0,080	0,089
Среднее значение	0,705	0,749	–	0,469	0,489	–	0,065	0,235	0,180

Примечание. Используемые обозначения: H_O – значения наблюдаемой гетерозиготности; H_E – значения ожидаемой гетерозиготности; p – уровень статистической значимости соответствия равновесию Харди – Вайнберга; F_{IS} – индивидуальный индекс фиксации; F_{ST} – субпопуляционный индекс фиксации ($p = 0,000$); F_{IT} – популяционный индекс фиксации.

Индекс F_{IS} для большинства исследованных локусов имел значения, достаточно близкие к нулю, что в совокупности с высокими значениями гетерозиготности может указывать на наличие в популяции панмиксии [34]. Когда популяция испытывает сокращение своего эффективного размера, она обычно развивает избыток гетерозиготности в селективно нейтральных локусах [36]. В выборке дикой популяции лисицы обыкновенной избытка гетерозигот не выявлено, что говорит об отсутствии сокращения эффективной численности, несмотря на высокий уровень элиминации особей в ходе охоты.

Значения индекса F_{IT} у большинства локусов существенно превышают значения индекса F_{IS} . Эти результаты могут свидетельствовать о том, что «управляемая» схема разведения особей в выборке фермерской популяции лисицы обыкновенной является дополнительным фактором, определяющим уровень гетерозиготности объединенной выборки [37, с. 88].

Согласно С. Райту [38, р. 82] значения $F_{ST} \geq 0,25$ указывают на сильную дифференциацию выборок, а значения $0,15 < F_{ST} < 0,25$ – на умеренную дифференциацию. Для локусов FH2001, FH2361 и Nuct11 отмечена значительная дифференцирующая способность дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной. Высокий показатель дифференциации локуса Nuct11 ($F_{ST} = 0,566$) объясняется различными у обеих выборок мажорными аллелями, при этом преобладающий в выборке фермерской популяции аллель (аллель 7) полностью отсутствует в выборке дикой популяции. Локус FH2361 характеризуется

преобладанием одного аллеля (аллель 11) в выборке фермерской популяции, в то время как в выборке дикой популяции выявлено равномерное распределение аллельных признаков обоих локусов (FH2361 и Nuct11). В локусе FH2001 наблюдается схожая ситуация: равномерное распределение аллельных признаков в выборке дикой популяции и наличие двух мажорных аллелей в выборке фермерской популяции, совокупная частота которых превышает 0,970.

В силу того что у гипервариабельных маркеров с большим количеством аллелей значения индекса F_{ST} могут быть существенно ниже, чем у маркеров с малым количеством аллелей, более важным является обнаружение значимой генетической дифференциации дикой и фермерской морф по совокупности отобранных STR-локусов [39, р. 388]. Результаты анализа AMOVA показали, что процент вариаций между выборками дикой и фермерской популяций составил 27,44 %, а внутри выборок – 72,56 % (табл. 4).

Таблица 4

Результаты анализа AMOVA выборок дикой и фермерской морф лисицы обыкновенной с использованием сконструированной тест-системы

Table 4

AMOVA results of samples of wild and farm morphs of the red fox using the designed test system

Показатели	Вариации между выборками	Вариации внутри выборок	Всего
Число степеней свободы	1	822	823
Сумма квадратов	430,109	2452,827	2882,936
Компоненты дисперсии	1,128 76	2,984 52	4,113 28
Процент вариаций	27,44	72,56	–
F_{IS}	0,074 10		–
F_{ST}	0,274 42		–
F_{IT}	0,328 19		–

Компоненты дисперсии между выборками были значимыми для всех используемых локусов, демонстрируя наличие существенной дифференциации дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной. Локусы FH2361, FH3241 и Nuct11 внесли 44,16; 33,21 и 68,88 % изменчивости между изучаемыми выборками соответственно, а локусы FH2328 и Pez16 показали самую низкую вариабельность между дикими и фермерскими лисицами (12,77 и 13,79 % соответственно).

Кластерный анализ, выполненный в программе *Structure*, выявил для совокупного массива генотипов лисицы обыкновенной модальное значение ΔK при $K = 2$, что свидетельствует о существовании двух генетических кластеров в объединенной выборке (рис. 4). При $K = 2$ выборка дикой популяции формирует один кластер, а выборка фермерской популяции – другой кластер. Анализ популяционной структуры выявил достаточно высокие показатели генетической дифференциации исследуемых выборок. Среднее значение коэффициента принадлежности к собственному кластеру составило 0,991 и 0,986 для выборок дикой и фермерской популяций соответственно.

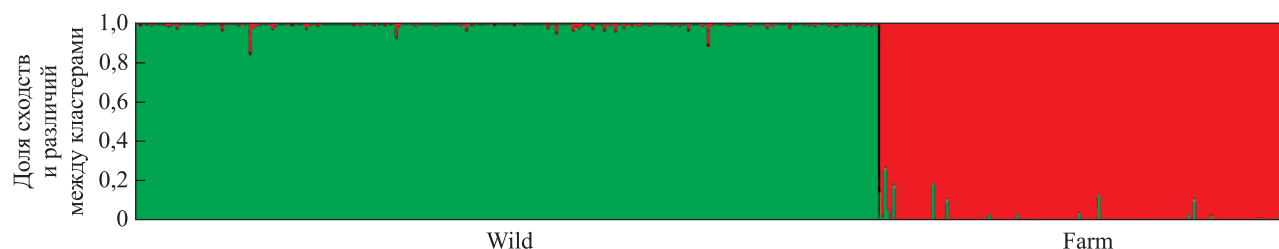


Рис. 4. Результаты кластерного анализа выборок дикой (Wild) и фермерской (Farm) морф лисицы обыкновенной, выполненного в программе *Structure* для наиболее вероятного значения числа исходных генетических кластеров ($K = 2$) (результаты отсортированы по выборкам)

Fig. 4. Results of cluster analysis of samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs of the red fox, performed in the *Structure* programme for the most probable value of the number of clusters ($K = 2$) (results sorted by samples)

Результаты кластерного анализа согласуются с результатами анализа PCoA, который также показывает четкую дифференциацию выборок дикой и фермерской популяций (рис. 5). С использованием предложенных локусов, как и в случае с кластерным анализом в программе *Structure*, отмечаются генетическая гомогенность и высокая консолидированность обеих выборок, что указывает на истинную дифференциацию дикой популяции лисицы обыкновенной и содержащихся на зверофермах животных этого вида.

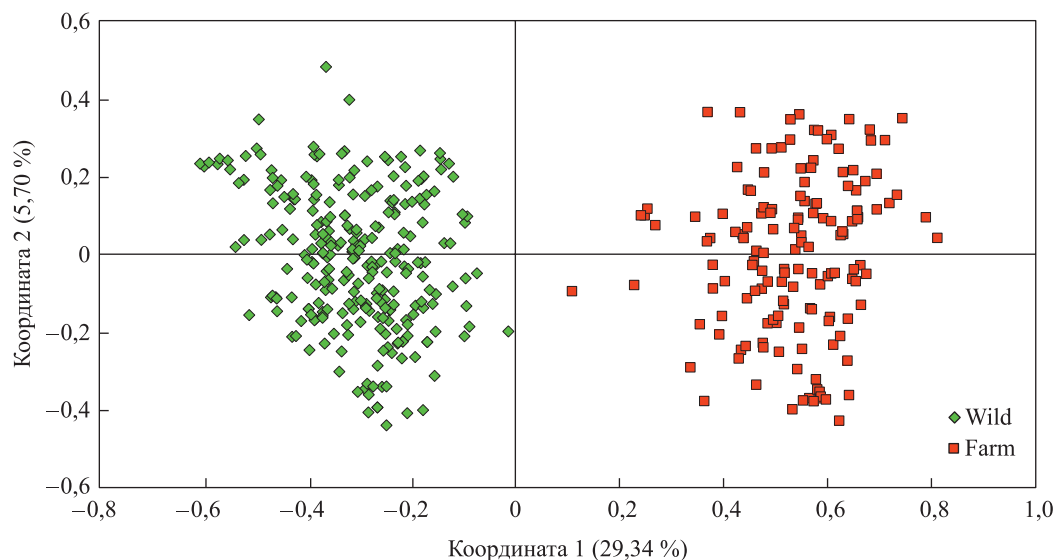


Рис. 5. Диаграмма результатов анализа PCoA на основе матрицы F_{ST} для выборок дикой (Wild) и фермерской (Farm) морф лисицы обыкновенной

Fig. 5. Diagram of the results of PCoA analysis based on the F_{ST} matrix for samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs of the red fox

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии генетической интрогрессии между фермерской и дикой популяциями лисицы обыкновенной в Беларуси.

Заключение

В ходе проведенных экспериментов отобраны 12 STR-локусов и 2 локуса половой принадлежности, которые обладают приемлемыми характеристиками в исследовании ДНК особей лисицы обыкновенной, содержащихся на зверофермах и обитающих в природной популяции. Проведена оценка полиморфизма локусов, а также подтверждены тандемная структура аллелей локусов и отсутствие нуль-аллелей при генотипировании. Отмечено мономорфное проявление 3 локусов с размерами аллелей, отличными от таковых у других видов семейства псовых, что позволяет использовать эти локусы в качестве внутреннего контроля видовой принадлежности исследуемых образцов.

Согласно результатам генетико-статистического анализа массива генотипов образцов лисицы обыкновенной все локусы наследуются независимо и, за исключением 1 локуса, соответствуют равновесию Харди – Вайнберга. Показано, что выборка дикой популяции лисицы обыкновенной представляет собой единый генетический кластер без примеси генов фермерских животных. Это свидетельствует об отсутствии генетической интрогрессии между фермерской и дикой популяциями лисицы обыкновенной в стране.

На основе проведенного исследования разработаны методические материалы по ДНК-идентификации лисицы обыкновенной [40], которые успешно применяются в экспертной практике при расследовании фактов незаконной охоты, нападения животных и других правонарушений в Республике Беларусь.

Библиографические ссылки

1. Sillero-Zubiri C, Hoffman M, Macdonald DW. *Canids: foxes, wolves, jackals, and dogs*. Gland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources; 2004. 430 p.
2. Horecka B. Genetic diversity of ranch and feral American mink (*Neovison vison* Schreber, 1777) in Poland in relation to the natural population of the species. *Belgian Journal of Zoology*. 2019;149:49–61. DOI: 10.26496/bjz.2019.30.

3. Cabria MT, Michaux JR, Gomez-Moliner BJ, Skumatov D, Maran T, Fournier P, et al. Bayesian analysis of hybridization and introgression between the endangered European mink (*Mustela lutreola*) and the polecat (*Mustela putorius*). *Molecular Ecology*. 2011; 20(6):1176–1190. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04988.x.
4. Feulner PGD, Gratten J, Kijas JW, Visscher PM, Pemberton JM, Slate J. Introgression and the fate of domesticated genes in a wild mammal population. *Molecular Ecology*. 2013;22(16):4210–4221. DOI: 10.1111/mec.12378.
5. Wierzbicki H, Zaton-Dobrowolska M, Mucha A, Moska M. Insight into the genetic population structure of wild red foxes in Poland reveals low risk of genetic introgression from escaped farm red foxes. *Genes*. 2021;12(5):637. DOI: 10.3390/genes12050637.
6. Akins JR, Aubry KB, Sacks BN. Genetic integrity, diversity, and population structure of the Cascade red fox. *Conservation Genetics*. 2018;19(4):969–980. DOI: 10.1007/s10592-018-1070-y.
7. Cross PR, Sacks BN, Luikart G, Schwartz MK, Van Etten KW, Crabtree RL. Red fox ancestry and connectivity assessments reveal minimal fur farm introgression in Greater Yellowstone ecosystem. *Journal of Fish and Wildlife Management*. 2018;9(2):519–530. DOI: 10.3996/092017-JFWM-073.
8. Lounsberry ZT, Quinn CB, Statham MJ, Angulo CL, Kalani TJ, Tiller E, et al. Investigating genetic introgression from farmed red foxes into the wild population in Newfoundland, Canada. *Conservation Genetics*. 2017;18(2):383–392. DOI: 10.1007/s10592-016-0914-6.
9. Horecka B, Kasperek K, Jezewska-Witkowska G, Slaska B, Rozempolska-Rucinska I, Gryzinska M, et al. High genetic distinctiveness of wild and farm fox (*Vulpes vulpes* L.) populations in Poland: evidence from mitochondrial DNA analysis. *Turkish Journal of Zoology*. 2017;41(5):783–790. DOI: 10.3906/zoo-1611-16.
10. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):495–503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990.
11. DeNise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S, et al. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel Club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2004;35(1):14–17. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x.
12. Verardi A, Lucchini V, Verardi E. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis: hybridization in Italian wolves and dogs. *Molecular Ecology*. 2006;15(10):2845–2855. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x.
13. Eichmann C, Berger B, Reinhold M, Lutz M, Parson W. Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *International Journal of Legal Medicine*. 2004;118(6):337–342. DOI: 10.1007/s00414-004-0479-7.
14. Lorenzini R, Fanelli R, Grifoni G, Scholl F, Fico R. Wolf – dog crossbreeding: «smelling» a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology*. 2014;79(2):149–156. DOI: 10.1016/j.mambio.2013.07.080.
15. Dayton M, Koskinen MT, Tom BK, Mattila A-M, Johnston E, Halverson J, et al. Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material. *Croatian Medical Journal*. 2009;50(3):268–285. DOI: 10.3325/cmj.2009.50.268.
16. Hong Y, Kim KS, Lee H, Min M-S. Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers. *Genes and Genetic Systems*. 2013;88(1):69–76. DOI: 10.1266/ggs.88.69.
17. Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Randi E. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Science International: Genetics*. 2010;4(5):334–338. DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.10.012.
18. Vilà C, Walker C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, et al. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf – dog hybrids. *Heredity*. 2003;90(1):17–24. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800175.
19. Whiteside HM, Dawson DA, Soulsbury CD, Harris S. Mother knows best: dominant females determine offspring dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*). *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22145. DOI: 10.1371/journal.pone.0022145.
20. Seddon JM. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*. 2005; 6(1):147–149. DOI: 10.1007/s10592-004-7734-9.
21. DeCandia A, Gaughran S, Caragiulo A, Amato G. A novel molecular method for noninvasive sex identification of order Carnivora. *Conservation Genetics Resources*. 2016;8(2):119–121. DOI: 10.1007/s12686-016-0525-z.
22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
23. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(supplement 1): D16–D20. DOI: 10.1093/nar/gkj157.
24. Alzohairy AM. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2011;2(1):60–61.
25. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
26. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
27. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
28. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 2007;16(5):1099–1106. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x.
29. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1:47–50.
30. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2): 945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.
31. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14(8):2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
32. Chapuis M-P, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24(3):621–631. DOI: 10.1093/molbev/msl191.
33. Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(4):999–1005. DOI: 10.1093/nar/18.4.999.

34. Галинская ТВ, Щепетов ДМ, Лысенков СН. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять. *Генетика*. 2019;55(6):617–632. DOI: 10.1134/S0016675819060043.
35. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331. PMID: 6247908.
36. Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 1996;144(4):2001–2014. DOI: 10.1093/genetics/144.4.2001.
37. Кузнецов ВМ. F-статистики Райта: оценка и интерпретация. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2014;4:80–104.
38. Wright S. *Variability within and among natural populations*. Chicago: University Chicago Press; 1978. 590 p. (Evolution and the genetics of populations; volume 4).
39. Hedrick PW. *Genetics of populations*. 4th edition. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2011. 675 p.
40. Гребенчук АЕ, Лукашкова ОН, Парфенова АС, Котова СА, Цыбовский ИС. *Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида лисица обыкновенная (Vulpes vulpes)*. Минск: БелНИИТ «Транстехника»; 2022. 49 с.

References

1. Sillero-Zubiri C, Hoffman M, Macdonald DW. *Canids: foxes, wolves, jackals, and dogs*. Gland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources; 2004. 430 p.
2. Horecka B. Genetic diversity of ranch and feral American mink (*Neovison vison* Schreber, 1777) in Poland in relation to the natural population of the species. *Belgian Journal of Zoology*. 2019;149:49–61. DOI: 10.26496/bjz.2019.30.
3. Cabria MT, Michaux JR, Gomez-Moliner BJ, Skumatov D, Maran T, Fournier P, et al. Bayesian analysis of hybridization and introgression between the endangered European mink (*Mustela lutreola*) and the polecat (*Mustela putorius*). *Molecular Ecology*. 2011;20(6):1176–1190. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04988.x.
4. Feulner PGD, Gratten J, Kijas JW, Visscher PM, Pemberton JM, Slate J. Introgression and the fate of domesticated genes in a wild mammal population. *Molecular Ecology*. 2013;22(16):4210–4221. DOI: 10.1111/mec.12378.
5. Wierzbicki H, Zaton-Dobrowolska M, Mucha A, Moska M. Insight into the genetic population structure of wild red foxes in Poland reveals low risk of genetic introgression from escaped farm red foxes. *Genes*. 2021;12(5):637. DOI: 10.3390/genes12050637.
6. Akins JR, Aubry KB, Sacks BN. Genetic integrity, diversity, and population structure of the Cascade red fox. *Conservation Genetics*. 2018;19(4):969–980. DOI: 10.1007/s10592-018-1070-y.
7. Cross PR, Sacks BN, Luikart G, Schwartz MK, Van Etten KW, Crabtree RL. Red fox ancestry and connectivity assessments reveal minimal fur farm introgression in Greater Yellowstone ecosystem. *Journal of Fish and Wildlife Management*. 2018;9(2):519–530. DOI: 10.3996/092017-JFWM-073.
8. Lounsbury ZT, Quinn CB, Statham MJ, Angulo CL, Kalani TJ, Tiller E, et al. Investigating genetic introgression from farmed red foxes into the wild population in Newfoundland, Canada. *Conservation Genetics*. 2017;18(2):383–392. DOI: 10.1007/s10592-016-0914-6.
9. Horecka B, Kasperek K, Jezewska-Witkowska G, Slaska B, Rozempolska-Rucinska I, Gryzinska M, et al. High genetic distinctiveness of wild and farm fox (*Vulpes vulpes* L.) populations in Poland: evidence from mitochondrial DNA analysis. *Turkish Journal of Zoology*. 2017;41(5):783–790. DOI: 10.3906/zoo-1611-16.
10. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):495–503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990.
11. DeNise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S, et al. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel Club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2004;35(1):14–17. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x.
12. Verardi A, Lucchini V, Verardi E. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis: hybridization in Italian wolves and dogs. *Molecular Ecology*. 2006;15(10):2845–2855. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x.
13. Eichmann C, Berger B, Reinhold M, Lutz M, Parson W. Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *International Journal of Legal Medicine*. 2004;118(6):337–342. DOI: 10.1007/s00414-004-0479-7.
14. Lorenzini R, Fanelli R, Grifoni G, Scholl F, Fico R. Wolf – dog crossbreeding: «smelling» a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology*. 2014;79(2):149–156. DOI: 10.1016/j.mambio.2013.07.080.
15. Dayton M, Koskinen MT, Tom BK, Mattila A-M, Johnston E, Halverson J, et al. Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material. *Croatian Medical Journal*. 2009;50(3):268–285. DOI: 10.3325/cmj.2009.50.268.
16. Hong Y, Kim KS, Lee H, Min M-S. Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers. *Genes and Genetic Systems*. 2013;88(1):69–76. DOI: 10.1266/ggs.88.69.
17. Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Randi E. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Science International: Genetics*. 2010;4(5):334–338. DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.10.012.
18. Vilà C, Walker C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, et al. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf – dog hybrids. *Heredity*. 2003;90(1):17–24. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800175.
19. Whiteside HM, Dawson DA, Soulsbury CD, Harris S. Mother knows best: dominant females determine offspring dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*). *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22145. DOI: 10.1371/journal.pone.0022145.
20. Seddon JM. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*. 2005;6(1):147–149. DOI: 10.1007/s10592-004-7734-9.
21. DeCandia A, Gaughran S, Caragiulo A, Amato G. A novel molecular method for noninvasive sex identification of order Carnivora. *Conservation Genetics Resources*. 2016;8(2):119–121. DOI: 10.1007/s12686-016-0525-z.
22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
23. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(supplement 1):D16–D20. DOI: 10.1093/nar/gkj157.

24. Alzohairy AM. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2011;2(1):60–61.
25. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
26. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
27. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
28. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 2007;16(5):1099–1106. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x.
29. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1:47–50.
30. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.
31. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14(8):2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
32. Chapuis M-P, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24(3):621–631. DOI: 10.1093/molbev/msl191.
33. Kwok S, Kellogg DE, McKimney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(4):999–1005. DOI: 10.1093/nar/18.4.999.
34. Galinskaya TV, Schepetov DM, Lysenkov SN. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Genetika*. 2019;55(6):617–632. Russian. DOI: 10.1134/S0016675819060043.
35. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331. PMID: 6247908.
36. Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 1996;144(4):2001–2014. DOI: 10.1093/genetics/144.4.2001.
37. Kuznetsov VM. Wright's *F*-statistics: estimation and interpretation. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*. 2014;4:80–104. Russian.
38. Wright S. *Variability within and among natural populations*. Chicago: University Chicago Press; 1978. 590 p. (Evolution and the genetics of populations; volume 4).
39. Hedrick PW. *Genetics of populations*. 4th edition. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2011. 675 p.
40. Hrebianchuk AE, Lukashkova VM, Parfionava NS, Kotova SA, Tsybovsky IS. *Metodika DNK-identifikatsii biologicheskikh obraztsov zhivotnykh vida listisa obyknovennaya (Vulpes vulpes)* [Methodology for DNA identification of biological samples of animals of the red fox species (*Vulpes vulpes*)]. Minsk: BelNIIT «Transtekhnika»; 2022. 49 p. Russian.

Получена 25.07.2023 / исправлена 25.09.2023 / принята 28.09.2023.
Received 25.07.2023 / revised 25.09.2023 / accepted 28.09.2023.

Авторы:

Александра Евгеньевна Гребенчук – государственный судебный эксперт отдела исследования и учета объектов животного происхождения и волоконистой природы управления генотипоскопического учета главного управления специальных экспертиз центрального аппарата.

Анастасия Сергеевна Парфенова – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Ольга Николаевна Лукашкова – государственный судебный эксперт отдела судебно-биологических и судебно-генетических экспертиз управления лабораторных исследований вещественных доказательств биологического характера управления Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь по Минской области.

Иосиф Станиславович Цыбовский – кандидат биологических наук; ведущий специалист сектора учебно-методической работы управления кадровой и учебно-методической работы.

Authors:

Aliaksandra E. Hrebianchuk, state forensic expert at the department of research and accounting of objects of animal origin and fibrous nature, directorate of genotyposcopic examination, general directorate of special examination, central office.

iamsanya94@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1224-3275>

Nastassia S. Parfionava, junior researcher at the laboratory of molecular biology research.

anastaciaparfenova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3573-3039>

Volha M. Lukashkova, state forensic expert at the department of forensic biological and forensic genetic examinations, directorate of laboratory research of material evidence of a biological nature, Minsk Region directorate of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus.

122805@tut.by
<https://orcid.org/0000-0002-6628-1349>

Iosif S. Tsybovsky, PhD (biology); leading specialist at the sector of educational and methodical work, directorate of human resources and educational and methodical work.

tsybovsky@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0002-8611-8215>

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 630*165.7:631.532

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РЕГЕНЕРАЦИИ МИКРОРАСТЕНИЙ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ИЗ ВЫСОКОПРОДУКТИВНОЙ ЭМБРИОГЕННОЙ ЛИНИИ

М. П. КУСЕНКОВА¹⁾

¹⁾Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Беларусь

Исследовано влияние органоминерального состава питательных сред, в том числе абсцизовой кислоты в концентрациях 15; 30 и 60 мкмоль/л, при созревании и прорастании эмбриоидов на регенерацию микрорастений в процессе соматического эмбриогенеза. В качестве исходного материала для проведения экспериментов использовалась каллусная ткань высокопродуктивной клеточной линии ели европейской (M2), полученная из семян белорусского происхождения. Среди апробированных вариантов модификаций питательных сред на этапе созревания эмбриоидов выраженный положительный эффект дало применение абсцизовой кислоты в концентрациях 30 и 60 мкмоль/л. Для этапа прорастания эмбриоидов оптимальной является питательная среда Литвея с половинным содержанием макросолей и добавлением активированного угля (5 г/л) и глутамина (0,5 г/л).

Ключевые слова: соматический эмбриогенез; ель европейская; эмбрионные культуры; эмбриоид, регенерант.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б21М-071). Автор выражает признательность сотрудникам научно-исследовательского отдела генетики, селекции и биотехнологии Института леса НАН Беларуси доктору биологических наук, член-корреспонденту НАН Беларуси, профессору В. Е. Падутову, кандидату биологических наук С. И. Ивановской и Д. В. Кулагину за помощь в планировании и организации экспериментальной работы и ценные замечания по тексту статьи.

Образец цитирования:

Кусенкова МП. Оптимизация условий регенерации микро-растений ели европейской из высокопродуктивной эмбрио-генной линии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;3:47–56.
EDN: KOUSRL

For citation:

Kusenкова MP. Optimisation of regeneration conditions of Norway spruce microplants from highly productive embryo-genic line. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3: 47–56. Russian.
EDN: KOUSRL

Автор:

Марина Петровна Кусенкова – научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики, селекции и биотехно-логии.

Author:

Marina P. Kusenкова, researcher at the department of genetics, breeding and biotechnology.
marinaggu@mail.ru



OPTIMISATION OF REGENERATION CONDITIONS OF NORWAY SPRUCE MICROPLANTS FROM HIGHLY PRODUCTIVE EMBRYOGENIC LINE

M. P. KUSENKOVA^a

^aForest Institute, National Academy of Sciences of Belarus,
71 Pralietarskaja Street, Gomel 246050, Belarus

The article presents the results of the study on the influence of nutrient media-composition, including the abscisic acid in different concentrations, on somatic embryo maturation and germination. The callus tissue of Norway spruce highly productive cell line (M2), obtained from seeds of Belarusian origin, was selected as the object of experimental study. Among the tested variants of abscisic acid concentration (15; 30 and 60 $\mu\text{mol/L}$) during somatic embryo maturation stage using the last two gave a pronounced positive effect. It has been showed that Litvay medium with the half-strength macrosalts and the addition of activated charcoal (5 g/L) and glutamine (0.5 g/L) is optimal for the somatic embryo germination stage.

Keywords: somatic embryogenesis; Norway spruce; embryogenic cultures; somatic embryo; regenerant.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B21M-071). The author expresses gratitude to the employees of the department of genetics, breeding and biotechnology, Forest Institute, National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor V. E. Padutov, PhD (biology) S. I. Ivanovskaya and D. V. Kulagin for help in planning and organising of experimental work and valuable comments on the text of the article.

Введение

Соматический эмбриогенез – один из наиболее перспективных методов вегетативного размножения хвойных растений. Его суть заключается в дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по внешнему виду напоминают зиготические зародыши.

К преимуществам метода соматического эмбриогенеза следует отнести высокую скорость клонального размножения, наличие потенциала для автоматизации процесса и создания искусственных семян, а также возможность использования существующих технологий получения сеянцев и саженцев для выращивания посадочного материала из микрорастений [1; 2]. Стоит отметить, что вегетативное потомство, продуцируемое таким способом, полностью воспроизводит наследственные характеристики материнских форм. В связи с этим метод соматического эмбриогенеза может быть использован как для оценки и сохранения хозяйственно ценных генотипов, так и для массового размножения в целях создания плантационных лесных культур или коммерческой реализации посадочного материала декоративных растений [3].

Учитывая сказанное выше, актуальной задачей является разработка и совершенствование технологий соматического эмбриогенеза для экономически значимых древесно-кустарниковых растений. Исходя из литературных данных [4; 5] и собственного опыта [6; 7], в случае с елью европейской (*Picea abies* (L.) H. Karst.) наибольшие затруднения связаны с этапами, на которых растительный материал проходит через критически значимые физиолого-биохимические перестройки, а именно с этапами созревания эмбриоидов внутри клеточной массы и их трансформации в проростки.

Созревание – стадия соматического эмбриогенеза, которая начинается с формирования незрелых соматических зародышей из проэмбриогенных масс и заканчивается дифференциацией у них семядолей, гипокотыля, апикальных меристем побега и корня [8]. Одним из наиболее существенных факторов культивирования, определяющих эффективность этого процесса, являются наличие и концентрация абсцизовой кислоты (АБК) в питательной среде [9]. С одной стороны, названный фитогормон выступает индуктором остановки роста эмбриогенного каллуса и перехода к формированию эмбриоидов. При его низкой концентрации может потребоваться более частое субкультивирование материала [8]. С другой стороны, АБК является ингибитором роста растений, и высокая концентрация данного вещества или длительный контакт с ним эмбриоидов могут отрицательно влиять на прорастание зародышей и дальнейшее развитие регенерантов [10]. В ряде исследований показано, что реакция эмбриогенных тканей хвойных деревьев различных видов на этот фитогормон сильно варьирует [9]. Так, для правильного развития соматических эмбрионов у ели красной (*P. rubens* Sarg.) необходима высокая концентрация

экзогенной АБК (40 мкмоль/л) [11], в то время как для материала ели сизой (*P. glauca* (Moench) Voss) и ели черной (*P. mariana* (Mill.) Britton et al.) достаточно присутствия 12 мкмоль/л этого вещества [12].

Концентрация АБК, используемая в процессе соматического эмбриогенеза у ели европейской, по данным разных авторов, варьирует от 20 до 60 мкмоль/л [8–10; 13; 14]. Такой разброс значений, вероятно, можно объяснить особенностями лабораторной практики, применявшейся в каждом из исследований. Согласно работам [8; 14] эмбриониды, полученные при концентрации АБК на уровне 30 мкмоль/л, имели более высокие скорости прорастания, чем эмбриониды, созревшие при концентрации АБК 60 мкмоль/л. Кроме того, прослеживается следующая тенденция: с увеличением длительности нахождения каллусной ткани на питательной среде с этим фитогормоном замедляется развитие микрорастений на дальнейших этапах соматического эмбриогенеза (прорастание и адаптация к условиям *ex vitro*).

Прорастание – стадия соматического эмбриогенеза, во время которой происходит трансформация эмбрионидов в проростки, а также протекают начальные этапы роста зародышевого побега и корня. По окончании этой стадии микрорастения переносят из асептических условий в почвенные субстраты [15].

Некоторые исследователи отмечают, что важным условием нормального морфологического развития микрорастений хвойных видов в процессе соматического эмбриогенеза является сбалансированный состав источников углерода и азота в питательной среде. В случае с азотом определенную роль также играет используемая *in vitro* химическая форма. Для добавления в питательные среды применяются три вида соединений азота (как по отдельности, так и совместно): соли аммония, нитраты и органические вещества (аминокислоты, гидролизат казеина и др.) [16; 17]. Ряд исследований, выполненных на представителях рода *Picea*, показали, что использование органических веществ может положительно действовать на процессы, протекающие при соматическом эмбриогенезе. Так, применение глутамин повышало частоту инициации эмбриогенных линий и интенсивность мультипликации каллусной ткани, а также способствовало формированию и прорастанию соматических зародышей [18–20]. В работе [16] продемонстрировано, что при добавлении названной аминокислоты в питательные среды она является предпочтительным источником азота во время прорастания соматических зародышей ели европейской и на ее долю приходится до 50 % ассимиляции азота. Исходя из этого, автор предположил, что модификация питательных сред с применением глутамин позволит оптимизировать разрабатываемую методику соматического эмбриогенеза.

Положительный эффект, наблюдаемый при использовании активированного угля для культивирования растений в условиях *in vitro*, большинство исследователей связывают с физико-химическими процессами сорбции и десорбции различных веществ. Названная субстанция способна к нейтрализации токсичных продуктов метаболизма культивируемых тканей (например, некоторых фенольных соединений). Также активированный уголь может постепенно высвобождать вещества, которые способствуют росту (витамины, ионы металлов и фитогормоны, включая АБК и газообразный этилен), и благодаря этому пролонгировать их действие. С учетом вышесказанного можно предположить, что в ходе соматического эмбриогенеза активированный уголь смягчает действие регуляторов роста, а это, в свою очередь, положительно влияет на процессы созревания и прорастания соматических зародышей [21–23].

Таким образом, основной целью данного исследования была оптимизация органоминерального состава питательных сред для применения на этапах созревания эмбрионидов и получения микрорастений ели европейской.

Материалы и методы исследования

В опыте использовались питательные среды на основе прописей Мурасиге – Скуга (*Murashige – Skoog medium*, MS) и Литвея (*Litvay medium*, LM). Содержание источников макро- и микроэлементов, органических веществ в каждой из сред и их модификаций представлено в табл. 1.

Созревание соматических зародышей включало в себя культивирование эмбриогенного каллуса на питательной среде ½ LM (см. табл. 1) без регуляторов роста с добавлением активированного угля (10 г/л) в течение 1 нед., а затем на той же питательной среде с повышенным содержанием сахаразы (34 г/л) и фитогеля (7 г/л) на протяжении последующих 4 нед. В качестве регуляторов роста использовали АБК (15–60 мкмоль/л) и индолилмасляную кислоту (1 мкмоль/л). Культуры поддерживали при температуре 24 °С и круглосуточном освещении интенсивностью 0,2–0,4 клк.

Соматические эмбрионы на семядольной стадии отделяли и помещали для прорастания на питательные среды с половинным содержанием макроэлементов (½ LM, ½ LM – NH₄NO₃ и ½ MS). В части опытных вариантов они были модифицированы добавлением активированного угля (5 г/л) и глутамин (0,5 г/л). Культивирование осуществлялось при температуре 24 °С и круглосуточном освещении интенсивностью 0,5–2,0 клк. Продолжительность этапа составила 4 нед.

Таблица 1

Состав питательных сред для культивирования эмбрионной ткани
 и соматических зародышей ели европейской

Table 1

Composition of nutrient media for cultivation of embryogenic tissue
 and somatic embryos of Norway spruce

Компоненты	Концентрация в среде, мг/л				
	LM	½ LM	½ LM – NH ₄ NO ₃	MS	½ MS
NH ₄ NO ₃	1650	825	0	1650	825
KNO ₃	1900	950	950	1900	950
KH ₂ PO ₄	340	170	170	170	85
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1850	925	925	370	185
CaCl ₂ · 2H ₂ O	22	11	11	440	220
H ₃ BO ₃	31	31	31	6,2	6,2
MnSO ₄ · H ₂ O	21	21	21	16,9	16,9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	43	43	43	10,6	10,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1,25	1,25	1,25	0,25	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,50	0,50	0,50	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,125	0,125	0,125	0,025	0,025
KI	4,15	4,15	4,15	0,83	0,83
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
Мезоинозитол	100	100	100	100	100
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Пиридоксин	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5
Тиамин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Статистическую обработку данных проводили с применением программных продуктов *Microsoft Excel* и *Statistica 10.0*. При представлении результатов в тексте статьи используются среднее значение и стандартное отклонение. Для определения статистической значимости различий между опытными группами были выбраны непараметрические методы анализа (критерий Краскела – Уоллиса для сравнения нескольких независимых серий результатов).

Результаты и их обсуждение

Всего было исследовано 34 опытных варианта. Следует отметить, что все применявшиеся питательные среды и их модификации обеспечили регенерацию микрорастений. Однако в ряде случаев наблюдались различия в интенсивности развития зародышевого побега и корня. Общая схема эксперимента, а также полученные усредненные количественные данные представлены в табл. 2.

Как следует из табл. 2, развитие соматических эмбрионидов наблюдалось во всех опытных вариантах. Главным образом происходил рост надземной части микрорастений, который характеризовался различной интенсивностью. Средние размеры побега после 30 сут прорастания составили от (0,6 ± 0,2) до (2,0 ± 0,4) см. Размеры зародышевого корешка в большинстве случаев изменялись в меньшей степени – от 0,1 до 1,0 см. В связи с этим можно предположить наличие дисбаланса в развитии соматических зародышей, возникновение которого может быть обусловлено, с одной стороны, условиями культивирования, с другой – физиологическим состоянием растительного материала. По этой причине при изучении воздействия факторов, связанных с химическими свойствами субстратов, а также при отборе наиболее подходящих составов питательных сред, помимо характеристик общей ростовой активности, учитывалась согласованность роста побега и корня у микрорастений.

Таблица 2

Морфометрические параметры микрорастений ели европейской, полученных при прорастании соматических зародышей (данные после 30 сут культивирования на питательных средах для прорастания)

Table 2

Morphometric parameters of Norway spruce microplants obtained by germination of somatic embryos (data after 30 days of cultivation on nutrient media for germination)

Опытный вариант	Питательная среда на этапе прорастания	Исходное количество эмбрионов, шт.	Средние размеры hypocotyla, см	Средние размеры корня, см
<i>Концентрация АБК на этапе созревания 15 мкмоль/л</i>				
15-1-1	½ MS	20	0,7 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,1 ^b
15-1-2	½ MS + глутамин	10	0,9 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
15-1-3	½ MS + уголь	20	0,9 ± 0,5 ^b	0,2 ± 0,2 ^b
15-1-4	½ MS + глутамин + уголь	21	1,2 ± 0,4 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-2-1	½ LM	20	1,2 ± 0,4 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-2-2	½ LM + глутамин	17	1,0 ± 0,3 ^{bc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-2-4	½ LM + глутамин + уголь	20	1,1 ± 0,5 ^{bc}	0,6 ± 0,4 ^{cf}
15-3-1	½ LM – NH ₄ NO ₃	40	0,9 ± 0,4 ^b	0,1 ± 0,1 ^a
15-3-2	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин	13	1,2 ± 0,2 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
15-3-3	½ LM – NH ₄ NO ₃ + уголь	32	1,1 ± 0,5 ^{bc}	0,4 ± 0,5 ^{de}
<i>Концентрация АБК на этапе созревания 30 мкмоль/л</i>				
30-1-1	½ MS	20	0,6 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
30-1-2	½ MS + глутамин	10	1,0 ± 0,2 ^{bc}	0,1 ± 0,0 ^a
30-1-3	½ MS + уголь	20	1,1 ± 0,6 ^{bc}	0,4 ± 0,4 ^{de}
30-1-4	½ MS + глутамин + уголь	21	1,3 ± 0,4 ^{cc}	0,5 ± 0,4 ^{de}
30-2-1	½ LM	26	1,0 ± 0,3 ^b	0,2 ± 0,2 ^b
30-2-2	½ LM + глутамин	26	1,1 ± 0,4 ^{cc}	0,3 ± 0,3 ^c
30-2-3	½ LM + уголь	10	1,8 ± 0,5 ^{cf}	1,0 ± 0,5 ^g
30-2-4	½ LM + глутамин + уголь	26	1,5 ± 0,6 ^{cf}	0,8 ± 0,5 ^{fg}
30-3-1	½ LM – NH ₄ NO ₃	37	0,8 ± 0,3 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
30-3-2	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин	20	1,1 ± 0,5 ^{cc}	0,6 ± 0,6 ^{cf}
30-3-3	½ LM – NH ₄ NO ₃ + уголь	21	1,3 ± 0,4 ^{cc}	0,2 ± 0,2 ^b
30-3-4	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин + уголь	19	1,9 ± 0,4 ^{df}	0,7 ± 0,3 ^{cf}
<i>Концентрация АБК на этапе созревания 60 мкмоль/л</i>				
60-1-1	½ MS	20	0,6 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
60-1-2	½ MS + глутамин	9	0,8 ± 0,3 ^b	0,1 ± 0,0 ^b
60-1-3	½ MS + уголь	20	1,7 ± 0,7 ^{df}	0,3 ± 0,3 ^c
60-1-4	½ MS + глутамин + уголь	19	1,4 ± 0,4 ^{cf}	0,3 ± 0,2 ^c
60-2-1	½ LM	30	1,0 ± 0,4 ^{bc}	0,3 ± 0,3 ^c
60-2-2	½ LM + глутамин	25	1,2 ± 0,3 ^{cc}	0,3 ± 0,4 ^c
60-2-3	½ LM + уголь	11	1,7 ± 0,5 ^{df}	0,9 ± 0,9 ^g
60-2-4	½ LM + глутамин + уголь	27	1,6 ± 0,5 ^{df}	0,8 ± 0,5 ^{fg}

Опытный вариант	Питательная среда на этапе прорастания	Исходное количество эмбрионов, шт.	Средние размеры гипокотыля, см	Средние размеры корня, см
60-3-1	½ LM – NH ₄ NO ₃	23	0,8 ± 0,3 ^b	0,2 ± 0,1 ^b
60-3-2	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин	24	1,3 ± 0,3 ^{cc}	0,2 ± 0,1 ^b
60-3-3	½ LM – NH ₄ NO ₃ + уголь	10	1,6 ± 0,4 ^{cf}	0,1 ± 0,0 ^a
60-3-4	½ LM – NH ₄ NO ₃ + глутамин + уголь	11	2,0 ± 0,4 ^d	1,0 ± 1,2 ^g

Примечания: 1. Опытные варианты обозначены как N-K-M, где N – концентрация АБК на этапе созревания (15; 30; 60 мкмоль/л); K – органоминеральный состав питательной среды (1 – среда MS, 2 – среда LM, 3 – среда LM без добавления нитрата аммония); M – добавки в питательную среду (1 – отсутствие добавок, 2 – добавление глутамина, 3 – добавление активированного угля, 4 – добавление глутамина и активированного угля). 2. Буквенные индексы при численных значениях обозначают принадлежность к статистически однородным группам (каждой группе соответствует своя буква). Одинаковые буквенные индексы указывают на отсутствие статистически значимых различий.

В первую очередь было проведено сравнение данных опытных вариантов, различавшихся лишь концентрацией АБК в питательной среде для созревания эмбрионов. Полученные экспериментальные результаты позволяют провести 12 сопоставлений, из которых 10 сопоставлений включают по 3 опытные группы (15; 30; 60 мкмоль/л АБК). В большинстве случаев соответствующие средние размеры побега между экспериментальными группами статистически не отличались. В остальных сопоставлениях имеется тенденция к увеличению названного показателя с ростом концентрации фитогормона (серии опытных вариантов N-1-3, N-2-4 и N-3-3). Описанный тренд в большей степени прослеживается и для морфометрических характеристик корня: более крупные размеры органа имели микрорастения, культивировавшиеся на средах с концентрацией АБК 30 и 60 мкмоль/л. В целом количество индивидов с активно развивающейся подземной частью при указанных концентрациях было в 2,5–3,0 раза больше, чем при концентрации 15 мкмоль/л. Полученные результаты говорят о том, что все использовавшиеся в опыте концентрации АБК подходят для проведения этапа созревания эмбрионов. Однако содержание фитогормона на уровне 30 мкмоль/л является наиболее оптимальным, поскольку при данном его количестве уже наблюдается значительное увеличение доли нормально развивающихся микрорастений при сравнительно небольшом расходе дорогостоящего реактива.

Другой фактор, влияние которого можно оценить, основываясь на полученных экспериментальных данных, – это органоминеральный состав питательных сред. В опыте использовались среды MS и LM с половинной концентрацией макросолей. Один из вариантов выполнялся на среде со сниженным содержанием азота. Согласно литературным данным подобная модификация питательной среды позволяет стимулировать образование и рост корня [4]. Соответствующее сопоставление выполнялось для опытных вариантов, различавшихся лишь составом питательной среды для созревания эмбрионов. Полученные экспериментальные результаты позволяют провести 12 сопоставлений, из которых 10 сопоставлений включают по 3 опытные группы (½ MS, ½ LM и ½ LM – NH₄NO₃). Наименьшими средними морфологическими показателями характеризуется серия вариантов N-1-M (питательная среда ½ MS). Во всех сопоставлениях средние размеры побега в опытных группах, культивировавшихся на средах ½ LM и ½ LM – NH₄NO₃, имеют превышения по абсолютной величине, которые в 55 % случаев статистически значимы. Схожая тенденция наблюдается и для зародышевого корешка. Соответствующие превышения статистически значимы также в 55 % случаев. Сравнение опытных групп, культивировавшихся на питательных средах ½ LM и ½ LM – NH₄NO₃, между собой не выявило существенных различий в среднем размере побега. В то же время в 60 % случаев длина зародышевого корешка вариантов серии N-2-M (питательная среда ½ LM) имеет соответствующие статистически значимые превышения. Следовательно, снижение содержания азота в субстрате посредством удаления из него нитрата аммония не привело к желаемому эффекту (активизация роста корня) в условиях описываемого эксперимента. Таким образом, на основании опытных данных из применявшихся питательных сред для дальнейшего использования был выбран состав ½ LM как обеспечивающий наибольший выход микрорастений со сбалансированным развитием надземных и подземных органов.

Наиболее выраженное положительное влияние на рост и развитие микрорастений ели европейской оказало добавление в питательные среды глутамина и активированного угля. Названные вещества выбраны для использования в эксперименте на основе ряда литературных данных [16–23]. Для оценки влияния соответствующих добавок в питательные среды выполнены 9 сопоставлений опытных вариантов,

отличающихся только по этому фактору (отсутствие добавок, добавление глутамина, добавление активированного угля, добавление глутамина и активированного угля). Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты статистического сопоставления средних величин опытных (добавление глутамина и активированного угля в питательные среды) и контрольных (отсутствие добавок) вариантов

Table 3

Results of statistical comparison of average values of experimental (adding glutamine and activated charcoal to nutrient media) and control (without additives) variants

Состав среды, концентрация в ней АБК	Наличие статистически значимых превышений над средними значениями контрольных вариантов					
	Добавление глутамина		Добавление активированного угля		Добавление глутамина и активированного угля	
	Побег	Корень	Побег	Корень	Побег	Корень
½ MS, 15 мкмоль/л	+	–	+	–	+	–
½ MS, 30 мкмоль/л	+	–	+	+	+	+
½ MS, 60 мкмоль/л	+	–	+	+	+	+
½ LM, 15 мкмоль/л	–	–	Нет данных		–	+
½ LM, 30 мкмоль/л	+	+	+	+	+	+
½ LM, 60 мкмоль/л	–	–	+	+	+	+
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 15 мкмоль/л	+	–	–	+	Нет данных	
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 30 мкмоль/л	+	+	+	–	+	+
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 60 мкмоль/л	+	–	+	–	+	+

Примечание. Знаком «плюс» обозначено наличие статистически значимых превышений над средними значениями контрольных вариантов, а знаком «минус» – их отсутствие.

Из табл. 3 следует, что в большинстве случаев как использование глутамина, так и применение активированного угля стимулировали рост побега микрорастений. Кроме того, добавление активированного угля положительно влияло на развитие зародышевого корешка. Таким образом, указанные вещества могут быть использованы для повышения эффективности прорастания эмбрионов.

Сопоставление опытных групп, в которых добавлялся только глутамин или активированный уголь, между собой (серии вариантов N-K-2 и N-K-3) показало, что полученные во втором случае микрорастения имели несколько большие размеры побега (в 25 % сравнений имеются статистически значимые превышения) и корня (в 25 % сравнений имеются статистически значимые превышения). Для определения эффекта от совместного использования названных веществ был проведен анализ, результаты которого представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты статистического сопоставления средних величин опытных вариантов с совместным и отдельным использованием глутамина и активированного угля

Table 4

Results of statistical comparison of mean values of experimental variants with joint and separate use of glutamine and activated charcoal

Состав среды, концентрация в ней АБК	Наличие статистически значимых различий по отношению к средним значениям опытного варианта, в котором одновременно использовались глутамин и активированный уголь			
	Добавление глутамина		Добавление активированного угля	
	Побег	Корень	Побег	Корень
½ MS, 15 мкмоль/л	+	+	+	–
½ MS, 30 мкмоль/л	–	+	–	–
½ MS, 60 мкмоль/л	+	+	–	–

Состав среды, концентрация в ней АБК	Наличие статистически значимых различий по отношению к средним значениям опытного варианта, в котором одновременно использовались глутамин и активированный уголь			
	Добавление глутамина		Добавление активированного угля	
	Побег	Корень	Побег	Корень
½ LM, 15 мкмоль/л	–	+	Нет данных	
½ LM, 30 мкмоль/л	–	+	–	–
½ LM, 60 мкмоль/л	+	+	–	–
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 15 мкмоль/л	Нет данных		Нет данных	
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 30 мкмоль/л	+	–	+	+
½ LM – NH ₄ NO ₃ , 60 мкмоль/л	+	+	+	+

Примечание. Знаком «плюс» обозначено наличие превышений у варианта с совместным использованием глутамина и активированного угля, а знаком «минус» – отсутствие статистически значимых различий.

Как следует из табл. 4, во всех случаях при совместном использовании глутамина и активированного угля либо наблюдался ростостимулирующий эффект, либо статистически значимые различия отсутствовали. Следовательно, такой вариант применения этих веществ является наиболее предпочтительным для использования в дальнейшем. Схожие результаты описаны в работах [18; 23]. Предполагается, что положительное влияние глутамина связано с тем, что он оптимизирует азотное питание прорастающего эмбриоида. По-видимому, ростостимулирующий эффект активированного угля более выражен. Исходя из литературных данных [23], можно предположить, что подобное действие данного вещества связано с влиянием ряда факторов, таких как оптимизация осмотического питания микрорастений и адсорбция выделяющихся токсичных продуктов метаболизма проростков.

Заключение

Изучено влияние АБК в концентрациях 15; 30 и 60 мкмоль/л при созревании эмбриоидов и состава питательных сред при их прорастании на формирование полноценных микрорастений.

Установлено, что оптимальная концентрация АБК в питательной среде при созревании эмбриоидов составляет 30 мкмоль/л. При данном количестве фитогормона наблюдается значительное увеличение доли нормально развивающихся микрорастений при сравнительно небольшом расходе дорогостоящего реактива.

Исследование процессов прорастания соматических эмбриоидов ели европейской на различных питательных средах показало, что все использовавшиеся в опыте варианты подходят для проведения данного этапа. Однако наиболее оптимальной является питательная среда ½ LM с добавлением активированного угля (5 г/л) и глутамина (0,5 г/л).

Библиографические ссылки

1. Egertsdotter U. Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2019;34(5):360–369. DOI: 10.1080/02827581.2018.1441433.
2. Park YS. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science*. 2002;59(5–6):651–656. DOI: 10.1051/forest:2002051.
3. Fraga HPDF, Moraes PEC, Vieira LDN, Guerra MP. Somatic embryogenesis in conifers: one clade to rule them all? *Plants*. 2023; 12(14):2648. DOI: 10.3390/plants12142648.
4. Tikkinen M, Varis S, Peltola H, Aronen T. Improved germination conditions for Norway spruce somatic cotyledonary embryos increased survival and height growth of emblings. *Trees*. 2018;32:1489–1504. DOI: 10.1007/s00468-018-1728-6.
5. Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak MK, Kijowska-Oberc J, Staszak AM, Ratajczak E. Somatic embryogenesis of Norway spruce and Scots pine: possibility of application in modern forestry. *Forests*. 2022;13(2):155. DOI: 10.3390/f13020155.
6. Кусенкова МП. Прорастание соматических эмбриоидов ели европейской, полученных при различной продолжительности культивирования эмбриогенного каллуса на питательных средах для созревания. *Проблемы лесоведения и лесоводства*. 2021; 81:169–177.
7. Кусенкова МП, Падутов ВЕ. Клональная изменчивость как фактор, определяющий протекание процессов созревания и прорастания соматических эмбриоидов ели европейской. *Проблемы лесоведения и лесоводства*. 2022;82:48–57.
8. Varis S. Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. In: Jain S, Gupta P, editors. *Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants*. Cham: Springer; 2018. p. 255–267 (Forestry sciences; volume 84). DOI: 10.1007/978-3-319-89483-6_19.
9. Bojarczuk K, Hazubska-Przybył T, Szczygiel K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2007;76(1):7–15. DOI: 10.5586/asbp.2007.001.

10. Högberg K-A, Bozhkov PV, Grönroos R, von Arnold S. Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2001;16(4):295–304. DOI: 10.1080/02827580116772.
11. Lu CY, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Botanical gazette*. 1991;152(1):42–50. DOI: 10.1086/337861.
12. Attree SM, Tautorius TE, Dunstan DI, Fowke LC. Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany*. 1990;68(12):2583–2589. DOI: 10.1139/b90-326.
13. Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* ‘Glaucá’ and *P. breweriana*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2008;77(3):189–199. DOI: 10.5586/asbp.2008.023.
14. Tikkinen M, Varis S, Aronen T. Development of somatic embryo maturation and growing techniques of Norway spruce embliings towards large-scale field testing. *Forests*. 2018;9(6):325. DOI: 10.3390/f9060325.
15. Timmis R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress*. 1998;14(1):156–166. DOI: 10.1021/bp970143y.
16. Carlsson J, Egertsdotter U, Ganeteg U, Svennerstam H. Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees*. 2019;33:383–394. DOI: 10.1007/s00468-018-1784-y.
17. Llebrés MT, Avila C, Cánovas FM, Klimaszewska K. Root growth of somatic plants of hybrid *Pinus strobus* (L.) and *P. wallichiana* (A. B. Jacks.) is affected by the nitrogen composition of the somatic embryo germination medium. *Trees*. 2018;32:371–381. DOI: 10.1007/s00468-017-1635-2.
18. Dahrendorf J, Clapham D, Egertsdotter U. Analysis of nitrogen utilization capability during the proliferation and maturation phases of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) somatic embryogenesis. *Forests*. 2018;9(6):288. DOI: 10.3390/f9060288.
19. Bozhkov PV, Mikhlin SB, Shiryaeva GA, Lebedenko LA. Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] somatic polyembryogenesis: high frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *Journal of Plant Physiology*. 1993;142(6):735–741. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80911-9.
20. Barrett JD, Park YS, Bonga JM. The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 1997;16:411–415. DOI: 10.1007/bf01146784.
21. Митрофанова ИВ. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009;41(6):496–508.
22. Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter MA, Trontin J-F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germana M, Lambardi M, editors. *In vitro embryogenesis in higher plants*. New York: Humana Press; 2016. p. 131–166 (Methods in molecular biology; volume 1359). DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6_7.
23. Thomas TD. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008;26(6):618–631. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.

References

1. Egertsdotter U. Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2019;34(5):360–369. DOI: 10.1080/02827581.2018.1441433.
2. Park YS. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science*. 2002;59(5–6):651–656. DOI: 10.1051/forest:2002051.
3. Fraga HPDF, Moraes PEC, Vieira LDN, Guerra MP. Somatic embryogenesis in conifers: one clade to rule them all? *Plants*. 2023; 12(14):2648. DOI: 10.3390/plants12142648.
4. Tikkinen M, Varis S, Peltola H, Aronen T. Improved germination conditions for Norway spruce somatic cotyledonary embryos increased survival and height growth of embliings. *Trees*. 2018;32:1489–1504. DOI: 10.1007/s00468-018-1728-6.
5. Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak MK, Kijowska-Oberc J, Staszak AM, Ratajczak E. Somatic embryogenesis of Norway spruce and Scots pine: possibility of application in modern forestry. *Forests*. 2022;13(2):155. DOI: 10.3390/f13020155.
6. Kusenkova MP. Germination of Norway spruce somatic embryoids obtained at different duration of cultivation of embryogenic callus on nutrient media for maturation stage. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva*. 2021;81:169–177. Russian.
7. Kusenkova MP, Padutov VE. Clonal variability as a factor determining the processes of maturation and germination of somatic embryoids of European spruce. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva*. 2022;82:48–57. Russian.
8. Varis S. Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. In: Jain S, Gupta P. editors. *Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants*. Cham: Springer; 2018. p. 255–267 (Forestry sciences; volume 84). DOI: 10.1007/978-3-319-89483-6_19.
9. Bojarczuk K, Hazubska-Przybył T, Szczygiel K. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2007;76(1):7–15. DOI: 10.5586/asbp.2007.001.
10. Högberg K-A, Bozhkov PV, Grönroos R, von Arnold S. Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2001;16(4):295–304. DOI: 10.1080/02827580116772.
11. Lu CY, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Botanical gazette*. 1991;152(1):42–50. DOI: 10.1086/337861.
12. Attree SM, Tautorius TE, Dunstan DI, Fowke LC. Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany*. 1990;68(12):2583–2589. DOI: 10.1139/b90-326.
13. Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* ‘Glaucá’ and *P. breweriana*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2008;77(3):189–199. DOI: 10.5586/asbp.2008.023.
14. Tikkinen M, Varis S, Aronen T. Development of somatic embryo maturation and growing techniques of Norway spruce embliings towards large-scale field testing. *Forests*. 2018;9(6):325. DOI: 10.3390/f9060325.
15. Timmis R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress*. 1998;14(1):156–166. DOI: 10.1021/bp970143y.
16. Carlsson J, Egertsdotter U, Ganeteg U, Svennerstam H. Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees*. 2019;33:383–394. DOI: 10.1007/s00468-018-1784-y.

17. Llebrés MT, Avila C, Cánovas FM, Klimaszewska K. Root growth of somatic plants of hybrid *Pinus strobus* (L.) and *P. wallichiana* (A. B. Jacks.) is affected by the nitrogen composition of the somatic embryo germination medium. *Trees*. 2018;32:371–381. DOI: 10.1007/s00468-017-1635-2.

18. Dahrendorf J, Clapham D, Egertsdotter U. Analysis of nitrogen utilization capability during the proliferation and maturation phases of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) somatic embryogenesis. *Forests*. 2018;9(6):288. DOI: 10.3390/f9060288.

19. Bozhkov PV, Mikhlina SB, Shiryayeva GA, Lebedenko LA. Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] somatic polyembryogenesis: high frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *Journal of Plant Physiology*. 1993;142(6):735–741. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80911-9.

20. Barrett JD, Park YS, Bonga JM. The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 1997;16:411–415. DOI: 10.1007/bf01146784.

21. Mitrofanova IV. Somatic embryogenesis as an *in vitro* system of cultivated plants propagation. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*. 2009;41(6):500–508. Russian.

22. Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter MA, Trontin J-F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germana M, Lambardi M, editors. *In vitro embryogenesis in higher plants*. New York: Humana Press; 2016. p. 131–166 (Methods in molecular biology; volume 1359). DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6_7.

23. Thomas TD. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008;26(6):618–631. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.

Получена 15.08.2023 / исправлена 08.09.2023 / принята 08.09.2023.
Received 15.08.2023 / revised 08.09.2023 / accepted 08.09.2023.

УДК 595.782:632.782(476)

МОРФОМЕТРИЯ РАЗНОВОЗРАСТНЫХ ЛИЧИНОК ТОПОЛЕВОЙ МОЛИ-ПЕСТРЯНКИ (*PHYLLONORYCTER POPULIFOLIELLA* (TREITSCHKE, 1833))

Н. В. СИНЧУК¹⁾

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

Тополь (*Populus* spp.) широко представлены в зеленых насаждениях Беларуси. Они повреждаются большим кругом фитофагов, среди которых выделяется тополевая моль-пестрянка (*Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833)), регулярно дающая здесь вспышки массового размножения. Это представитель семейства молей-пестрянок (Lepidoptera: Gracillariidae), объединяющего минирующих филлобионтов. Личинки развиваются в пятновидных минах на листовых пластинках тополей, в результате повреждения листовой кроны деревьев утрачивают декоративность, наблюдается преждевременная дефолиация. Подробная морфометрическая характеристика дает возможность идентифицировать возрастную принадлежность личинок, что важно для выяснения фенологии вида и планирования мероприятий по контролю его популяционной численности. Выполненные исследования позволили получить данные морфометрии личинок *Ph. populifoliella* всех возрастов по таким параметрам, как длина тела, ширина головной капсулы, ширина 1–3-го грудных сегментов, ширина 1–3-го брюшных сегментов. В ходе проведения однофакторного дисперсионного анализа и пост-хок-анализа методом Тьюки с использованием языка программирования Python установлена статистическая достоверность различий между личинками пяти возрастов по всем рассмотренным параметрам, что подтверждает возможность использования данных морфометрии для идентификации возрастной принадлежности личинок тополевой моли-пестрянки – опасного вредителя тополей в зеленых насаждениях Беларуси.

Ключевые слова: вредители декоративных растений; зеленые насаждения; листовой минер; моли-пестрянки; морфология преимагинальных стадий; тополь; чешуекрылые.

Благодарность. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Особенности структуры сообществ опылителей и минеров-филлобионтов лесных экосистем юго-запада Белорусского Поозерья» (№ гос. регистрации 20211658) задания «Особенности и тенденции изменений популяций ресурсных, редких

Образец цитирования:

Синчук НВ. Морфометрия разновозрастных личинок тополевой моли-пестрянки (*Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833)). *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;3:57–67.
EDN: FUSLKV

For citation:

Sinchuk NV. Morphometry of different instars larvae of the poplar leaf miner (*Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833)). *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:57–67. Russian.
EDN: FUSLKV

Автор:

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

Author:

Nadzeya V. Sinchuk, postgraduate student at the department of zoology, faculty of biology.
n.v.sinchuk@gmail.com

и индикаторных видов, структуры и функционирования сообществ и экосистем в условиях климатических перемен и антропогенной трансформации местообитаний» государственной программы научных исследований «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг. Автор выражает признательность заведующему кафедрой ботаники биологического факультета БГУ кандидату биологических наук, доценту В. Н. Тихомирову за помощь в определении таксономической принадлежности тополей.

MORPHOMETRY OF DIFFERENT INSTARS LARVAE OF THE POPLAR LEAF MINER (*PHYLLONORYCTER POPULIFOLIELLA* (TREITSCHKE, 1833))

N. V. SINCHUK^a

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

Poplars (*Populus* spp.) are common in the green areas in Belarus. They are damaged by a wide range of phytophagous insects. The poplar leaf miner (*Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833)) is a species of Gracillariidae (Lepidoptera) regularly having population outbreaks. The one is a dangerous pest of poplars in the green areas of Belarus. *Ph. populifoliella* larvae live within spot mines on the leaf blades of poplars, mass colonisation of foliage leads to early defoliation. Detailed morphometric data makes possible to identify larvae instars, which is important for understanding of the species' phenology and planning population management measures. The conducted research provided data on the morphometry of *Ph. populifoliella* larvae at all instars based on several parameters: body length, width of the head capsule, width of the 1st–3rd thoracic segments and width of the 1st–3rd abdominal segments. Using the one-way analysis of variance (ANOVA) method and Tukey's post hoc test in Python, the statistical significance of differences between larvae of five age groups across all considered parameters has been confirmed with the possibility of using morphometric data to identify the instars of poplar leaf miner larvae – a dangerous pest of poplars in the green areas of Belarus.

Keywords: pest of decorative plants; green area; leaf miner; Gracillariidae; larval morphology; poplars; Lepidoptera.

Acknowledgements. The study was carried out within the framework of the research work «Features of the structure of communities of pollinators and miner-phylobionts of forest ecosystems in the southwest of the Belarusian Poozerye (state registration No. 20211658) of the assignment «Features and trends in changes in populations of resource, rare and indicator species, the structure and functioning of communities and ecosystems in conditions of climate change and anthropogenic transformation of habitats» of the state programme of scientific research «Natural resources and environment» for 2021–2025. The author is grateful to the head of the department of botany, faculty of biology, Belarusian State University, PhD (biology), docent V. N. Tikhomirov for his help in determining the taxonomic affiliation of poplars.

Введение

Тополя (*Populus* spp.) активно используются в зеленом строительстве на территории современной Беларуси со второй половины XX в. [1]. В настоящее время эта древесная порода широко представлена в зеленых насаждениях, а также в посадках вдоль автомобильных и железнодорожных магистралей. В условиях урбанизированных территорий тополя улучшают санитарно-гигиеническую ситуацию, в промышленных зонах и районах жилой застройки они также используются для фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами [2; 3].

Тополевая моль-пестрянка (*Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833); Lepidoptera: Gracillariidae) считается одним из наиболее опасных вредителей тополей в Евразии, периодически дающим вспышки массового размножения на большей части своего ареала – от Восточной Сибири до Франции [4–6]. При массовом размножении этот фитофаг может повреждать более 80 % листовой поверхности растений. В центральном регионе Беларуси в отдельные годы им повреждалось до 71 и 33 % листовой поверхности на нижней и верхней стороне листовых пластинок тополей соответственно [7; 8].

Повреждения, наносимые минирующими филлофагами декоративным растениям, как правило, не могут быть компенсированы в текущем вегетационном сезоне. Листовые мины обычно хорошо заметны сторонним наблюдателям. В случае их массового присутствия снижается декоративность растений, при распространении некроза на иные участки листовых пластинок последние усыхают и часто досрочно опадают. В результате насаждения утрачивают возможность выполнять санитарно-гигиеническую функцию, кроме того, снижается их эстетическая ценность.

Развитие личинок тополевой моли-пестрянки происходит в листовых минах – камерах в листовой паренхиме. Изначально мины имеют зигзагообразную форму, впоследствии становятся пятнообразными. Личинки проходят в своем развитии пять возрастов. Сначала они являются так называемыми сокоедками, потом питаются как грызущие эндобионты. Смена варианта питания сопровождается не только морфологическими преобразованиями ротового аппарата, но и изменениями пропорций тела, что отражают соответствующие морфометрические показатели. Исследование морфометрии личинок *Ph. populifoliella* имеет научно-теоретическое значение, поскольку все еще отсутствует их подробная морфологическая характеристика. Кроме того, оно играет большую практическую роль, так как позволяет оценить возможность использования данных морфометрии для установления возрастной принадлежности личинок, что важно для изучения фенологии минера и планирования мероприятий по ограничению его вредной деятельности. Уже имеется успешный опыт применения морфометрических индексов для установления возрастной и половой принадлежности личинок другого вида молей-пестрянок – нижнесторонней белоакациевой минирующей моли (*Macrosaccus robiniella* (Clemens, 1859)) [9].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования являлась развернутая морфометрическая характеристика личинок тополевой моли-пестрянки разных возрастов.

Материалы и методы исследования

Для формирования выборок личинок тополевой моли-пестрянки был выполнен отбор поврежденных минером листовых пластинок тополя берлинского (*Populus × berolinensis* (K. Koch) Dippel, 1865) и тополя канадского (*P. × canadensis* Moench, 1785) в зеленых насаждениях Минска и Витебска. Местопроизрастания деревьев представлены в табл. 1.

Таблица 1

Местопроизрастания экземпляров тополя берлинского и тополя канадского, с которых был выполнен сбор минированных личинками тополевой моли-пестрянки листовых пластинок

Table 1

Locality info for mined leaf blades of Berlin and Canadian poplars by poplar leaf miner

Город	Локализация	GPS-координаты
<i>Тополь берлинский</i>		
Минск	ул. Буденного	53° 53' 3,1" N., 27° 36' 50,9" E.
	ул. Заводская	53° 53' 18,9" N., 27° 35' 7,4" E.
	Стадион «Трактор» – 1	53° 52' 49,1" N., 27° 36' 59,7" E.
	Стадион «Трактор» – 2	53° 52' 48,4" N., 27° 36' 60,0" E.
	ул. Ленинградская	53° 53' 37,4" N., 27° 33' 4,0" E.
Витебск	Парк на набережной р. Витьбы – 1	55° 11' 45,0" N., 30° 12' 28,0" E.
	Парк на набережной р. Витьбы – 2	55° 11' 45,6" N., 30° 12' 28,0" E.
	пр. Московский	55° 10' 51,7" N., 30° 12' 33,1" E.
	ул. Энгельса	55° 11' 43,0" N., 30° 11' 41,0" E.
<i>Тополь канадский</i>		
Минск	ул. Ленинградская	53° 53' 33,9" N., 27° 33' 0,4" E.
	Михайловский сквер	53° 53' 38,8" N., 27° 33' 8,1" E.
	Еврейский мемориальный парк	53° 54' 1,3" N., 27° 32' 13,5" E.
	ул. Зыбицкая	53° 54' 18,5" N., 27° 33' 38,8" E.
	ул. Старовиленская	53° 54' 50,3" N., 27° 33' 32,0" E.

Отбор листьев проводился рандомизированно в нижней части крон тополей в период развития первой генерации тополевой моли-пестрянки. Минированные *Ph. populifoliella* листовые пластинки собирали в полиэтиленовые пакеты типа zip-lock (для исключения потери влаги), туда же вкладывали рабочую (временную) этикетку, на которой указывали дату и место сбора, таксон кормового растения, степень заселенности, коллектора [10].

Листовые мины вскрывали с помощью препаровальной иглы и заостренного пинцета по границе камеры (рис. 1, *a*). Извлеченные личинки помещали в полипропиленовые пробирки объемом 4 мл, наполненные этанолом (96°). Каждая пробирка снабжалась этикеткой, на которой указывалась следующая информация: таксономическая принадлежность объекта, дата и место сбора, GPS-координаты, кормовое растение, степень заселенности, коллектор, специалист, осуществивший идентификацию, маркировка гербария (номер гербарного сбора и листовой пластинки в нем для привязки каждой личинки к конкретному повреждению). Полученные образцы хранили в морозильной камере при температуре –16 °С.

Снятие промеров личинок *Ph. populifoliella* (рис. 1, *б*) выполнялось с использованием предварительно откалиброванного для измерений стереомикроскопа Stemi-2000 (*Carl Zeiss*, Германия). На время исследования личинки изымались из фиксатора и выкладывались на предметные стекла в каплю этилового спирта. Для исключения быстрого испарения этанола использовались покровные стекла. После замеров исследуемый объект возвращали в пробирку, а затем в морозильную камеру.

Для личинок каждого возраста выполнялись промеры длины тела, ширины головной капсулы, ширины 1–3-го грудных сегментов, ширины 1–3-го брюшных сегментов (рис. 2).

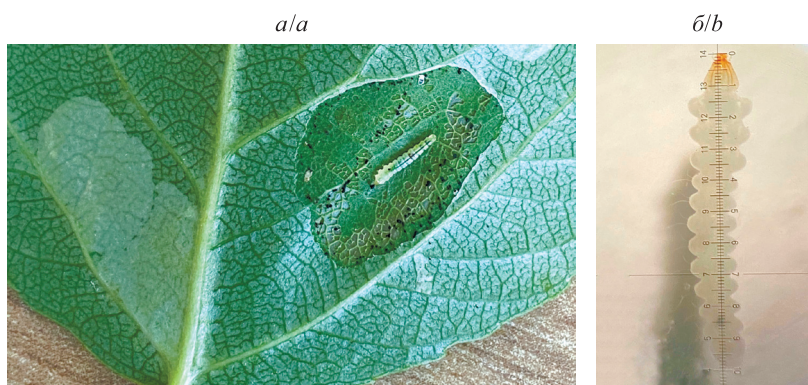


Рис. 1. Личинки тополевой моли-пестрянки:
a – во вскрытой мине; *б* – во время снятия промеров

Fig. 1. Larvae of the poplar leaf miner:
a – in an opened mine; *b* – during measurements

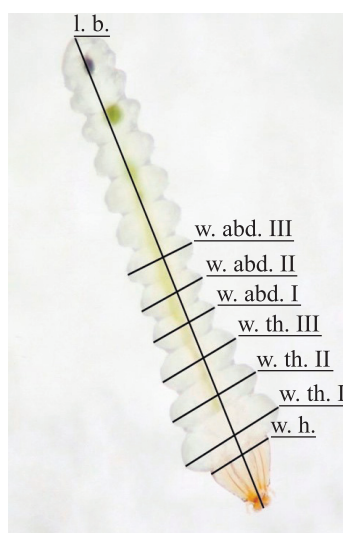


Рис. 2. Промеры личиночных стадий тополевой моли-пестрянки
(w. h. – ширина головной капсулы; w. th. I – ширина 1-го грудного сегмента;
w. th. II – ширина 2-го грудного сегмента; w. th. III – ширина 3-го грудного сегмента;
w. abd. I – ширина 1-го брюшного сегмента; w. abd. II – ширина 2-го брюшного сегмента;
w. abd. III – ширина 3-го брюшного сегмента; l. b. – длина тела)

Fig. 2. Measurements of different instar larvae of the poplar leaf miner
(w. h. – width of the head capsule; w. th. I – width of the 1st thoracic segment;
w. th. II – width of the 2nd thoracic segment; w. th. III – width of the 3rd thoracic segment;
w. abd. I – width of the 1st abdominal segment; w. abd. II – width of the 2nd abdominal segment;
w. abd. III – width of the 3rd abdominal segment; l. b. – body length)

Полученные данные заносили в электронные таблицы. Для определения статистической достоверности различий в значениях морфометрических параметров использовали метод однофакторного дисперсионного анализа (one-way analysis of variance (ANOVA)). В случае получения статистически значимых различий между группами выполняли пост-хок-анализ с применением метода Тьюки (Tukey's post hoc test) на языке программирования Python [11]. Для данных морфометрии личинок тополевой моли-пестрянки были рассчитаны доверительные интервалы (использована стандартная ошибка средней арифметической величины), в пределах которых находятся средние значения и медианы полученных выборок.

Результаты и их обсуждение

Головная капсула личинок тополевой моли-пестрянки от возраста к возрасту изменяется по размеру, форме и окраске (рис. 3). Важно отметить, что длина тела отдельных личинок может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние растения-хозяина и условия окружающей среды.

Морфометрические характеристики личинок 1-го возраста тополевой моли-пестрянки представлены в табл. 2.

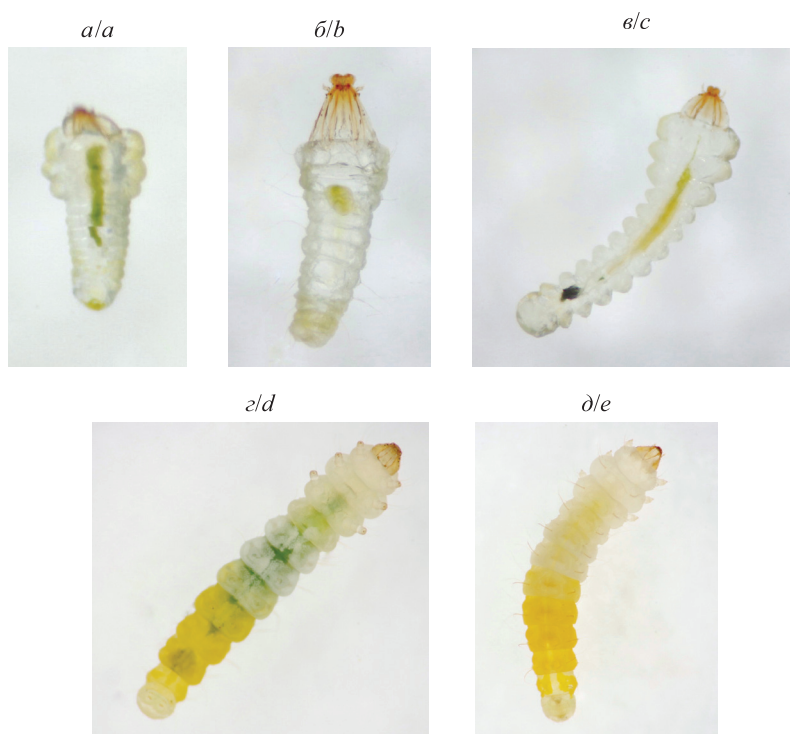


Рис. 3. Фотографии личинок тополевой моли-пестрянки разных возрастов:
а – личинка 1-го возраста; б – личинка 2-го возраста; в – личинка 3-го возраста;
г – личинка 4-го возраста; д – личинка 5-го возраста

Fig. 3. Photos of the poplar leaf miner larvae at different instars:
a – the 1st instar larva; b – the 2nd instar larva; c – the 3rd instar larva;
d – the 4th instar larva; e – the 5th instar larva

Таблица 2

Морфометрические характеристики личинок 1-го возраста тополевой моли-пестрянки

Table 2

Morphometric data of the 1st instar larvae of the poplar leaf miner

Морфометрические параметры	Среднее значение, мм	Стандартное отклонение, мм	Медиана, мм	Максимальное значение, мм	Минимальное значение, мм	Дисперсия
Длина тела	0,681	0,069	0,688	0,777	0,572	0,005
Ширина головной капсулы	0,127	0,021	0,134	0,159	0,071	0,000
Ширина 1-го грудного сегмента	0,238	0,029	0,232	0,282	0,192	0,001

Окончание табл. 2
 Ending of the table 2

Морфометрические параметры	Среднее значение, мм	Стандартное отклонение, мм	Медиана, мм	Максимальное значение, мм	Минимальное значение, мм	Дисперсия
Ширина 2-го грудного сегмента	0,267	0,042	0,277	0,353	0,205	0,002
Ширина 3-го грудного сегмента	0,220	0,036	0,224	0,263	0,150	0,001
Ширина 1-го брюшного сегмента	0,166	0,027	0,169	0,233	0,118	0,001
Ширина 2-го брюшного сегмента	0,153	0,022	0,157	0,182	0,095	0,000
Ширина 3-го брюшного сегмента	0,152	0,025	0,164	0,180	0,102	0,001

Примечание. Во всех случаях объем выборки составлял 15 экз.

Головная капсула личинок 1-го возраста отчетливо дифференцированная, маленькая, полупрозрачная, желтовато-белая.

Тело личинок 1-го возраста также прозрачное и практически бесцветное, лишённое волосков. Оно постепенно сужается к заднему концу и имеет множество мелких складок, что позволяет ему сгибаться и разгибаться и обеспечивает подвижность. Ноги на данном этапе не выражены. Грудной отдел выделяется значительным развитием по отношению к другим отделам. Брюшные сегменты значительно уже грудных.

Личинки 2-го возраста тополевой моли-пестрянки демонстрируют некоторые изменения в своей морфометрии (табл. 3).

Таблица 3

Морфометрические характеристики личинок 2-го возраста тополевой моли-пестрянки

Table 3

Morphometric data of the 2nd instar larvae of the poplar leaf miner

Морфометрические параметры	Среднее значение, мм	Стандартное отклонение, мм	Медиана, мм	Максимальное значение, мм	Минимальное значение, мм	Дисперсия
Длина тела	1,004	0,152	1,025	1,248	0,713	0,023
Ширина головной капсулы	0,224	0,033	0,235	0,259	0,129	0,001
Ширина 1-го грудного сегмента	0,354	0,045	0,367	0,441	0,255	0,002
Ширина 2-го грудного сегмента	0,352	0,040	0,355	0,441	0,246	0,002
Ширина 3-го грудного сегмента	0,300	0,039	0,302	0,420	0,225	0,002
Ширина 1-го брюшного сегмента	0,220	0,033	0,223	0,328	0,144	0,001
Ширина 2-го брюшного сегмента	0,217	0,038	0,217	0,340	0,134	0,001
Ширина 3-го брюшного сегмента	0,214	0,042	0,217	0,343	0,126	0,002

Примечание. Во всех случаях объем выборки составлял 53 экз.

Головная капсула у личинок 2-го возраста становится более крупной и темной, чем у личинок 1-го возраста, ее цвет приобретает бежево-коричневый оттенок.

Грудной отдел личинок 2-го возраста заметно развит и выделяется своей шириной. Брюшные сегменты уже грудных. На теле имеются редкие, короткие волоски: на 1-м грудном и всех брюшных сегментах располагается по 2 пары волосков, на 2-м и 3-м грудных сегментах – по 1 паре волосков, на анальном сегменте равномерно размещены 8 волосков.

Личинки 3-го возраста тополевой моли-пестрянки имеют морфометрические характеристики, представленные в табл. 4.

Таблица 4

**Морфометрические характеристики
личинки 3-го возраста тополевой моли-пестрянки**

Table 4

Morphometric data of the 3rd instar larvae of the poplar leaf miner

Морфометрические параметры	Среднее значение, мм	Стандартное отклонение, мм	Медиана, мм	Максимальное значение, мм	Минимальное значение, мм	Дисперсия
Длина тела	1,702	0,282	1,636	2,328	1,192	0,080
Ширина головной капсулы	0,276	0,057	0,249	0,361	0,122	0,003
Ширина 1-го грудного сегмента	0,452	0,079	0,450	0,617	0,185	0,006
Ширина 2-го грудного сегмента	0,438	0,067	0,432	0,573	0,242	0,005
Ширина 3-го грудного сегмента	0,383	0,059	0,378	0,512	0,218	0,003
Ширина 1-го брюшного сегмента	0,300	0,056	0,290	0,436	0,142	0,003
Ширина 2-го брюшного сегмента	0,297	0,055	0,291	0,421	0,135	0,003
Ширина 3-го брюшного сегмента	0,304	0,056	0,296	0,426	0,164	0,003

Примечание. Во всех случаях объем выборки составлял 98 экз.

Головная капсула личинок 3-го возраста значительно более крупная и темная по сравнению с головной капсулой личинок 2-го возраста, ее цвет приобретает светло-коричневый оттенок.

На данной стадии развития становится явным наличие грудных конечностей и брюшных ножек, тело личинок имеет бледно-желтую или желтовато-зеленую окраску.

Морфометрические характеристики личинок 4-го возраста тополевой моли-пестрянки представлены в табл. 5.

Таблица 5

**Морфометрические характеристики
личинки 4-го возраста тополевой моли-пестрянки**

Table 5

Morphometric data of the 4th instar larvae of the poplar leaf miner

Морфометрические параметры	Среднее значение, мм	Стандартное отклонение, мм	Медиана, мм	Максимальное значение, мм	Минимальное значение, мм	Дисперсия
Длина тела	2,475	0,220	2,474	2,788	1,516	0,048
Ширина головной капсулы	0,343	0,028	0,341	0,398	0,226	0,001
Ширина 1-го грудного сегмента	0,563	0,057	0,562	0,721	0,374	0,003
Ширина 2-го грудного сегмента	0,535	0,056	0,521	0,740	0,414	0,003
Ширина 3-го грудного сегмента	0,481	0,052	0,471	0,669	0,387	0,003
Ширина 1-го брюшного сегмента	0,391	0,038	0,388	0,480	0,283	0,001
Ширина 2-го брюшного сегмента	0,394	0,040	0,395	0,509	0,282	0,002
Ширина 3-го брюшного сегмента	0,402	0,045	0,401	0,506	0,255	0,002

Примечание. Во всех случаях объем выборки составлял 47 экз.

Головная капсула у личинок 4-го возраста крупнее, чем у личинок 3-го возраста, ее цвет приобретает средне-коричневый оттенок.

В целом личинки 4-го возраста сохраняют сходство с личинками 3-го возраста, однако имеют более выраженные адаптивные изменения. В частности, их конечности становятся более развитыми, а общая ширина тела увеличивается. Эпителиальные покровы тела остаются прозрачными, что позволяет наблюдать внутренние органы и трубчатый кишечник. В отличие от личинок 3-го возраста личинки 4-го возраста благодаря лучше развитым челюстям демонстрируют способность к потреблению как мягких, так и жестких тканей листа. Окраска их тела приобретает зеленовато-желтый оттенок, изменяющийся в зависимости от окружающей среды. По дорсальной стороне иногда наблюдается чередование темных и светлых полос.

Личинки 5-го возраста тополевой моли-пестрянки продемонстрировали существенные изменения морфологии (табл. 6). Важным аспектом является то, что головная капсула стала еще крупнее и приобрела более интенсивный темно-коричневый цвет.

Таблица 6

Морфометрические характеристики личинок 5-го возраста тополевой моли-пестрянки

Table 6

Morphometric data of the 5th instar larvae of the poplar leaf miner

Морфометрические параметры	Среднее значение, мм	Стандартное отклонение, мм	Медиана, мм	Максимальное значение, мм	Минимальное значение, мм	Дисперсия
Длина тела	3,809	0,800	3,746	5,237	2,595	0,640
Ширина головной капсулы	0,385	0,073	0,380	0,725	0,259	0,005
Ширина 1-го грудного сегмента	0,649	0,104	0,627	1,030	0,379	0,011
Ширина 2-го грудного сегмента	0,746	0,165	0,733	1,075	0,366	0,027
Ширина 3-го грудного сегмента	0,695	0,147	0,703	0,920	0,486	0,022
Ширина 1-го брюшного сегмента	0,626	0,148	0,652	0,851	0,400	0,022
Ширина 2-го брюшного сегмента	0,641	0,164	0,664	0,937	0,405	0,027
Ширина 3-го брюшного сегмента	0,686	0,272	0,716	2,407	0,417	0,074

Примечание. Во всех случаях объем выборки составлял 62 экз.

Тело личинок имеет удлинненную форму и сужается к концу. В грудном отделе отчетливо выделяются 3 пары конечностей, каждая из которых несет коготки. Брюшные сегменты покрыты мелкими волосками. Имеются несколько пар брюшных ножек, которые также помогают насекомому передвигаться. Окраска передней части брюшного отдела личинки молочно-желтоватая, задней – желто-оранжевая. На данной стадии развития личинка формирует защитный кокон, в котором впоследствии будет происходить окукливание.

Результаты проведения однофакторного дисперсионного анализа и пост-хок-анализа методом Тьюки с использованием языка программирования Python указывают на существование статистически значимых различий ($p < 0,05$) по всем рассматриваемым морфометрическим параметрам для личинок *Ph. populifoliella* 1–5-го возрастов, что согласуется с результатами аналогичных исследований для нижнесторонней белоакациевой минирующей моли [9], каштановой минирующей моли (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimič, 1986) [12] и липовой моли-пестрянки (*Ph. issikii* (Kumata, 1963)) [13], подтвердившими возможность использования этих параметров для установления возрастной принадлежности личинок тополевой моли-пестрянки.

Данные, полученные в ходе анализа морфометрических параметров личинок *Ph. populifoliella* 1–5-го возрастов, собранных на кормовом растении *P. × canadensis*, свидетельствуют о статистически значимых различиях ($p < 0,05$) в значениях исследуемых параметров, за исключением ширины головной капсулы 2-го и 3-го возрастов, где статистически значимых различий не обнаружено ($Pr(>F) = 0,097$; $p > 0,05$). В то время как для личинок *Ph. populifoliella* 1–5-го возрастов, развивавшихся на кормовом растении *P. × berolinensis*, установлена статистическая достоверность различий ($p < 0,05$) по всем морфометрическим параметрам.

Анализ морфометрических параметров личинок разных возрастов по отдельным выборкам тополя берлинского из зеленых насаждений Витебска и Минска показал отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$), за исключением нескольких параметров, представленных в табл. 7.

Таблица 7

Уровень значимости ($Pr(>F)$) и разность средних значений (*meandiff*) морфометрических параметров личинок тополевой моли-пестрянки, собранных с тополя берлинского в зеленых насаждениях Витебска и Минска

Table 7

The significance level ($Pr(>F)$) and the difference in mean values (*meandiff*) of morphometric data of the poplar leaf miner larvae collected from Berlin poplar in green areas of Vitebsk and Minsk

Морфометрические параметры	Возраст личинки	$Pr(>F)$	<i>Meandiff</i> , мм
Ширина 2-го грудного сегмента	4	0,009 7	0,045 4
Ширина 3-го грудного сегмента	2	0,047 9	0,030 4
	4	0,000 4	0,054 1
Ширина 1-го брюшного сегмента	4	0,008 4	0,028 6

Таким образом, полученные данные не подтверждают зависимость между морфометрическими параметрами личинок и регионом сбора образцов. Однако наблюдаемые различия могут быть связаны с разными факторами (географические условия, места обитания, питание и др.), которые влияют на развитие личинок.

Результаты статистического анализа морфометрических параметров личинок, развивавшихся на *P. × berolinensis* (группа 1) и *P. × canadensis* (группа 2), показали, что для ширины всех грудных и брюшных сегментов существуют статистически значимые различия между группами личинок 5-го возраста: у образцов, собранных с *P. × canadensis*, значения ширины оказались существенно большими, чем у образцов, собранных с *P. × berolinensis*. Для остальных параметров статистически значимых различий не установлено ни в одном из исследуемых возрастов.

Для групп личинок, развивавшихся на *P. × berolinensis* (группа 1) и *P. × canadensis* (группа 2) в Минске, статистически значимых различий в значениях анализируемых морфометрических параметров не установлено ($p > 0,05$).

Для групп личинок, развивавшихся на *P. × berolinensis* (группа 1) в Витебске и *P. × canadensis* (группа 2) в Минске, выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) в значениях ширины всех грудных и брюшных сегментов у личинок 4-го и 5-го возрастов. Для остальных параметров статистически значимых различий не установлено ни в одном из исследуемых возрастов.

Заключение

Выполненные исследования преимагинальных стадий тополевой моли-пестрянки, массового вредителя тополя берлинского и тополя канадского в зеленых насаждениях Беларуси, позволили получить морфометрические параметры личинок *Ph. populifoliella* всех возрастов, такие как длина тела, ширина головной капсулы, ширина 1–3-го грудных сегментов, ширина 1–3-го брюшных сегментов. Однофакторный дисперсионный анализ и пост-хок-анализ методом Тьюки с использованием языка программирования Python продемонстрировали статистически достоверные различия ($p < 0,05$) всех рассмотренных параметров личинок 1–5-го возрастов.

Исследование морфометрических параметров личинок *Ph. populifoliella*, собранных на различных кормовых растениях и в разных географических локациях, позволило выявить статистически значимые различия в их морфологии. Анализ полученных результатов указывает на следующие закономерности.

1. Влияние кормового растения: развитие личинок на разных кормовых растениях (*P. × berolinensis* и *P. × canadensis*) отражается на морфометрических параметрах. Обнаруженные статистически значимые различия в значениях ширины всех грудных и брюшных сегментов личинок 5-го возраста могут быть связаны с разным химическим составом листьев и питательных веществ этих растений, которые влияют на рост и развитие личинок, что приводит к различиям в их морфологических характеристиках.

2. Влияние географической локации: различия в значениях морфометрических параметров личинок, собранных в разных городах (Минск и Витебск), могут быть связаны с отличием экологических

условий, мест обитания и других факторов, характерных для каждой локации. Однако не во всех случаях различия были статистически значимыми, что может указывать на наличие иных влияющих факторов.

По результатам выполненных исследований детализировано морфометрическое описание личинок тополевой моли-пестрянки всех возрастов и подтверждена возможность использования данных морфометрии для установления возрастной принадлежности личинок *Ph. populifoliella* – опасного вредителя зеленых насаждений, регулярно дающего в Беларуси вспышки массового размножения.

Библиографические ссылки

1. Федорук АТ. *Интродуцированные деревья и кустарники западной части Белоруссии*. Минск: Издательство БГУ имени В. И. Ленина; 1972. 191 с.
2. Котелова НВ, Стельмахович МЛ. *Тополя и их использование в зеленых насаждениях*. Москва: Сельхозиздат; 1962. 127 с.
3. Новикова АЛ, Чубик МВ. Фиторемедиация почв. В: Чинахов ДА, Гришагин ВМ, Литовкин СВ, Луговцова НЮ, Мальчик АГ, Поleshchuk ЛГ и др., редакторы. *Экология и безопасность в техносфере: современные проблемы и пути решения. Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов; 27–28 ноября 2014 г.; Югра, Россия*. Томск: Издательство Томского политехнического университета; 2014. с. 52–54.
4. Селиховкин АВ. Особенности популяционной динамики тополевой нижнесторонней моли-пестрянки *Phyllonorycter populifoliella* Tr. (Gracillariidae). *Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии*. 2010;192:220–235.
5. Флоров ДН. Тополевая моль – вредитель зеленых насаждений Иркутска. *Труды Иркутского государственного университета имени А. А. Жданова. Серия биологическая*. 1948;3(2):1–20.
6. Kozlovsky S. Contribution à l'étude morphologique et biologique de *Phyllocnistis suffusella* Zell. et *Lithocolletis populifoliella* Tr. *Ecole nationale des eaux et forets*. 1955;14:261–278.
7. Синчук ОВ, Трещева АБ. Спектр кормовых растений тополевой моли-пестрянки *Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833) в условиях Беларуси и других регионах мира. В: Лысак ВВ, Соколик АИ, Люзина КМ, Совгир НВ, Ризевский СВ, Дзыубан ОВ и др., редакторы. *Биологическая осень – 2017 (к Году науки в Беларуси). Тезисы докладов Международной научной конференции молодых ученых; 9 ноября 2017 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2017. с. 281–282.
8. Синчук НВ, Кучвальская АБ, Буга СВ. Поврежденность листовых пластинок *Populus × canadensis* личинками тополевой моли-пестрянки (*Phyllonorycter populifoliella*) в условиях зеленых насаждений Центрального ботанического сада НАН Беларуси в 2016–2018 гг. *Вестник Мазырскага дзяржаўнага педагагічнага ўніверсітэта імя І. П. Шамякіна*. 2020;2:58–65.
9. Davis DR, De Prins J. Systematics and biology of the new genus *Macrosaccus* with descriptions of two new species (Lepidoptera, Gracillariidae). *Zookeys*. 2011;98:29–82. DOI: 10.3897/zookeys.98.925.
10. Кириченко НИ. Методические подходы к исследованию насекомых, минирующих листья древесных растений. *Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии*. 2014;207:235–246.
11. Вандер Плас Дж. *Python для сложных задач: наука о данных и машинное обучение*. Пальти И, переводчик. Санкт-Петербург: Питер; 2018. 576 с.
12. Рогинский АС, Буга СВ. Краткая морфометрическая характеристика личинок каштановой минирующей моли (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, 1986; Lepidoptera: Gracillariidae). В: Бородин ОИ, Цинкевич ВА, Волкова ТВ, Анисимова ЕИ, Бычкова ЕИ, редакторы. *Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси. Сборник статей XI Зоологической Международной научно-практической конференции, приуроченной к десятилетию основания ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»; 1–3 ноября 2017 г.; Минск, Беларусь. Том 2*. Минск: Издатель А. Н. Варахсин; 2017. с. 371–374.
13. Sefrova H. *Phyllonorycter issikii* (Kumata, 1963) – bionomics, ecological impact and spread in Europe (Lepidoptera, Gracillariidae). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2002;50(3):99–104.

References

1. Fedoruk AT. *Introducirovannyye derev'ya i kustarniki zapadnoi chasti Belorussii* [Introduced trees and bushes of the western part of Belarus]. Minsk: Izdatel'stvo BGU imeni V. I. Lenina; 1972. 191 p. Russian.
2. Kotelova NV, Stel'makhovich ML. *Topolya i ikh ispol'zovanie v zelenykh nasazhdeniyakh* [Poplars and their use in green areas]. Moscow: Sel'khozizdat; 1962. 127 p. Russian.
3. Novikova AL, Chubik MV. [Phytoremediation of soils]. In: Chinakhov DA, Grishagin VM, Litovkin SV, Lugovtsova NYu, Mal'chik AG, Poleshchuk LG, et al., editors. *Ekologiya i bezopasnost' v tekhnosfere: sovremennyye problemy i puti resheniya. Sbornik trudov Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh, aspirantov i studentov; 27–28 noyabrya 2014 g.; Yugra, Rossiya* [Ecology and safety in technosphere: modern problems and solutions. Proceedings of the All-Russian scientific-practical conference of young scientists, postgraduates and students; 2014 November 27–28; Yugra, Russia]. Tomsk: Publishing House of the Tomsk Polytechnic University; 2014. p. 52–54. Russian.
4. Selikhovkin AV. [Features of population dynamics of the poplar leaf miner *Phyllonorycter populifoliella* Tr. (Gracillariidae)] *Izvestiya Sankt-Peterburgskoi lesotekhnicheskoi akademii*. 2010;192:220–235. Russian.
5. Florov DN. [Poplar moth – a pest of green areas in Irkutsk]. *Trudy Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta imeni A. A. Zhdanova. Seriya biologicheskaya*. 1948;3(2):1–20. Russian.
6. Kozlovsky S. Contribution à l'étude morphologique et biologique de *Phyllocnistis suffusella* Zell. et *Lithocolletis populifoliella* Tr. *Ecole nationale des eaux et forets*. 1955;14:261–278.
7. Sinchuk AV, Tresheva AB. Spectrum of fodder plants *Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833) in conditions of Belarus and other regions of the world. In: Lysak VV, Sokolik AI, Lyuzina KM, Sovgir NV, Rizevskii SV, Dzyuban OV, et al., editors. *Biologicheskaya osen' – 2017 (k Godu nauki v Belarusi). Tezisy dokladov Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchenykh; 9 noyabrya 2017 g.; Minsk, Belarus'* [Biological autumn – 2017 (for the Year of Science in Belarus). Abstracts of reports of the International scientific conference of young scientists; 2017 November 9; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2017. p. 281–282. Russian.

8. Sinchuk NV, Kuchvalskaya AB, Buga SV. Dynamics of *Populus × canadensis* leaf blades damage by larvae of *Phyllonorycter populifoliella* in green areas of the Central Botanical Garden in Minsk for the period 2016–2018. *Vesnik Mazyrskaga dzjarzhavnaga pedagogichnaga vniwersitjeta imja I. P. Shamjakina*. 2020;2:58–65. Russian.
9. Davis DR, De Prins J. Systematics and biology of the new genus *Macrosaccus* with descriptions of two new species (Lepidoptera, Gracillariidae). *Zookeys*. 2011;98:29–82. DOI: 10.3897/zookeys.98.925.
10. Kirichenko NI. Methodological approaches to the study of insects mining leaves of woody plants. *Izvestiya Sankt-Peterburgskoi lesotekhnicheskoi akademii*. 2014;207:235–246. Russian.
11. VanderPlas J. *Python data science handbook: essential tools for working with data*. Sebastopol: O'Reilly Media; 2016. 548 p. Russian edition: VanderPlas J. *Python dlya slozhnykh zadach: nauka o dannykh i mashinnoe obuchenie*. Pal'ti I, translator. Saint Petersburg: Piter; 2018. 576 p.
12. Roginsky AS, Buga SV. Short morphometric characteristics of large horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimič, 1986; Lepidoptera: Gracillariidae). In: Borodin OI, Tsinkevich VA, Volkova TV, Anisimova EI, Bychkova EI, editors. *Aktual'nye problemy zoologicheskoi nauki v Belarusi. Sbornik statei XI Zoologicheskoi Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, priurochennoi k desyatiletiju osnovaniya GNPO «NPTs NAN Belarusi po bioresursam»; 1–3 noyabrya 2017 g.; Minsk, Belarus'*. Tom 2 [Current issues in zoological science in Belarus. Collection of articles from the 11th International scientific-practical conference on zoology, dedicated to the 10th anniversary of the establishment of the state scientific and production association «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources»; 2017 November 1–3; Minsk, Belarus. Volume 2]. Minsk: Publisher A. N. Varaksin; 2017. p. 371–374. Russian.
13. Sefrova H. *Phyllonorycter issikii* (Kumata, 1963) – bionomics, ecological impact and spread in Europe (Lepidoptera, Gracillariidae). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2002;50(3):99–104.

Получена 10.09.2023 / принята 11.09.2023.
Received 10.09.2023 / accepted 11.09.2023.

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

ECOLOGY AND CONSERVANCY

УДК 574.58

МАКРОФИТЫ КАК СУБСТРАТ ДЛЯ РАЗВИТИЯ МОЛЛЮСКА *DREISSENA POLYMORPHA* PALLAS, 1771 В НАРОЧАНСКИХ ОЗЕРАХ

Д. В. КРЮК¹⁾, А. А. ЖУКОВА¹⁾, А. А. НОВИКОВ²⁾,
О. С. ПОСЛЕД²⁾, ДЖАНГ ШУФЕНГ³⁾, Б. В. АДАМОВИЧ¹⁾

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

²⁾Национальный парк «Нарочанский», ул. Ленинская, 11, 222395,
к. п. Нарочь, Мядельский р-н, Минская обл., Беларусь

³⁾Цзинаньский университет, пр. Западный Хуанпу, 601, 510632,
г. Гуанчжоу, пров. Гуандун, Китай

После вселения в Нарочанские озера в 1980-х гг. двустворчатый пресноводный моллюск *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 сформировал крупную популяцию, которая активно участвует в преобразовании экосистемы. Изучены погруженные макрофиты, являющиеся основным субстратом для развития дрейсены в озерах Нарочь, Мястро

Образец цитирования:

Крюк ДВ, Жукова АА, Новиков АА, Послед ОС, Джанг Шуфенг, Адамович БВ. Макрофиты как субстрат для развития моллюска *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 в Нарочанских озерах. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023; 3:68–80.

EDN: GEIAEF

For citation:

Kruk DV, Zhukava AA, Novikov AA, Posled OS, Zhang Xiufeng, Adamovich BV. Macrophytes as a substrate for the mollusc *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 development in Narochanskie lakes. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:68–80. Russian. EDN: GEIAEF

Авторы:

Дарья Вячеславовна Крюк – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета.

Анна Анатольевна Жукова – кандидат биологических наук; доцент кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.

Алексей Александрович Новиков – начальник научного отдела.

Ольга Сергеевна Послед – научный сотрудник научного отдела.

Джанг Шуфенг – профессор кафедры экологии и Института гидробиологии.

Борис Владиславович Адамович – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией гидроэкологии биологического факультета.

Authors:

Daria V. Kruk, junior researcher at the laboratory of hydroecology, faculty of biology.

krukdv@bsu.by

Hanna A. Zhukava, PhD (biology); associate professor at the department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.

Alexey A. Novikov, head of the scientific department.

Olga S. Posled, researcher at the scientific department.

Zhang Xiufeng, professor at the department of ecology and Institute of hydrobiology.

Boris V. Adamovich, PhD (biology); head of the laboratory of hydroecology, faculty of biology.

belaqalab@gmail.com

и Баторино. Показано, что в оз. Нарочь главным субстратом для моллюска служат смешанные растительные ассоциации, а также харовые водоросли, которые представлены здесь в большом количестве. В оз. Мясстро дрейсена заселяет в основном элодею ввиду ее высокой численности. В оз. Баторино в настоящее время погруженные макрофиты развиты слабо, поэтому из-за недостатка подходящего растительного субстрата, а также заиленности донного грунта дрейсена встречается там в незначительном количестве. В озерах Нарочь и Мясстро макрофиты, создающие основную нишу для развития моллюска, образуют достаточно четкие зоны и пояса, что следует принимать во внимание при учете размерных характеристик популяции дрейсены.

Ключевые слова: *Dreissena polymorpha*; Нарочь; Мясстро; Баторино; погруженные макрофиты; растительный субстрат; пространственное распределение популяции.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б21РМ-153) и Национальной ключевой программы исследований и разработок Китая (грант № 2022YFE0122100). Авторы признательны дайверам А. А. Солдатенко и В. В. Катулько за помощь в отборе проб на глубоководных станциях, а также сотрудникам учебно-научного центра «Нарочанская биологическая станция имени Г. Г. Винберга» за сопровождение всех работ, проводившихся на озерах. Значительный вклад в отбор и последующую обработку проб внес младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории гидроэкологии биологического факультета БГУ А. Ю. Панько.

MACROPHYTES AS A SUBSTRATE FOR THE MOLLUSC *DREISSENA POLYMORPHA* PALLAS, 1771 DEVELOPMENT IN NAROCHANSKIE LAKES

D. V. KRUK^a, H. A. ZHUKAVA^a, A. A. NOVIKOV^b,
O. S. POSLED^b, ZHANG XIUFENG^c, B. V. ADAMOVICH^a

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

^bNational Park «Narochansky», 11 Lieninskaja Street, Narach 222395, Miadziel District, Minsk Region, Belarus

^cJinan University, 601 West Huangpu Avenue, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Corresponding author: D. V. Kruk (krukdv@bsu.by)

The bivalve of zebra mussel *Dreissena polymorpha* has been formed a large population since the invasion into Narochanskie lakes (Naroch Lake, Myastro Lake and Batorino Lake), which is actively involved in the structural, functional and ecological processes of the ecosystem. Plenty of studies on the mussel population development in Naroch Lake and its interactions with other components of the ecosystem have been carried out since the beginning of the invasion. In addition, plenty of research has also been conducted on submerged macrophytes in the Naroch, Myastro and Batorino lakes. The results showed that the main substrate for zebra mussel development in Naroch Lake's ecosystem are emergent plants, especially Characeae, which develop in large quantities in middle depths. In Myastro Lake, *Dreissena* inhabits mainly *Elodea* thickets due to their large abundance in the lake. Submerged macrophytes are not sufficiently dense in Batorino Lake for zebra mussel development, therefore *Dreissena* develops in small quantities. Thus, in the Naroch and Myastro lakes, macrophytes arranged in macrophyte zones or belts, are the main niche for the development of zebra mussel, which should be taken into account when studying the zebra mussel population.

Keywords: *Dreissena polymorpha*; Naroch; Myastro; Batorino; submerged macrophytes; plant substrate; spatial distribution of the population.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B21RM-153) and the National Key Research and Development Programme of China (grant No. 2022YFE0122100). The authors are grateful to divers A. A. Soldatenko and V. V. Katulko for their help in sampling the dee, as well as to the staff of the educational and research centre «Naroch Biological Station named after G. G. Vinberg» for supporting all the field work carried out on the lakes. A significant contribution to the selection and subsequent processing of samples was made by a junior researcher at the laboratory of hydroecology, faculty of biology, Belarusian State University, A. Yu. Panko.

Введение

Двустворчатый пресноводный моллюск *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 родом из Понто-Каспийского региона. Это активно расселяющийся инвайдер, способный эффективно трансформировать практически любую экосистему, где численность популяции данного вида достигает высоких значений. Влияние моллюска на экосистему многовекторно и неоднозначно с точки зрения пользы и вреда для хозяйственной деятельности человека. Формируя большие популяции, дрейсена направляет потоки органического вещества

из толщи воды в донные отложения, из-за чего снижается уровень трофности водоемов. В результате содержание органического вещества в толще воды уменьшается, а в донных отложениях возрастает, как следствие, увеличивается прозрачность воды, что, в свою очередь, приводит к распространению погруженных макрофитов на большую глубину (при соответствии прочих сопутствующих факторов). Обычно эти изменения принято считать положительными с точки зрения рекреационной роли водоемов.

Однако некоторые последствия вселения дрейсены вредны для хозяйственной деятельности человека. К ним относят заиление дна и обрастание моллюском гидротехнических сооружений. В связи с этим распространение дрейсены и особенности ее экологии являются предметом изучения во всем мире. Внешний вид моллюска *D. polymorpha* представлен на рис. 1.

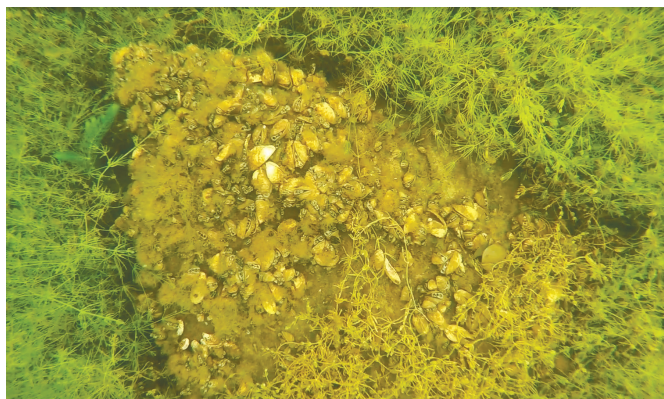


Рис. 1. Камень, обросший дрейсеной на дне оз. Нарочь

Fig. 1. A stone overgrown with zebra mussel at the bottom of Naroch Lake

Для развития популяции дрейсены большую роль играет характер субстрата в водоеме. После закрепления планктонной личинки дрейсены на субстрате взрослая особь развивается неподвижно, и от типа субстрата зависит то, как долго она просуществует. Особи, развивающиеся на крупном твердом субстрате, таком как камни и элементы гидротехнических сооружений, существуют длительное время и имеют большую вероятность образовать плотные скопления в подходящих водоемах. Особи, развивающиеся на погруженной растительности, способны стабильно существовать только в период развития растения, после гибели растительного субстрата они опускаются на дно. Как отмечено выше, взрослые особи дрейсены неподвижны, поэтому не могут существовать на поверхности донного грунта, если он сильно заилен [1, с. 118].

Исследования, проведенные в озерах с хорошо развитой погруженной растительностью, показали, что многие виды макрофитов являются подходящим субстратом для массового развития моллюска *D. polymorpha*, однако ввиду недолговечности данного субстрата развивающиеся на нем особи дрейсены характеризуются высокой плотностью при относительно низкой биомассе, т. е. макрофиты заселены в основном молодыми особями [1–3]. Численность и возраст дрейсены, развивающейся на донном грунте, будут сильно зависеть от типа грунта, а точнее от его подвижности и плотности (соотношения органического вещества и песчаной фракции) [4].

Макрофиты являются мощным средообразующим фактором для популяций *D. polymorpha*. Тем не менее не все макрофиты одинаково активно разлагаются, поедаются и заселяются дрейсеной [5]. Харовые водоросли разлагаются медленнее большинства других видов водных растений из-за высокого обызвествления клеточных оболочек, но при этом они являются излюбленным субстратом для закрепления некрупных моллюсков *D. polymorpha*. Предпочтение дрейсеной того или иного вида водных растений также связано с количеством доступных мест для прикрепления. Так, макрофиты вроде рдеста или теллореза будут менее благоприятным субстратом, поскольку единственными подходящими местами для прикрепления служат основания (пазухи) листьев этих растений. В то же время хара, элодея и роголистник являются гораздо более удобным для заселения субстратом. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что численность дрейсены в водоемах будет различаться в зависимости от таксономического состава макрофитов.

Характеристика исследуемых озер

Первым из трех исследуемых Нарочанских озер дрейсена заселила оз. Баторино, и численность популяции моллюска там стабилизировалась раньше всего. К сожалению, точное время вселения дрейсены неизвестно, поскольку факт вселения был установлен к тому моменту, когда численность популяции

достигла достаточно высоких значений. К 1993 г., судя по всему, численность популяции дрейсены в оз. Баторино уже стабилизировалась и была ниже, чем в озерах Мясро и Нарочь [6]. По данным долгосрочного мониторинга состояния популяции известно, что с 1993 по 2002 г. плотность и биомасса дрейсены в оз. Баторино изменялись незначительно, составляя в среднем от 456 до 636 экз./м² и от 176,58 до 224,06 г/м² соответственно.

Следующим водоемом в системе Нарочанских озер, куда вселилась дрейсена, было оз. Мясро. Первые задокументированные находки дрейсены здесь датируются 1984 г. [7], а первые подробные исследования популяции моллюска проведены в 1993 г. [8].

Последним из исследуемых водоемов дрейсена заселила оз. Нарочь. В 1990 г. она была обнаружена в районе впадения прот. Скемы из оз. Мясро. Основным субстратом для дрейсены в тот период являлись раковины унионид, погруженные макрофиты и камни. Первые оценки плотности популяции моллюска в оз. Нарочь проведены А. Ю. Каратаевым и Л. Е. Бурлаковой [6; 8]. В пересчете на всю площадь дна оз. Нарочь средние плотность и биомасса дрейсены в 1990 г. были небольшими и составляли (7,4 ± 3,0) экз./м² и (1,5 ± 0,6) г/м² соответственно. Однако в следующие несколько лет, как это характерно для многих инвазивных видов, произошел «взрывообразный» рост популяции дрейсены, и уже к 1993 г. ее плотность в оз. Нарочь возросла в 103 раза, а биомасса – в 68 раз, составив в среднем (763 ± 149) экз./м² и (99 ± 30) г/м² соответственно. К этому времени дрейсена заселила все пригодные субстраты, в основном развиваясь на погруженных макрофитах, и продвинулась в глубь озера (до 8 м). В 1995 г. общая численность популяции моллюска в оз. Нарочь стабилизировалась и, по оценкам авторов работы [6], сохранялась таковой вплоть до 2002 г. В 2005 г. согласно данным дночерпательных проб в мае и октябре средневзвешенные величины плотности и биомассы дрейсены в озере составляли (1508 ± 221) экз./м² и (158,4 ± 17,9) г/м² соответственно [9], что также близко к значениям, полученным в конце 1990-х – начале 2000-х гг.

Макрофиты в Нарочанских озерах представлены 53 видами, из которых 28 видов – это воздушно-водные растения и растения с плавающими листьями. Глубина распространения погруженных макрофитов достигает 8 м [10–12]. Исходя из результатов исследования, в последнее время наблюдается тенденция к увеличению глубины распространения макрофитов. Считается, что это связано с увеличением прозрачности воды в результате реализации схемы комплексного использования и охраны водных и земельных ресурсов бассейна оз. Нарочь, принятой постановлением Совета Министров БССР от 9 октября 1981 г. № 325, что существенно снизило антропогенную нагрузку на Нарочанские озера. Кроме того, значительный вклад в увеличение прозрачности воды внесло интенсивное развитие популяции моллюска *D. polymorpha*, который является активным фильтратором [13]. Согласно экспериментальным данным на пике численности популяция дрейсены была способна отфильтровать весь объем воды в оз. Нарочь трижды за год [11].

Характеристика оз. Нарочь. Озеро Нарочь относится к бассейну р. Неман и является крупнейшим озером на территории Беларуси, занимая площадь 79,2 км². Максимальная глубина достигает 24,8 м, средняя глубина – 8,9 м. Глубины до 5 м составляют приблизительно 36 % от площади озера [10; 14]. Полуостров Наносы разделяет водную поверхность на малый и большой плесы, занимающие северо-западную и юго-восточную части озера. Общая площадь водосбора вместе с акваториями других Нарочанских озер составляет 279 км², а без них – 199 км² [14; 15]. Карта и батиметрическая схема оз. Нарочь представлены на рис. 2.

Озеро Нарочь характеризуется обширной мелководной прибрежной зоной. Дно песчано-илистое, встречаются участки, покрытые крупной галькой и валунами, и небольшие заиленные участки. Берег озера в большинстве своем низкий, песчаный или супесчаный, однако имеются участки с крутым и абразивным берегом. Так, в окрестностях д. Черевки высота берега достигает 12 м. Более того, в этой части озера берег подостлан валунами, тогда как на юго-востоке водоема он преимущественно заболочен. Подток кислых вод со стороны оз. Белое влияет на рН воды в южной части оз. Нарочь. Трофический статус озера оценен как олигомезотрофный [14; 15]. Совокупность этих характеристик определяет высокую рекреационную ценность водоема.

Территория к северу и востоку от оз. Нарочь в основном занята зоной регулируемого использования. Участки заповедной зоны преимущественно расположены на юге и юго-востоке. Земли, прилегающие к озеру с северо-западной стороны, полностью заняты рекреационной зоной, где находятся 12 стационарных объектов, включая различные санатории, туристические стоянки и т. д. На территории озера также практикуется любительское рыболовство [14; 15].

Характеристика оз. Мясро. Озеро Мясро соединено с оз. Нарочь прот. Скемой, протяженность русла которой составляет всего 0,2 км. Площадь оз. Мясро равна 13,1 км². Максимальная глубина достигает 11,3 м, средняя глубина – 5,4 м. Водосборная территория небольшая. Форма озера вытянутая, береговая линия извилистая с множеством заливов. Карта и батиметрическая схема оз. Мясро представлены на рис. 3.

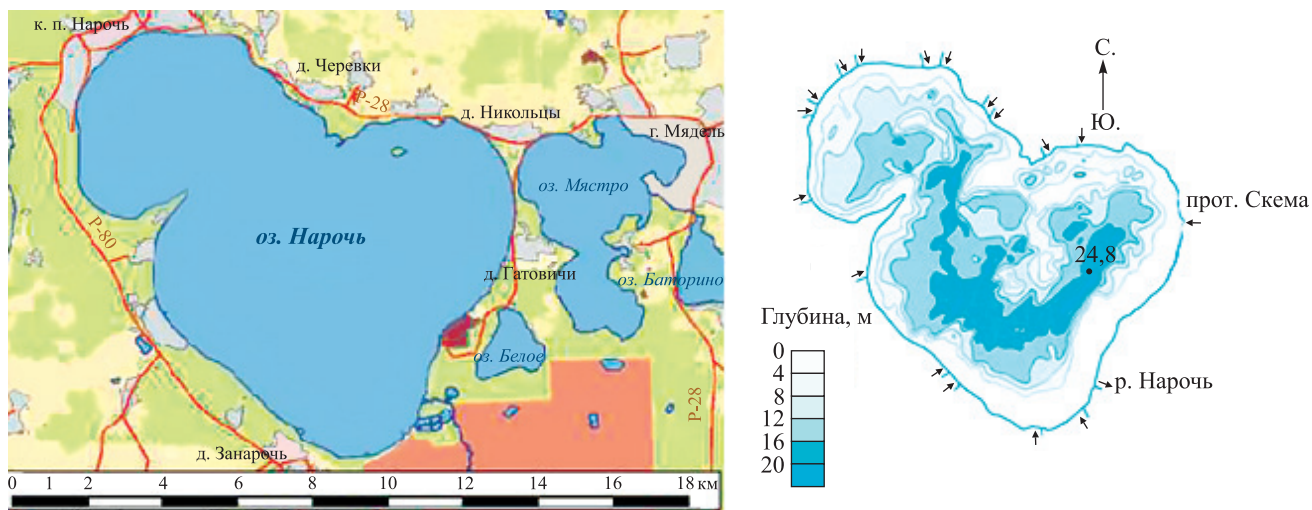


Рис. 2. Карта и батиметрическая схема оз. Нарочь.
 Источник: [15]
 Fig. 2. Map and bathymetric diagram of Naroch Lake.
 Source: [15]

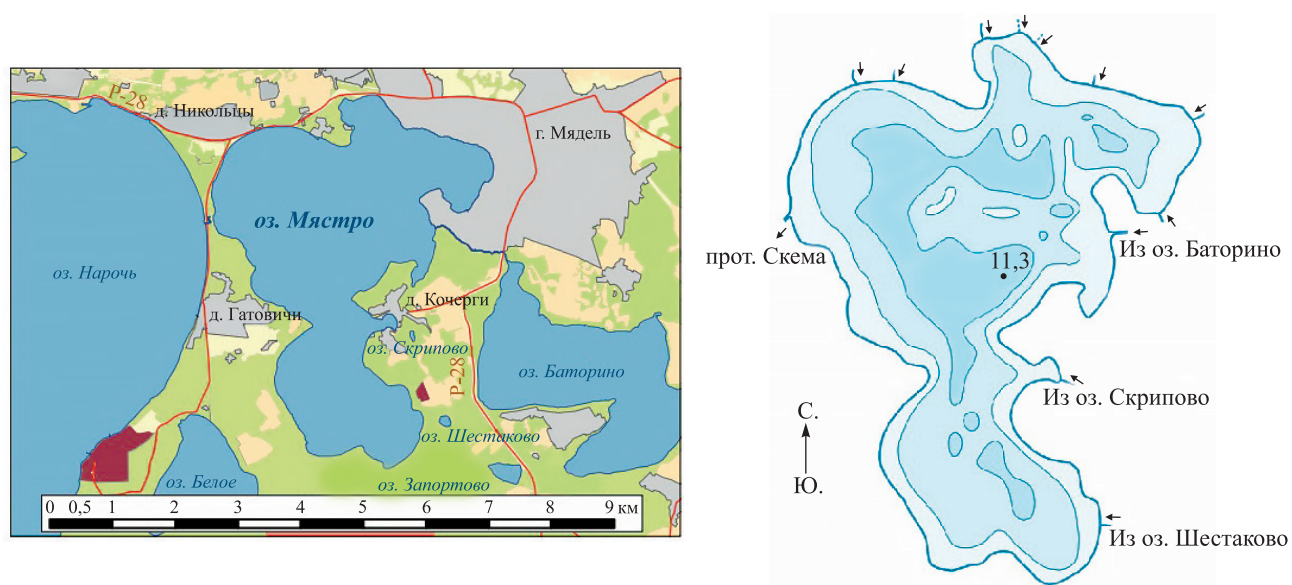


Рис. 3. Карта и батиметрическая схема оз. Мястро.
 Источник: [15]
 Fig. 3. Map and bathymetric diagram of Myastro Lake.
 Source: [15]

Характеристика оз. Баторино. По данным геоинформационной системы Национального парка «Нарочанский», площадь оз. Баторино равна 6,25 км². Максимальная глубина достигает 5,5 м, средняя глубина – 2,4 м. Глубины до 2 м составляют около 30 % от площади озера. Тип перемешивания определен как полимиктический, трофический статус оценен как эвтрофный. Время полного водообмена озера составляет 1 год. Площадь водосбора без учета акватории других Нарочанских озер достаточно большая (86,2 км²). Дно песчано-илистое, в центральной части водоема сильно заиленное (глубина донных отложений там превышает 10 м) [15]. Карта и батиметрическая схема оз. Баторино представлены на рис. 4.

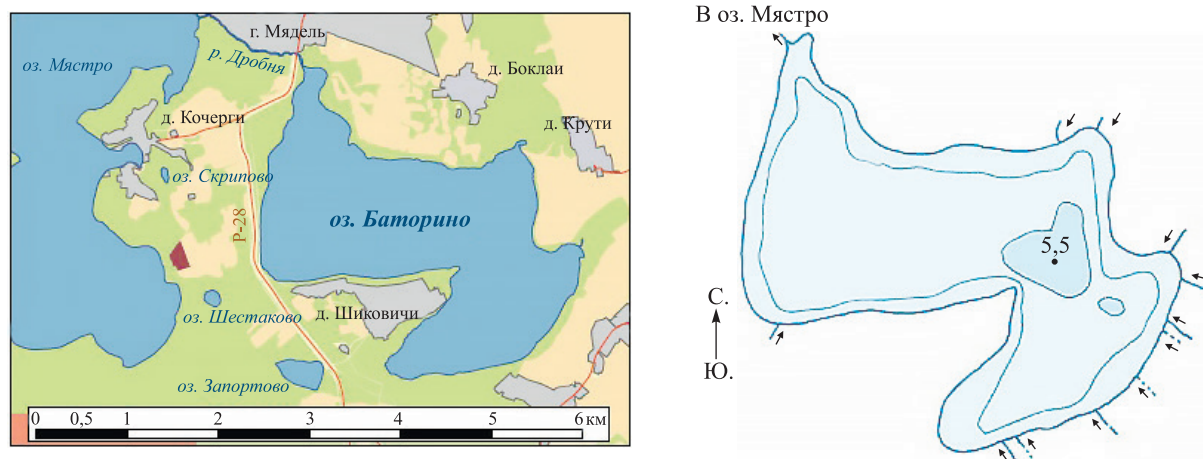


Рис. 4. Карта и батиметрическая схема оз. Баторино.

Источник: [15]

Fig. 4. Map and bathymetric diagram of Batorino Lake.

Source: [15]

Методы исследования

В июне – августе 2016 г. и июне – сентябре 2017 г. была проведена оценка плотности и биомассы дрейсену посредством масштабной подводной съемки и ручного сбора проб моллюсков с макрофитов и донных грунтов дайверами с использованием легководолазного снаряжения. Это исследование, выполненное после достаточно большого перерыва в соответствии со схемой предыдущих лет [6; 16], позволило оценить современное состояние популяции дрейсену и сопоставить полученные результаты с данными 20-летней давности. Всего в 2016–2017 гг. в оз. Нарочь было обследовано 9 полуразрезов, идущих от прибрежной зоны до глубины максимального распространения погруженных макрофитов (8 м): трансекты 1–3 расположены в малом плесе озера, а трансекты 4–9 – в большом плесе. Общее количество глубоководных станций на оз. Нарочь составило 46. В 2018 г. в оз. Мясстро были обследованы 4 полуразреза на глубине 0,5–5,0 м. Общее количество глубоководных станций на оз. Мясстро составило 13. Дрейсену собирали вручную с использованием рамки размером 0,5 × 0,5 м. В пределах рамки изымали макрофиты и брали образцы грунта под ними. В оз. Баторино в 2018 г. аналогичным способом были обследованы 7 глубоководных станций. Расположение трансект показано на рис. 5.

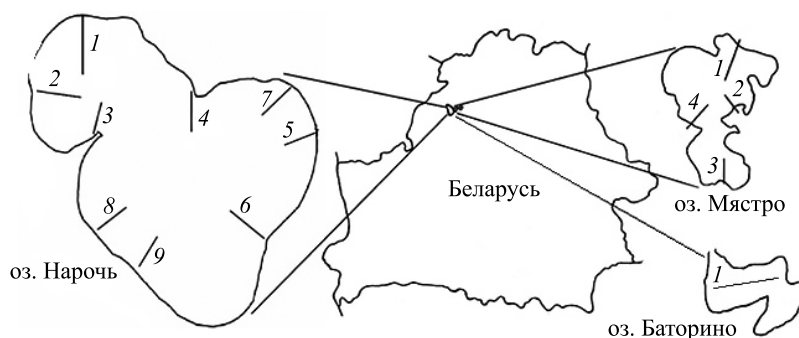


Рис. 5. Схема расположения трансект (озера Нарочь, Мясстро и Баторино) при сборе проб дрейсену в 2016–2018 гг.

(аналогична таковой при сборе проб дрейсену в 1999–2002 гг.)

Fig. 5. Layout of transects (Naroch, Myastro and Batorino lakes) for zebra mussel sampling in 2016–2018

(similar to that for zebra mussel sampling in 1999–2002)

Погруженные макрофиты, как и дрейсену, собирали вдоль трансект вручную с использованием рамки размером 0,5 × 0,5 м, станции отбора проб закладывали при возрастании глубины на каждый метр или при смене растительных ассоциаций (как показано на рис. 6). Параллельно со сбором материала осуществляли видеосъемку дна для дальнейшего картирования макрофитов и оценки вклада тех или иных родов макрофитов в состав фитоценоза. Подробно процесс регистрации макрофитных сообществ описан в разделе «Картирование погруженных макрофитов с помощью видеосъемки».



Рис. 6. Отбор проб дрейсенны и сопутствующих образцов донного грунта и макрофитов в оз. Нарочь в 2016 г.

Fig. 6. Sampling of zebra mussel and related samples of bottom soil and macrophytes in the Naroch Lake in 2016

Наряду с глубоководными станциями в литорали водоемов были обследованы мелководные станции. Всего на оз. Нарочь заложено 13 мелководных станций, на оз. Мястро – 7 станций, а на оз. Баторино – 2 станции. Во время съемки в 2016–2018 гг. участки литорали озер Нарочь, Мястро и Баторино исследовали визуально и с использованием рамки размером $0,5 \times 0,5$ м.

Все отобранные пробы разделяли на составные компоненты для дальнейшего учета. Образцы грунта анализировали по таким показателям, как плотность, процент влажности и доля золы¹. Макрофиты очищали от прикрепленных особей дрейсенны, определяли их таксономическую принадлежность, массу во влажном и воздушно-сухом состоянии.

В собранных пробах особей дрейсенны, прикрепленных к макрофитам, и особей дрейсенны, находящихся в грунте, учитывали отдельно для дальнейшего установления биотопической приуроченности. Моллюсков с каждой станции пересчитывали и взвешивали, измеряли морфометрические параметры раковин (длину, ширину и высоту).

Для выявления наличия зависимости численности и биомассы дрейсенны от рода макрофитов, на которых она развивается, проанализированные пробы были разделены на следующие категории: 1) пробы, где не было макрофитов (субстрат без макрофитов); 2) пробы, где все макрофиты относились к одному роду (хара, элодея и др.); 3) пробы, где макрофиты были представлены несколькими родами (смесь).

При обработке количественных данных использовали статистические методы с применением персонального компьютера и программных пакетов *Microsoft Excel* и *Statistica 8.0*.

Картирование погруженных макрофитов с помощью видеосъемки

Параллельно с отбором проб проводили видеосъемку по трансектам. По заранее намеченному маршруту в придонном слое двигались дайверы, снабженные видеокамерой, рамкой и тканевыми мешками для отбора проб. По поверхности воды на лодке за ними следовали члены исследовательской группы, которые ориентировались на местоположение дайверов и корректировали их маршрут с помощью надувного буйка, прикрепленного тросом к одному из аквалангов. Кроме того, данный буюк использовался в целях подачи условного сигнала к сбросу дайверам троса с грузом, на который они закрепляли заполненные пробами мешки для поднятия их в лодку, а также в целях передачи дайверам новых мешков. Место отбора каждой пробы фиксировали с помощью GPS-навигатора фирмы *Garmin* (США). Дайверы были снабжены приборами, отображающими время, текущую глубину и температуру воды. Запись этих показателей велась непрерывно. Периодически дисплей прибора помещали в объектив видеокамеры для более удобного отслеживания положения дайверов по видеозаписи, а также для определения глубины той или иной станции отбора проб. Впоследствии эта информация передавалась на специальное программное обеспечение *Suunto DM5*, снимающее данные с прибора и представляющее их в виде графика. Анализ полученных графиков позволил уточнить глубину, на которой находилась станция, в случае невозможности определения этого показателя по видеозаписи [12].

Видеосъемка велась с помощью видеокамеры фирмы *GoPro* (США), оснащенной водонепроницаемым чехлом, не влияющим на качество записи. Обеспечиваемое качество видеоматериала недостаточно для точной видовой идентификации растительных субстратов, однако приемлемо для определения растений до рода (телорез, элодея и т. д.) или отдела (в случае с харовыми водорослями) и описания различных растительных ассоциаций, как видно из фотографий, представленных на рис. 7 и 8.

¹ГОСТ 5180-2015. Грунты. Методы лабораторного определения физических характеристик. Взамен ГОСТ 5180-84 ; введ. 01.04.2016. М. : Стандартиформ, 2019. 23 с.

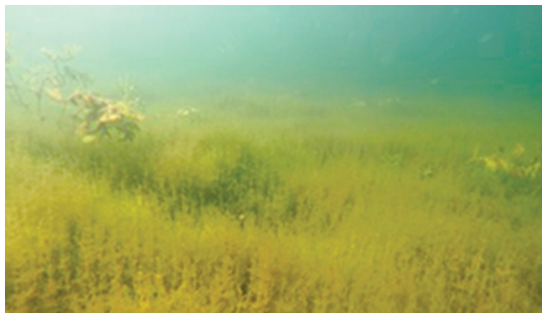


Рис. 7. Снимок зарослей хары
Fig. 7. A snapshot of *Chara* thickets

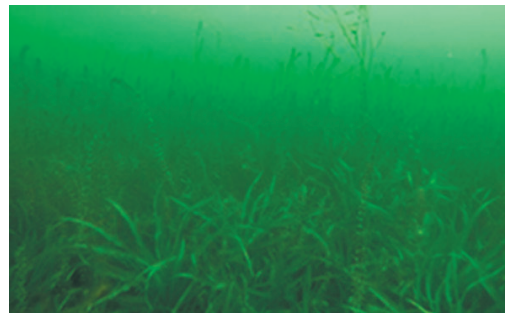


Рис. 8. Снимок зарослей телореца и элодеи
Fig. 8. A snapshot of *Stratiotes* and *Elodea* thickets

Распределение погруженных макрофитов

По составу погруженной растительности оз. Нарочь делится на три части: малый плес, где представлены три макрофитных пояса (пояс хары, пояс элодеи и смешанный мозаичный пояс), а также север и юго-запад большого плеса, где из состава растительности выпадает пояс элодеи.

Первым и наиболее очевидным отличием погруженной растительности большого плеса от погруженной растительности малого плеса является отсутствие отдельного пояса элодеи. Погруженные макрофиты на больших глубинах в разных частях озера представлены различными растительными ассоциациями (как моновидовыми, так и смешанными). Элодея же в большом плесе встречается лишь в составе смешанных растительных ассоциаций на некоторых участках озера.

В большом плесе обнаружено несколько растительных ассоциаций. В восточной части озера представлены преимущественно заросли хары с практически полным отсутствием иных макрофитов.

Сравнивая распределение макрофитов по трансектам большого плеса, можно заметить два паттерна распределения: плавное снижение плотности (трансекты 6 и 9) и распределение со скачком плотности на средних глубинах (трансекты 5, 7 и 8). Данные отличия не объясняются различиями в батиметрии озера на этих участках, поскольку в обоих случаях на части станций происходят резкие изменения глубины.

Для удобства использования выделенные участки нанесены на батиметрические карты, представленные на рис. 9 и 10.

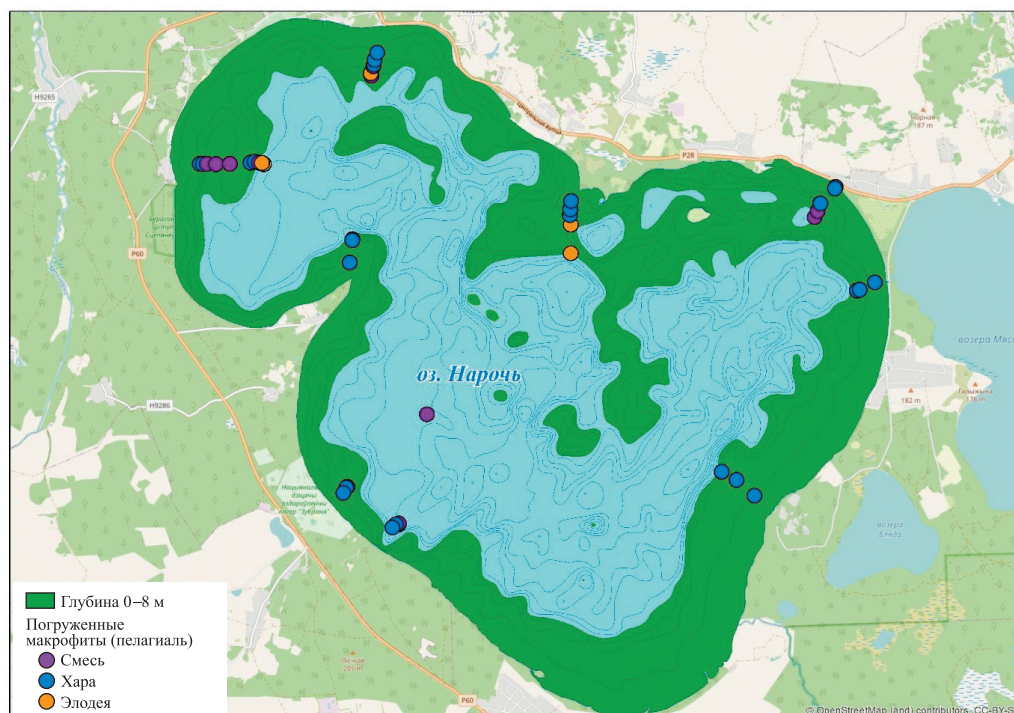


Рис. 9. Карта-схема зарастания оз. Нарочь в 2016–2017 гг.

Fig. 9. Map-scheme of Naroch Lake macrophytes overgrowing in 2016–2017

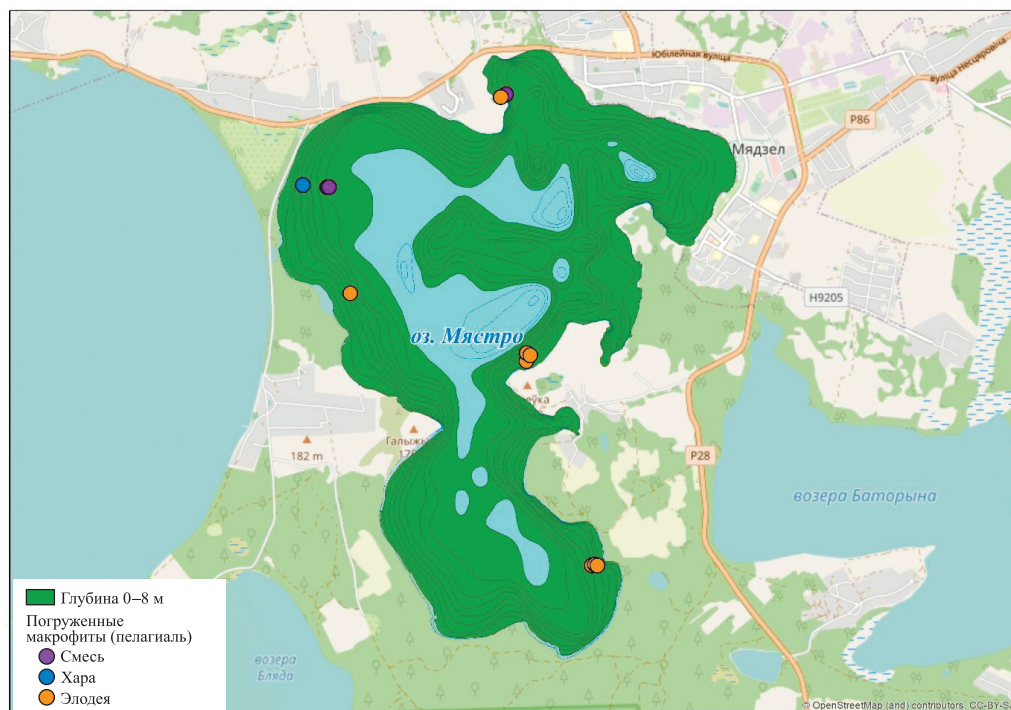


Рис. 10. Карта-схема зарастания оз. Мястро в 2018 г.

Fig. 10. Map-scheme of Myastro Lake macrophytes overgrowing in 2018

Результаты и их обсуждение

Озера Нарочь, Мястро и Баторино составляют единую систему, но отличаются друг от друга по многим гидробиологическим параметрам, в том числе по структуре макрофитобентоса.

Озеро Нарочь. Для макрофитного сообщества оз. Нарочь характерна относительно малая площадь зарастания береговой линии воздушно-водной растительностью. Растения с плавающими листьями формируют здесь лишь малые скопления (в отличие от других Нарочанских озер). Погруженная растительность на мелководье образует пояс хары. Мелководная зона в оз. Нарочь очень протяженная, поэтому пояс хары достаточно широкий. На больших глубинах растительность образует мозаичный пояс с участками зарастания элодеей. В целом наиболее распространенными в озере являются харовые водоросли и макрофиты родов *Potamogeton*, *Elodea*.

Плотность и биомасса дрейсены на анализируемых категориях растительного субстрата распределились в оз. Нарочь в соответствии с гистограммами, представленными на рис. 11.

Полученные данные показывают, что в оз. Нарочь харовые водоросли являются интенсивно заселяемым дрейсенной растительным субстратом. Это соответствует информации из литературных источников [1]. Однако вопреки ожиданиям средние значения анализируемых показателей в пробах, где встречались различные роды макрофитов, несколько выше, чем в пробах, где встречалась только хара. В смешанных пробах в оз. Нарочь попадались следующие макрофиты: *Chara*, *Ceratophyllum*, *Elodea*, *Potamogeton*, *Stratiotes*, *Fontinalis*. При более высоких средних значениях плотности и биомассы в пробах со смешанным субстратом ($(1642,51 \pm 2196,90)$ экз./м² и $(249,07 \pm 292,30)$ г/м²) по сравнению с таковыми в пробах, где субстратом является только хара ($(1167,95 \pm 1472,47)$ экз./м² и $(221,08 \pm 216,78)$ г/м²), стандартные отклонения (\pm SD) от средних значений плотности и биомассы в 1,5 и 1,4 раза выше. Это указывает на то, что развитие дрейсены в больших количествах на харовых водорослях происходит стабильнее, чем на смешанном растительном субстрате. Можно предположить, что разнородные растения более плотно заполняют объем толщи воды в придонном слое по вертикали.

Озеро Мястро. В оз. Мястро треть береговой линии покрыта воздушно-водной растительностью. Доминирует камыш, часто в ассоциациях с тростником. Растения с плавающими листьями формируют достаточно крупные участки в местах с сильно заиленным грунтом. Погруженная растительность образует участки зарослей хары на северном берегу и участки зарослей элодеи на южном. Больше всего распространен вид *Elodea canadensis*.

Плотность и биомасса дрейсены на анализируемых категориях растительного субстрата в оз. Мястро приведены на рис. 12.

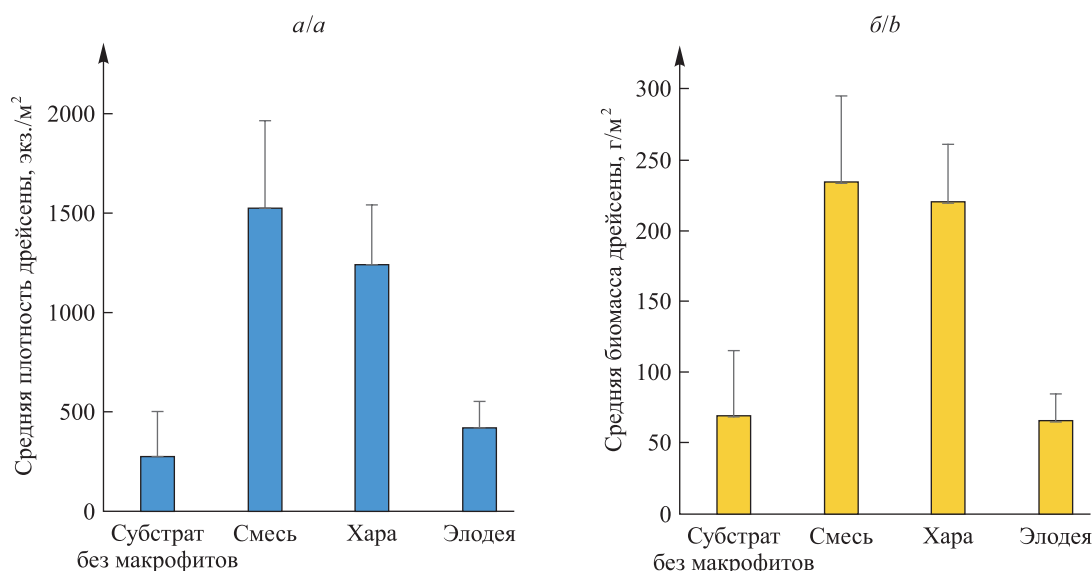


Рис. 11. Средние значения плотности (а) и биомассы (б) *D. polymorpha* на различных группах растительного субстрата в оз. Нарочь в 2016–2017 гг. На гистограммах отмечены стандартные ошибки средних

Fig. 11. Average values of *D. polymorpha* density (a) and biomass (b) on different groups of plant substrate in the Naroch Lake in 2016–2017. The histograms indicate the standard errors of the means

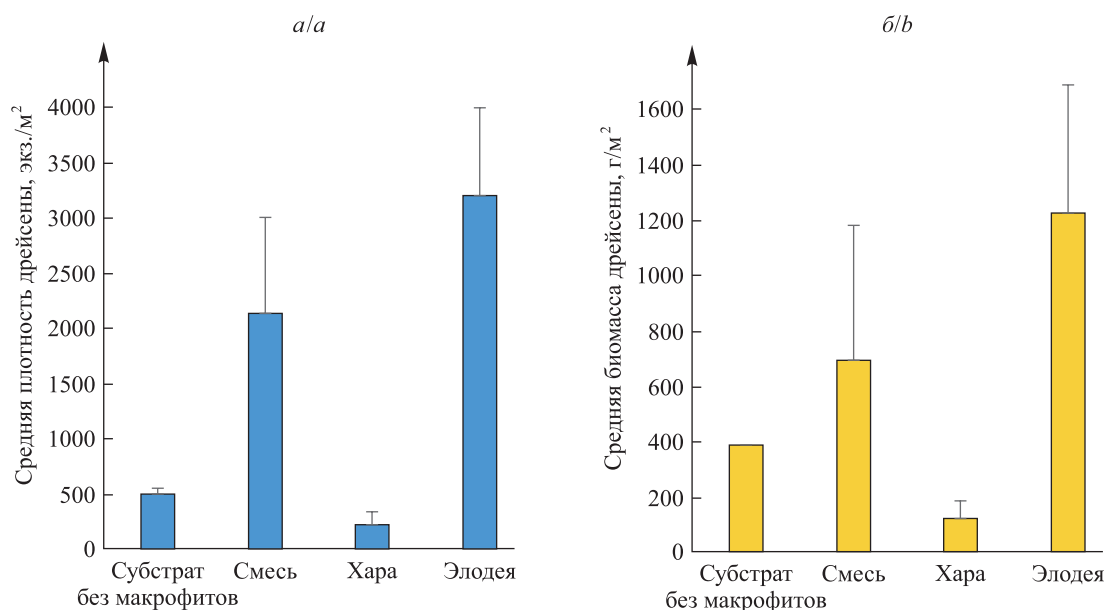


Рис. 12. Средние значения плотности (а) и биомассы (б) *D. polymorpha* на различных группах растительного субстрата в оз. Мястро в 2018 г. На гистограммах отмечены стандартные ошибки средних

Fig. 12. Average values of *D. polymorpha* density (a) and biomass (b) on different groups of plant substrate in the Myastro Lake in 2018. The histograms indicate the standard errors of the means

Как видно из представленных на рис. 12 гистограмм, наибольшие средние значения плотности и биомассы дрейсены выявлены в пробах, где субстратом была элодея канадская. В отличие от оз. Нарочь, где хара встречается в больших количествах, особенно на мелководье, доминантом среди растительных ассоциаций в оз. Мястро является элодея. Соответственно, в оз. Мястро элодея служит основным субстратом для закрепления дрейсены ввиду высокой плотности зарослей (аналогично харе в оз. Нарочь). Однако при сравнении распространения дрейсены на харе и элодее в обоих водоемах можно сделать вывод, что элодея все же является более предпочтительным субстратом для дрейсены. Средние значения плотности и биомассы дрейсены на харе и элодее в озерах Нарочь и Мястро представлены в табл. 1.

Таблица 1

Значения плотности и биомассы *D. polymorpha* на харе и элодее в озерах Нарочь и Мясстро в 2016–2018 гг.

Table 1

Values of density and biomass of *D. polymorpha* on the *Chara* and on the *Elodea* in Naroch and Myastro lakes in 2016–2018

Показатели	Нарочь	Мясстро
Плотность дрейсены на харе, экз./м ²	1167,95 ± 1472,47	175,30 ± 188,15
Биомасса дрейсены на харе, г/м ²	221,08 ± 216,78	96,57 ± 108,18
Плотность дрейсены на элодее, экз./м ²	414,00 ± 258,09	3998,00 ± 1432,28
Биомасса дрейсены на элодее, г/м ²	65,23 ± 38,47	1562,87 ± 1166,43

Примечание. Данные представлены как среднее значение ± SD.

Результаты сравнения значений плотности и биомассы дрейсены на харе и элодее в озерах Нарочь и Мясстро с помощью теста Манна – Уитни представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты сравнения значений плотности и биомассы *D. polymorpha* на харе и элодее в озерах Нарочь и Мясстро в 2016–2018 гг.

Table 2

Results of comparison of density and biomass values of *D. polymorpha* on the *Chara* and on the *Elodea* in Naroch and Myastro lakes in 2016–2018

Растительный субстрат	Растительный субстрат			
	Хара в оз. Нарочь	Хара в оз. Мясстро	Элодея в оз. Нарочь	Элодея в оз. Мясстро
Хара в оз. Нарочь	–	0,086/0,222	0,246/0,113	0,002/0,004
Хара в оз. Мясстро	0,086/0,222	–	0,150/0,772	0,011/0,019
Элодея в оз. Нарочь	0,246/0,113	0,150/0,772	–	0,011/0,011
Элодея в оз. Мясстро	0,002/0,004	0,011/0,019	0,011/0,011	–

Примечание. Данные представлены как значение *p*-критерия по результатам теста Манна – Уитни при сравнении значений плотности/биомассы дрейсены, собранной с 1 м² на различных растительных субстратах.

Сравнение выборок дрейсены, собранных на харе и элодее в озерах Нарочь и Мясстро, показывает, что основным субстратом для развития дрейсены в оз. Нарочь является хара, а в оз. Мясстро – элодея. На фоне более высокой численности, а также большей индивидуальной массы особей дрейсены в оз. Мясстро средние значения плотности и биомассы моллюска на элодее статистически значимо выше в оз. Мясстро [4]. Такую разницу между заселенностью дрейсеной элодеи в двух близко расположенных водоемах можно объяснить тем, что в оз. Мясстро формируются исключительно плотные заросли элодеи, тогда как в оз. Нарочь элодея не образует такого плотного ковра. Значительную часть донного грунта в оз. Нарочь покрывают харовые водоросли.

Озеро Баторино. В оз. Баторино наблюдается достаточно обширное развитие пояса растений с плавающими листьями, которые не очень подходят для закрепления на них дрейсены. Наиболее часто встречающимися погруженными макрофитами являются рдесты. Из-за сильной заиленности донного грунта и небольшой представленности макрофитов в оз. Баторино дрейсена развивается там в малых количествах. Из 7 обследованных глубоководных станций в оз. Баторино она присутствовала лишь на 3 станциях. Наибольшая плотность дрейсены (121 экз./м²) обнаружена на станции с густыми зарослями рдеста блестящего (*Potamogeton lucens*). Биомасса моллюска на этой станции составила 154,15 г/м². На станции, где в качестве субстрата выступали растения кубышки желтой (*Nuphar lutea*), плотность дрейсены достигала 14 экз./м² при биомассе 21,89 г/м². На станции, с которой были собраны кубышка желтая, рдест плавающий (*P. natans*) и телорез алоэвидный (*Stratiotes aloides*), обнаружено всего 4 особи дрейсены на 1 м² общей массой 0,51 г.

Заключение

Анализ зависимости плотности и биомассы дрейсены от характера растительного субстрата позволяет заключить, что основным субстратом для развития моллюска в оз. Нарочь являются харовые водоросли и смешанные растительные ассоциации. В оз. Мясстро наибольшие показатели плотности и биомассы

отмечены для проб, где в качестве растительного субстрата выступала элодея канадская. В оз. Баторино общая численность дрейсены низкая из-за недостатка подходящего растительного субстрата и сильной заиленности донного грунта. В небольших количествах дрейсена обнаружена там лишь на рдесте плавающим. По всей видимости, на то, насколько плотно дрейсена заселяет те или иные типы растительных субстратов, влияют в основном морфология макрофитов и плотность их произрастания. В свете отмеченной по результатам видеосъемки макрофитной поясности озер Нарочь и Мясстро и неравномерности заселения дрейсеной разных макрофитов выясняются дополнительные факторы, обеспечивающие различия между средними и средневзвешенными значениями плотности и биомассы популяции дрейсены, помимо площади донного грунта в различных батиметрических зонах водоема.

Библиографические ссылки

1. Старобогатов ЯИ, редактор. *Дрейсена: систематика, экология, практическое значение*. Москва: Наука; 1994. 240 с.
2. Крюк ДВ, Жукова АА. Биотопическое распространение инвазивного вида – *Dreissena polymorpha* (Mollusca, Bivalvia) в озере Нарочь (Беларусь) в 2016–2017 гг. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2021;4:28–35.
3. Karatayev AY, Burlakova LE. What we know and don't know about the invasive zebra (*Dreissena polymorpha*) and quagga (*Dreissena rostriformis bugensis*) mussels? *Hydrobiologia*. 2022;special number. DOI: 10.1007/s10750-022-04950-5.
4. Крюк ДВ, Жукова АА, Адамович БВ. Сравнительная характеристика размерной структуры *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) на различных субстратах в озерах Нарочь и Мясстро (Беларусь). *Вестник Фонда фундаментальных исследований*. 2022; 1:153.
5. Жукова АА, Жукова ТВ, Макаревич ОА, Остапеня АП. Роль полупогруженных макрофитов в функционировании Нарочанских озер. В: Пилипенко ВН, Кособокова СР, редакторы. *Экология биосистем: проблемы изучения, индикации и прогнозирования. Материалы II Международной научно-практической конференции; 25–30 августа 2009 г.; Астрахань, Россия*. Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет»; 2009. с. 295–299.
6. Burlakova LE, Karatayev AY, Padilla DK. Changes in the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* within lakes through time. *Hydrobiologia*. 2006;571(1):133–146. DOI: 10.1007/s10750-006-0234-9.
7. Protasov AA. Conceptual models of the contourization processes in the aquatic ecosystems. *Hydrobiological Journal*. 2014; 50(1):3–19. DOI: 10.1615/HydrobJ.v50.i1.10.
8. Каратаев АЮ, Бурлакова ЛЕ. Роль дрейсены в озерных экосистемах. *Экология*. 1995;3:232–236.
9. Жукова АА, Адамович БВ, Крюк ДВ, Панько АЮ. Состояние популяции дрейсены в оз. Нарочь по данным съемки 2016 г. В: Янчуревич ОВ, редактор. *Зоологические чтения – 2017. Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Константина Михайловича Ельского; 15–17 марта 2017 г.; Гродно, Беларусь*. Гродно: ГрГУ имени Янки Купалы; 2017. с. 87–90.
10. Винберг ГГ, редактор. *Экологическая система Нарочанских озер*. Минск: Издательство «Университетское»; 1985. 303 с.
11. Каратаев АЮ, Бурлакова ЛЯ. Сучасны стан і перспектывы развіцця дрэйсены *Dreissena polymorpha* Pallas у Нарачанскіх азёрах. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2005;2:95–99.
12. Крюк ДВ, Жукова АА. Картирование погруженных макрофитов озера Нарочь (Беларусь) при помощи видеосъемки. В: Ильмаст НВ, редактор. *Заповедники и национальные парки – научно-исследовательские лаборатории под открытым небом. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием; 12–14 октября 2021 г.; Петрозаводск, Россия*. Петрозаводск: КарНЦ РАН; 2021. с. 33–36.
13. Жукова ТВ, Остапеня АП. Оценка эффективности природоохранных мероприятий на водосборе Нарочанских озер. *Природные ресурсы*. 2000;3:68–73.
14. Остапеня АП, Ковалев АА. *Экологический паспорт озера Нарочь. РНТЦ «Экомир», № 14 [препринт]*. Минск: [б. и.]; 1993. 95 с.
15. Ляштык ВС, Жукова ТВ, редакторы. *Водные ресурсы Национального парка «Нарочанский»*. Минск: Рифтур принт; 2012. 128 с.
16. Мастоцкий СЭ, Верес ЮК, Найрович ОА, Кондобаров СЮ. Роль дрейсены (*Dreissena polymorpha*) в структуре малакологического комплекса озера Нарочь. В: Кундас СП, Океанов АБ, Позняк СС, редакторы. *Сахаровские чтения 2006 года: экологические проблемы XXI века. Материалы 6-й Международной научной конференции; 18–19 мая 2006 г.; Минск, Беларусь. Часть I*. Минск: МГЭУ имени А. Д. Сахарова; 2006. с. 322–324.

References

1. Starobogatov YaI, editor. *Dreissena: sistematika, ekologiya, prakticheskoe znachenie* [*Dreissena: systematics, ecology, practical significance*]. Moscow: Nauka; 1994. 240 p. Russian.
2. Kruk DV, Zhukava NA. Biotopic distribution of invasive species – *Dreissena polymorpha* (Mollusca, Bivalvia) in lake Naroch (Belarus) in 2016–2017. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2021;4:28–35. Russian.
3. Karatayev AY, Burlakova LE. What we know and don't know about the invasive zebra (*Dreissena polymorpha*) and quagga (*Dreissena rostriformis bugensis*) mussels? *Hydrobiologia*. 2022;special number. DOI: 10.1007/s10750-022-04950-5.
4. Kryuk DV, Zhukova AA, Adamovich BV. Comparative characteristics of the size structure of *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) on various substrates in lakes Naroch and Myastro (Belarus). *Vestnik Fonda fundamental'nykh issledovaniy*. 2022;1:153. Russian.
5. Zhukova AA, Zhukova TV, Makarevich OA, Ostapenya AP. [The role of semi-submerged macrophytes in the functioning of the Narochanskie lakes]. In: Pilipenko VN, Kosobokova SR, editors. *Ekologiya biosistem: problemy izucheniya, indikatsii i prognozirovaniya. Materialy II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 25–30 avgusta 2009 g.; Astrakhan', Rossiya* [Ecology of biosystems: problems of study, indication and forecasting. Materials of the II International scientific and practical conference; 2009 August 25–30; Astrakhan, Russia]. Astrakhan: Izdatel'skii dom «Astrakhanskii universitet»; 2009. p. 295–299. Russian.

6. Burlakova LE, Karatayev AY, Padilla DK. Changes in the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* within lakes through time. *Hydrobiologia*. 2006;571(1):133–146. DOI: 10.1007/s10750-006-0234-9.
7. Protasov AA. Conceptual models of the contourization processes in the aquatic ecosystems. *Hydrobiological Journal*. 2014; 50(1):3–19. DOI: 10.1615/HydrobJ.v50.i1.10.
8. Karataev AY, Burlakova LE. [The role of *Dreissena* in lake ecosystems]. *Ekologiya*. 1995;3:232–236. Russian.
9. Zhukova AA, Adamovich BV, Kryuk DV, Panko AY. [Status of the *Dreissena* population in the Naroch Lake according to the survey data of 2016]. In: Yanchurevich OV, editor. *Zoologicheskie chteniya – 2017. Sbornik statei Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi pamyati professora Konstantina Mikhailovicha El'skogo; 15–17 marta 2017 g.; Grodno, Belarus'* [Zoological readings – 2017. Collection of articles of the International scientific and practical conference dedicated to the memory of professor Konstantin Mikhailovich El'sky; 2017 March 15–17; Grodno, Belarus]. Grodno: Yanka Kupala State University of Grodno; 2017. p. 87–90. Russian.
10. Vinberg GG, editor. *Ekologicheskaya sistema Narochanskikh ozer* [Ecological system of the Narochansk lakes]. Minsk: Izdatel'stvo «Universitetskoe»; 1985. 303 p. Russian.
11. Karataev AY, Burlakova LYa. [Modern prospects for the development of *Dreissena polymorpha* Pallas in the Narochan Aze-ris]. *Izvestiya Natsional'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk*. 2005;2:95–99. Belarusian.
12. Kryuk DV, Zhukova AA. [Mapping of submerged macrophytes of Naroch Lake (Belarus) using video recording]. In: Il'mast NV, editor. *Zapovedniki i natsional'nye parki – nauchno-issledovatel'skie laboratorii pod otkrytym nebom. Materialy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem; 12–14 oktyabrya 2021 g.; Petrozavodsk, Rossiya* [Nature reserves and rescue parks are open-air research laboratories. Proceedings of the All-Russian scientific and practical conference with international participation; 2021 October 12–14; Petrozavodsk, Russia]. Petrozavodsk: KarNTs RAN; 2021. p. 33–36. Russian.
13. Zhukova TV, Ostapenya AP. Estimation of efficiency of nature protection measures in water catchment area of the Naroch lakes. *Prirodnye resursy*. 2000;3:68–73. Russian.
14. Ostapenya AP, Kovalev AA. *Ekologicheskii pasport ozera Naroch'. RNTTs «Ekomir», № 14* [preprint] [Ecological passport of Naroch Lake. RNTTs «Ekomir», No. 14]. Minsk: [s. n.]; 1993. 95 p. Russian.
15. Lyushtyk VS, Zhukova TV, editors. *Vodnye resursy Natsional'nogo parka «Narochanskii»* [Water resources of the National Park «Narochansky»]. Minsk: Riftur Print; 2012. 128 p. Russian.
16. Mastitskii SE, Veres YuK, Nayarovich OA, Kondobarov SYu. [The role of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the structure of the malacological complex of Naroch Lake]. In: Kundas SP, Okeanov AB, Poznyak SS, editors. *Sakharovskie chteniya 2006 goda: ekologicheskie problemy XXI veka. Materialy 6-i Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii; 18–19 maya 2006 g.; Minsk, Belarus'. Chast' I* [Sakharov readings – 2006: environmental problems of the 21st century. Proceedings of the 6th International scientific conference; 2006 May 18–19; Minsk, Belarus. Part 1]. Minsk: International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University; 2006. p. 322–324. Russian.

Получена 06.09.2023 / принята 07.09.2023.
Received 06.09.2023 / accepted 07.09.2023.

УДК 57.044

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ГЕМОЛИМФЕ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ПОВТОРЯЮЩЕМСЯ ГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Р. А. МАХОТИН¹⁾, А. В. СИДОРОВ¹⁾

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

Осуществляемая в течение 3 сут периодическая инкубация моллюсков 24-недельного возраста в 100 ммоль/л водном растворе глюкозы на протяжении 2 ч приводит к почти 5-кратному увеличению содержания глюкозы в гемолимфе по прошествии 24 ч после гипергликемического стресса. У животных 35-недельного возраста указанное воздействие не вызывает статистически достоверного изменения рассматриваемого показателя. Установлено, что уровень глюкозы в гемолимфе животных старшей возрастной группы (0,21 (0,13; 0,23) ммоль/л) превышал таковой для животных младшей возрастной группы (0,13 (0,08; 0,16) ммоль/л) в 1,6 раза. Предполагается, что выявленные особенности регуляции содержания глюкозы связаны с функциональными характеристиками пептидпродуцирующих нейросекреторных клеток центральных нервных ганглиев.

Ключевые слова: гомеостазис; гипергликемия; возраст; беспозвоночные.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б22-105).

Образец цитирования:

Махотин РА, Сидоров АВ. Возрастные особенности содержания глюкозы в гемолимфе моллюска *Lymnaea stagnalis* при повторяющемся гипергликемическом стрессе. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;3:81–87. EDN: ZSXSC

For citation:

Mahotin RA, Sidorov AV. Peculiarities of age-dependent glucose content in the haemolymph of the mollusc *Lymnaea stagnalis* under repeated hyperglycemic impact. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:81–87. Russian. EDN: ZSXSC

Авторы:

Родион Аркадьевич Махотин – студент биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Сидоров.
Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Rodion A. Mahotin, student at the faculty of biology. bio.mahotin@bsu.by
Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology. sidorov@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-1711-7868>

PECULIARITIES OF AGE-DEPENDENT GLUCOSE CONTENT IN THE HAEMOLYMPH OF THE MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* UNDER REPEATED HYPERGLYCEMIC IMPACT

R. A. MAHOTIN^a, A. V. SIDOROV^a

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

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

Periodic, for 3 days, incubation (2 h) of 24-week-old molluscs in a 100 mmol/L aqueous solution of glucose leads to an almost 5-fold increase in the glucose content in the haemolymph, 24 h after the hyperglycemic impact. For animals 35 weeks of age, this impact does not lead to a statistically significant change in the considered indicator. It was found that the level of glucose in the haemolymph of animals of the older age group (0.21 (0.13; 0.23) mmol/L) exceeded that of animals of the younger age group (0.13 (0.08; 0.16) mmol/L) in 1.6 times. It is assumed that these features of glucose regulation are associated with the functional characteristics of peptide-producing neurosecretory cells of the central nervous ganglia.

Keywords: homeostasis; hyperglycemia; age; invertebrates.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B22-105).

Введение

Глюкоза является веществом, которое не только обеспечивает метаболические потребности нервных клеток, но и выполняет функцию сигнальной молекулы, ответственной за формирование различных типов поведения у животных [1; 2]. С этих позиций становится понятной роль поддержания постоянного содержания глюкозы во внутренней среде организма и сдвигов ее уровня для успешного обеспечения жизнедеятельности. Очевидно, что различные этапы онтогенеза характеризуются разной степенью энергетических затрат, особенностями поведенческого паттерна и т. п., а следовательно, для каждого из них может существовать свое «нормативное» значение содержания глюкозы во внутренней среде [3]. С другой стороны, реакция животных (как позвоночных, так и беспозвоночных) на повышенную глюкозную нагрузку, связанную, например, с употреблением специфических пищевых субстратов, в возрастном аспекте не всегда однозначна и (или) линейна: нормальное старение ассоциируется со снижением потребления пищи на фоне повышенного содержания глюкозы во внутренней среде [4–6].

Ранее авторами была разработана модель транзитной экспериментальной гипергликемии, когда пролонгированная (2 ч) инкубация моллюсков *Lymnaea stagnalis* в высококонцентрированном (100 ммоль/л) водном растворе глюкозы приводила к увеличению содержания глюкозы в их гемолимфе примерно на порядок [7], что сопровождается модификацией электрических характеристик ряда пептидергических нервных клеток [8; 9]. Эффект инкубации сохранялся на протяжении 2 ч, после чего значения исследуемого показателя возвращались к первоначальному уровню. Вместе с тем влияние повторяющихся воздействий такого рода, моделирующих хроническое, а не острое действие фактора, рассмотрено не было. Кроме того, остался нерешенным вопрос о потенциальной стабильности и изменчивости уровня глюкозы в гемолимфе моллюсков *L. stagnalis* разного возраста, равно как и вопрос о том, насколько эффективны механизмы поддержания глюкозного гомеостаза на разных этапах жизненного цикла. Сказанное выше и определило проведение данного исследования.

Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis*, собранных в летний период на территории Минской области (мелкие мелиоративные каналы) или выращенных непосредственно в лаборатории. Всех животных содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре (25 ± 1) °С, проводя смену воды каждые 3 дня. Пищей служили листья салата и одуванчика (питание *ad libitum*).

У всех животных, введенных в эксперимент, с помощью линейки (цена деления 1 мм) фиксировали высоту раковины, определяемую как расстояние от ее вершины до нижней точки устья (в месте схождения коломеллярного и наружного краев), а также измеряли массу тела с раковинкой (с точностью до 0,1 г), используя весы Scout SC6010 (Ohaus, США). Возраст животных определяли по аллометрическим уравнениям Берталанфи на основании коэффициентов индивидуального роста для моллюсков *L. stagnalis* [10] как среднее арифметическое при расчете по данным о массе тела и высоте раковины.

Моллюски были разделены на две условные возрастные группы – младшую и старшую. В каждой из них выделены контрольная и экспериментальная серии, которые комплектовались животными одинакового размерного класса (см. таблицу). Попарное сравнение морфометрических показателей указанных серий не выявило статистически значимых различий между анализируемыми рядами данных ни для одной из пар сравнения.

Морфологические характеристики групп моллюсков
Morphological characteristics of the animal groups

Показатели	Младшая возрастная группа		Старшая возрастная группа	
	Контрольная серия ($n = 12$)	Экспериментальная серия ($n = 12$)	Контрольная серия ($n = 7$)	Экспериментальная серия ($n = 7$)
Масса тела, г	1,6 (1,3; 1,7)	1,3 (1,1; 1,5)	4,7 (3,5; 5,1)	5,1 (4,1; 5,8)
Достоверность различий	$z = 1,41; p = 0,16$		$z = 0,77; p = 0,44$	
Высота раковины, см	2,3 (2,2; 2,6)	2,7 (2,4; 2,8)	4,5 (4,3; 4,8)	4,7 (4,3; 5,5)
Достоверность различий	$z = 1,91; p = 0,06$		$z = 0,06; p = 0,95$	
Возраст, нед.	24 (22; 25)	24 (22; 26)	34 (29; 57)	35 (31; 44)
Достоверность различий	$z = 0,46; p = 0,64$		$z = 0,19; p = 0,85$	

Примечания: 1. Данные о массе тела, высоте раковины и возрасте животных представлены в следующем виде: медиана (верхний; нижний квартили). 2. Символ n – число наблюдений; z – U -критерий Манна – Уитни; p – уровень значимости.

Забор исходных проб гемолимфы (до глюкозной нагрузки) проводили отдельно у каждой особи в начальный день эксперимента. Для этого сильной тактильной стимуляцией ноги моллюска вызывали реакцию полного втягивания тела, сопровождающуюся выбросом гемолимфы (в среднем объеме около 1 мл). После указанной процедуры животных рассаживали в аквариумы объемом 10 л, заполненные отстоявшейся водопроводной водой с пищей, где они и находились до окончания опыта.

На следующий день (1-й день эксперимента) моллюсков экспериментальной серии на 2 ч помещали в аквариумы объемом 1 л со свежеприготовленным водным раствором D-глюкозы (100 ммоль/л). Животные контрольной серии находились в эквивалентных по объему аквариумах с отстоявшейся водопроводной водой, содержащей 50 ммоль/л NaCl (для выравнивания осмотической силы растворов). По окончании инкубации моллюсков обеих серий возвращали в начальные условия содержания. Данные процедуры повторяли на 2-й и 3-й дни эксперимента. Через 24 ч после их завершения (последний день эксперимента) повторно производили забор проб гемолимфы у животных. Пробы замораживали и хранили при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ до последующего анализа. Опыт проводили отдельно в разных возрастных группах моллюсков.

Определение содержания глюкозы в пробе гемолимфы осуществляли глюкозооксидазным методом с применением набора реагентов научно-технического производственного кооператива «Анализ X» (Беларусь). Измерения оптической плотности производили на длине волны 500 нм (длина оптического пути 1 см) при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ посредством спектрофотометра Ultrospec 100 pro (Amersham Biosciences, Великобритания). Объем материала для анализа был равен 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) составляло 30 мин. В качестве стандартов использовали 100 мкл свежеприготовленного 0,1 и 0,5 ммоль/л раствора глюкозы.

Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали с помощью W -теста Шапиро – Уилка (Shapiro – Wilk W -test). В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей для обеих групп данных в целях оценки достоверности различий использовали t -критерий Стьюдента (Student's t -test) для независимых пар. Если нормальность распределения не была подтверждена для обеих групп данных, применяли непараметрический U -критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney U -test) для двух независимых выборок. Статистическая обработка данных и их представление проведены посредством программ Statistica 6.0 и GraphPad Prism 8 соответственно. Данные в тексте представлены как среднее \pm ошибка среднего или медиана (верхний; нижний квартили) в случае непараметрического характера распределения. Достоверными считались результаты при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Животные старшей возрастной группы характеризовались более крупными размерами, превышая по массе тела и высоте раковины особей младшей возрастной группы в 3,3 и 1,8 раза: 4,9 (3,6; 5,3) г против 1,5 (1,1; 1,7) г и 4,6 (4,3; 4,8) см против 2,5 (2,3; 2,8) см соответственно (рис. 1, а, б). Исходя из произведенных расчетов, возраст этих групп отличался на 11 нед. (т. е. на 2–3 мес., что составляет примерно 20 % от средней продолжительности жизни моллюсков *L. stagnalis*, оцениваемой в 1 год [11]): 24 (22; 26) и 35 (30; 44) нед. для младшей и старшей возрастных групп соответственно (рис. 1, в). Кроме того, было отмечено 1,6-кратное статистически достоверное увеличение содержания глюкозы в гемолимфе моллюсков старшего возраста: 0,21 (0,13; 0,23) ммоль/л против 0,13 (0,08; 0,16) ммоль/л (рис. 1, г).

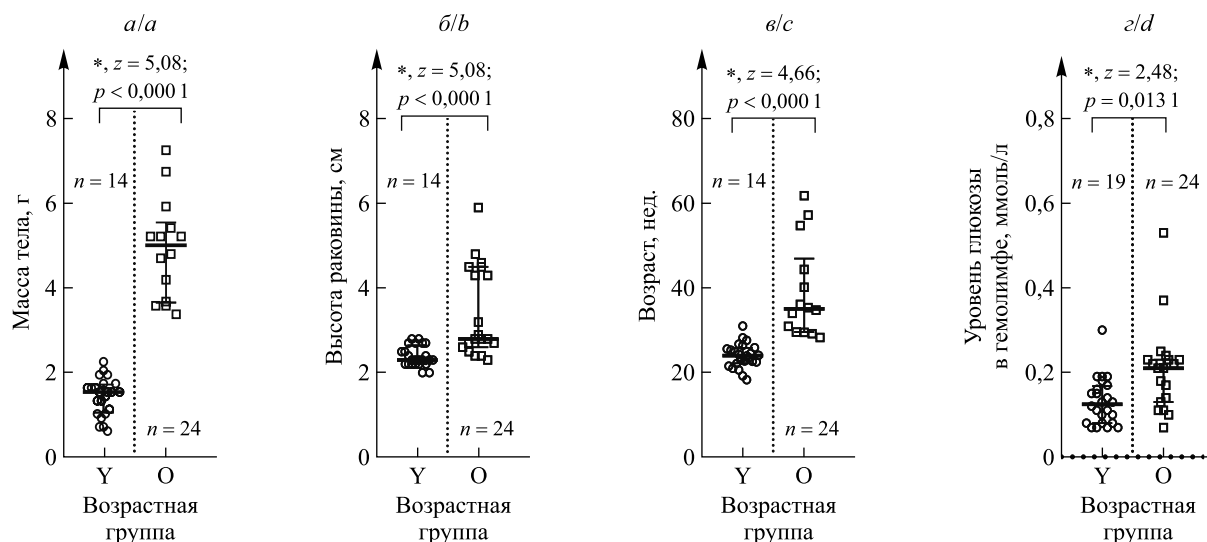


Рис. 1. Морфологические характеристики и содержание глюкозы в гемолимфе моллюсков *L. stagnalis* младшей (Y) и старшей (O) возрастных групп: а – масса тела; б – высота раковины; в – возраст; г – уровень глюкозы в гемолимфе. Точки диаграммы – данные по каждому моллюску отдельно. Представлены медиана (верхний; нижний квантили), число наблюдений (n), значения U-критерия Манна – Уитни (z) и уровня значимости (p). Звездочкой отмечены статистически достоверные различия

Fig. 1. Morphological characteristics and haemolymph glucose level of molluscs *L. stagnalis* of the younger (Y) and older (O) age groups: а – body weight; б – shell height; в – age; д – haemolymph glucose level. The points of the diagram are the data for each mollusc separately. Median (upper; lower quartiles), number of observations (n), Mann – Whitney U-test (z) value, significance level (p) are also presented. Statistically significant differences are marked by asterisk

Реакция на повторяющуюся глюкозную нагрузку отличалась в зависимости от возраста животных. Для экспериментальной серии моллюсков младшего возраста отмечено статистически значимое увеличение содержания глюкозы в гемолимфе до $(0,48 \pm 0,09)$ ммоль/л, т. е. в 4,8 раза по сравнению с ее уровнем в начальный день эксперимента, составившим $(0,10 \pm 0,01)$ ммоль/л (рис. 2, а). В то же время для контрольной серии животных этого возраста подобное сравнение не выявило каких-либо статистически достоверных отличий в содержании глюкозы: $(0,16 \pm 0,02)$ и $(0,17 \pm 0,04)$ ммоль/л для начального и последнего дней эксперимента соответственно. Отдельно отметим существование статистически значимых различий в концентрации глюкозы в гемолимфе между контрольной и экспериментальной сериями при сравнении значений для последнего дня эксперимента, что дополнительно подчеркивает правомочность вывода о развитии гипергликемии.

Для моллюсков старшего возраста статистически значимых колебаний уровня глюкозы в гемолимфе отмечено не было (рис. 2, б). Авторами не зафиксированы статистически достоверные различия данного показателя ни между животными экспериментальной ($(0,22 \pm 0,04)$ ммоль/л против $(0,22 \pm 0,02)$ ммоль/л), ни между животными контрольной ($(0,19 \pm 0,01)$ ммоль/л против $(0,18 \pm 0,02)$ ммоль/л) серий при сравнении значений для начального и последнего дней эксперимента.

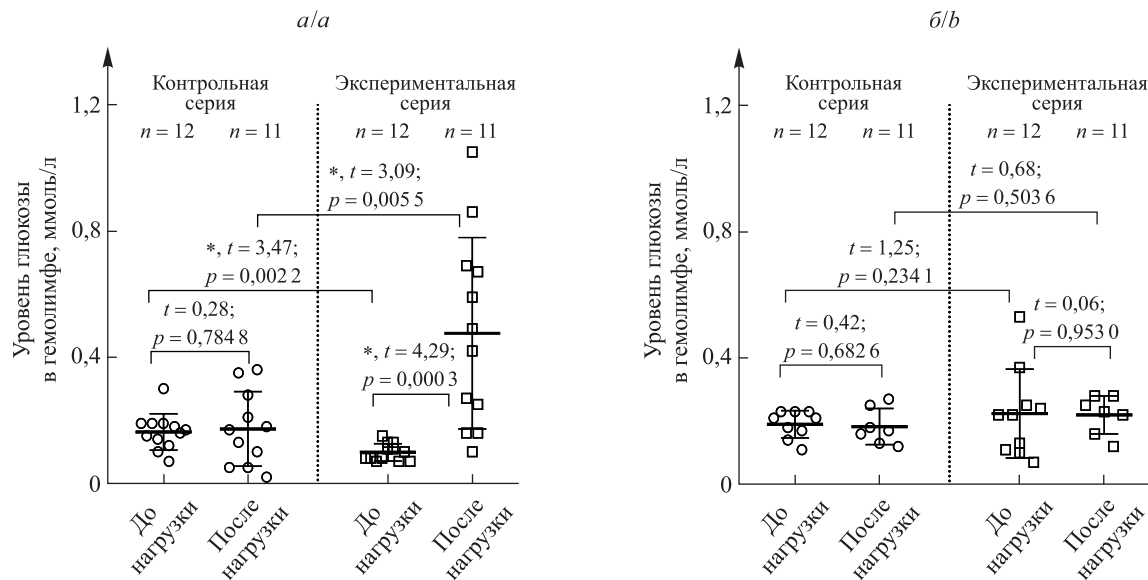


Рис. 2. Изменение содержания глюкозы в гемолимфе моллюсков *L. stagnalis* разных возрастных групп при повторяющейся глюкозной нагрузке:

a – младшая возрастная группа; *б* – старшая возрастная группа.

Точки диаграммы – данные по каждому моллюску отдельно.

Представлены среднее \pm квадратичное отклонение, число наблюдений (*n*) для начального (до нагрузки) и последнего (после нагрузки) дней эксперимента для контрольной и экспериментальной серий, значения *t*-критерия Стьюдента и уровня значимости (*p*) для сравниваемых пар данных (показаны скобкой).

Звездочкой отмечены статистически достоверные различия

Fig. 2. Changes in the haemolymph glucose level after repeated glucose load in the molluscs *L. stagnalis* of different age groups:

a – younger age group; *b* – older age group.

The points of the diagram are the data for each mollusc separately.

Mean \pm standard deviation, number of observations (*n*) are presented for the initial (before load) and last (after load) days of the experiment for the control and experimental groups,

Student's *t*-test value and significance level (*p*) for the data compared upon brackets.

Statistically significant differences are marked by asterisk

В регуляции уровня глюкозы в гемолимфе моллюсков *L. stagnalis* важная роль отводится пептидергическим нейронам центральных ганглиев (кластер нейросекреторных темно-зеленых клеток (*dark green cells*)), ответственным за продукцию в том числе инсулиноподобных нейропептидов [12]. Помимо этого, указанная группа нейронов вовлечена в контроль за процессами роста и размножения, которые требуют существенных энергетических затрат. Добавление глюкозы усиливает частоту импульсации этих клеток [13], что автоматически означает увеличение выброса соответствующего нейромедиатора(-ов) из их синаптических окончаний. Вероятно, функциональная активность данной популяции нейронов выше у животных старшей возрастной группы, что может быть связано с увеличением размеров нейронов в ганглиях моллюсков *L. stagnalis* с возрастом [14] и большей продукцией инсулиноподобных нейропептидов. Результатом будет более быстрая нормализация уровня глюкозы в гемолимфе в ответ на гипергликемическую нагрузку, чем у более молодых особей. Поскольку обе рассматриваемые возрастные группы моллюсков относились к половозрелым особям (согласно данным работы [15] и собственным наблюдениям, подтверждающим яйцекладку в аквариумах их постоянного содержания), выявленные различия не могут быть связаны с функциональной незрелостью кластера нейросекреторных темно-зеленых клеток. Интересно, что фоновый уровень содержания глюкозы в гемолимфе оказывается выше у животных старшей возрастной группы, это может быть отражением продукции инсулиноподобных нейропептидов не в тоническом режиме, а в качестве ответа на гипергликемию. Другими словами, это скорее механизм экстренной нормализации уровня сахара в гемолимфе, а не поддержания его фоновой концентрации. С этих позиций изменения поведения в самом широком смысле, наблюдаемые при модификации пищевой активности прудовика [16–18], могут быть более выражены у моллюсков младшего возраста, в то время как ответы их старших сородичей будут носить более консервативный характер.

Заклучение

Таким образом, существуют возрастные особенности, связанные с регуляцией содержания глюкозы в гемолимфе моллюсков, что может быть использовано для разработки экспериментальных моделей гипергликемии (в том числе пролонгированной), более эффективных у животных определенного возраста. Однако вопрос о потенциальных колебаниях уровня глюкозы на протяжении всего жизненного цикла моллюска остается открытым.

Библиографические ссылки

1. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*. 2013;36(10):587–597. DOI: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
2. Kupfermann I. Neural control of feeding. *Current Opinion in Neurobiology*. 1994;4(6):869–876. DOI: 10.1016/0959-4388(94)90136-8.
3. van den Beld AW, Kaufman J-M, Zillikens MC, Lamberts SWJ, Egan JM, van der Lely AJ. The physiology of endocrine systems with ageing. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2018;6(8):647–658. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30026-3.
4. Kmiec Z. Central control of food intake in aging. In: Mobbs CV, Hof PR, editors. *Body composition and aging*. Basel: Karger; 2010. p. 37–50 (Hof PR, Mobbs CV, editors. *Interdisciplinary topics in gerontology*; volume 37). DOI: 10.1159/000319993.
5. Skulachev MV, Severin FF, Skulachev VP. Receptor regulation of senile phenoptosis. *Biochemistry (Moscow)*. 2014;79(10):994–1003. DOI: 10.1134/S0006297914100022.
6. Galenza A, Foley E. A glucose-supplemented diet enhances gut barrier integrity in *Drosophila*. *Biology Open*. 2021;10(3):bio056515. DOI: 10.1242/bio.056515.
7. Шаденко ВН, Сидоров АВ. Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска *Lymnaea stagnalis* при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:79–84. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.
8. Сидоров АВ, Шаденко ВН. Электрические характеристики сенсорного нейрона и оборонительные реакции моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях пролонгированной гипергликемии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:23–38. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-1-23-38.
9. Sidorov AV, Shadenko VN. Passive membrane properties and spike characteristics in a pair of identified electrically coupled *Lymnaea stagnalis* neurons under long-term experimental hyperglycemia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023;59(2):369–381. DOI: 10.1134/S0022093023020060.
10. Zotin AA. Individual growth of *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda): II. Late postlarval ontogeny. *Biology Bulletin*. 2009;36(6):591–597. DOI: 10.1134/S1062359009060077.
11. Fodor I, Svigruha R, Kemenes G, Kemenes I, Pirger Z. The great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) as a model of aging and age-related memory impairment: an overview. *The Journals of Gerontology. Series A*. 2021;76(6):975–982. DOI: 10.1093/gerona/ab014.
12. Smit AB, Vreugdenhil E, Ebberink RHM, Geraerts WPM, Klootwijk J, Joosse J. Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*. 1988;331(6156):535–538. DOI: 10.1038/331535a0.
13. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/BF00372957.
14. McComb C, Meems R, Syed N, Lukowiak K. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea*. *Journal of Neurophysiology*. 2003;90(2):983–992. DOI: 10.1152/jn.00263.2003.
15. McComb C, Varshney N, Lukowiak K. Juvenile *Lymnaea* ventilate, learn and remember differently than do adult *Lymnaea*. *Journal of Experimental Biology*. 2005;208(8):1459–1467. DOI: 10.1242/jeb.01544.
16. Sidorov AV. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2006;42(1):43–48. DOI: 10.1134/S0022093006010066.
17. Arundell M, Patel BA, Straub V, Allen MC, Janse C, O'Hare D, et al. Effects of age on feeding behavior and chemosensory processing in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiology of Aging*. 2006;27(12):1880–1891. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.040.
18. Nakai J, Chikamoto N, Fujimoto K, Totani Y, Hatakeyama D, Dyakonova V, et al. Insulin and memory in invertebrates. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2022;16:882932. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.882932.

References

1. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*. 2013;36(10):587–597. DOI: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
2. Kupfermann I. Neural control of feeding. *Current Opinion in Neurobiology*. 1994;4(6):869–876. DOI: 10.1016/0959-4388(94)90136-8.
3. van den Beld AW, Kaufman J-M, Zillikens MC, Lamberts SWJ, Egan JM, van der Lely AJ. The physiology of endocrine systems with ageing. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2018;6(8):647–658. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30026-3.
4. Kmiec Z. Central control of food intake in aging. In: Mobbs CV, Hof PR, editors. *Body composition and aging*. Basel: Karger; 2010. p. 37–50 (Hof PR, Mobbs CV, editors. *Interdisciplinary topics in gerontology*; volume 37). DOI: 10.1159/000319993.
5. Skulachev MV, Severin FF, Skulachev VP. Receptor regulation of senile phenoptosis. *Biochemistry (Moscow)*. 2014;79(10):994–1003. DOI: 10.1134/S0006297914100022.
6. Galenza A, Foley E. A glucose-supplemented diet enhances gut barrier integrity in *Drosophila*. *Biology Open*. 2021;10(3):bio056515. DOI: 10.1242/bio.056515.
7. Shadenko VN, Sidorov AV. Induction of experimental hyperglycemia in mollusc *Lymnaea stagnalis* after animal's incubation in high-concentrated glucose solution. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:79–84. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-79-84.

8. Sidorov AV, Shadenko VN. Electrical properties of the sensory neuron and defense reactions of mollusc *Lymnaea stagnalis* at conditions of prolonged hyperglycemia. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:23–38. Russian. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-1-23-38.
9. Sidorov AV, Shadenko VN. Passive membrane properties and spike characteristics in a pair of identified electrically coupled *Lymnaea stagnalis* neurons under long-term experimental hyperglycemia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023; 59(2):369–381. DOI: 10.1134/S0022093023020060.
10. Zotin AA. Individual growth of *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda): II. Late postlarval ontogeny. *Biology Bulletin*. 2009;36(6):591–597. DOI: 10.1134/S1062359009060077.
11. Fodor I, Svigruha R, Kemenes G, Kemenes I, Pirger Z. The great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) as a model of aging and age-related memory impairment: an overview. *The Journals of Gerontology. Series A*. 2021;76(6):975–982. DOI: 10.1093/gerona/glab014.
12. Smit AB, Vreugdenhil E, Ebberink RHM, Geraerts WPM, Klootwijk J, Joosse J. Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*. 1988;331(6156):535–538. DOI: 10.1038/331535a0.
13. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC. Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. 1991;417(6):597–604. DOI: 10.1007/BF00372957.
14. McComb C, Meems R, Syed N, Lukowiak K. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea*. *Journal of Neurophysiology*. 2003;90(2):983–992. DOI: 10.1152/jn.00263.2003.
15. McComb C, Varshney N, Lukowiak K. Juvenile *Lymnaea* ventilate, learn and remember differently than do adult *Lymnaea*. *Journal of Experimental Biology*. 2005;208(8):1459–1467. DOI: 10.1242/jeb.01544.
16. Sidorov AV. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2006;42(1):43–48. DOI: 10.1134/S0022093006010066.
17. Arundell M, Patel BA, Straub V, Allen MC, Janse C, O'Hare D, et al. Effects of age on feeding behavior and chemosensory processing in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiology of Aging*. 2006;27(12):1880–1891. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.040.
18. Nakai J, Chikamoto N, Fujimoto K, Totani Y, Hatakeyama D, Dyakonova V, et al. Insulin and memory in invertebrates. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2022;16:882932. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.882932.

Получена 28.09.2023 / исправлена 29.09.2023 / принята 30.09.2023.
Received 28.09.2023 / revised 29.09.2023 / accepted 30.09.2023.



**Игорь Константинович
ЛОПАТИН
(1923–2012)**

**Igor Konstantinovich
LOPATIN
(1923–2012)**

13 ноября 2023 г. исполняется 100 лет со дня рождения выдающегося ученого и педагога, энтомолога с мировым именем, заслуженного работника высшей школы Таджикской ССР и Белорусской ССР, лауреата Государственной премии БССР, заслуженного работника БГУ, профессора Игоря Константиновича Лопатина.

Окончив Харьковский государственный университет имени А. М. Горького, свою профессиональную деятельность И. К. Лопатин начал в научном отделе всемирно известного заповедника «Аскания-Нова». Затем он работал в зоологическом музее и на кафедре зоологии Одесского государственного университета имени И. И. Мечникова. В 1950 г. И. К. Лопатин защитил кандидатскую диссертацию на тему «Листоеды южного Заднепровья», с 1953 г. преподавал в Таджикском государственном университете в Душанбе. За годы работы в Таджикистане Игорь Константинович организовал 12 экспедиций по Центральной Азии. В 1965 г. в Зоологическом институте АН СССР он защитил докторскую диссертацию на тему «Листоеды Средней Азии и се-

верного Афганистана», которая была издана в виде монографии и в переводе опубликована за рубежом. В 1966 г. И. К. Лопатину присвоено ученое звание профессора. В 1969 г. по приглашению ректора БГУ академика А. Н. Севченко он возглавил кафедру зоологии позвоночных. По инициативе Игоря Константиновича на биологическом факультете университета была начата подготовка по новому направлению «охрана природы», которое в то время только становилось популярным. С 1974 г. после реорганизации кафедр зоологии беспозвоночных и зоологии позвоночных И. К. Лопатин заведовал объединенной кафедрой зоологии, возглавляя ее вплоть до 1998 г., а затем продолжал работать на ней в должности профессора до конца жизни.

Основным предметом научных интересов Игоря Константиновича на протяжении всей профессиональной деятельности являлись жуки-листоеды. По результатам исследований И. К. Лопатиним были опубликованы 7 монографий и более чем 250 статей в научных журналах СССР, России, Беларуси, Германии, Нидерландов, Венгрии, Чехии, Италии,

Финляндии, США, Швейцарии, Австрии, Израиля, Объединенных Арабских Эмиратов и др. Им лично описаны свыше 700 новых для науки видов листоедов, а более 100 новых для науки видов животных названы в его честь.

Игорь Константинович много и результативно занимался научно-педагогической деятельностью, разрабатывал новые учебные курсы, готовил учебные пособия и учебники. Среди них учебники по зоологии беспозвоночных, зоогеографии и зоосистематике, учебное пособие «Основы зоогеографии» (1980), которое было дополнено и переработано и выпущено как учебник «Зоогеография» (1989), переиздававшийся в России, а также на сербохорватском языке в Югославии (1995) и Словении (1996). И. К. Лопатина приглашали в учебные заведения и научно-исследовательские учреждения Болгарии, Югославии, Израиля, США и других стран для чтения лекций по биогеографии и работы с фондовыми энтомологическими коллекциями.

В течение многих лет Игорь Константинович возглавлял Белорусское энтомологическое общество, был членом президиума Всесоюзного (затем Русского) энтомологического общества, почетным членом Польского энтомологического общества и Европейской колеоптерологической ассоциации, входил в состав редакционных советов журналов «Энтомологическое обозрение», «Евразийский энтомологический журнал», «Zoosystematica Rossica» (Россия) и «Вестник БГУ», специализированных

ученых советов по защите диссертаций, постоянного оргкомитета международных симпозиумов по энтомофаунистике Центральной Европы, экспертного совета секции биологии Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований. За выдающийся вклад в развитие энтомофаунистики Европы в 1991 г. ему была вручена медаль «Excellent in Societiae Entomofaunistica».

Заслуги И. К. Лопатина в развитии науки и подготовке научных и педагогических кадров отмечены медалями «За доблестный труд» и «Ветеран труда». Игорь Константинович неоднократно награждался почетными грамотами Министерства образования Республики Беларусь и БГУ, был лауреатом премии имени А. Н. Севченко. Им создана научная школа в области систематики, экологии и зоогеографии насекомых Северной Евразии, подготовлены более 20 кандидатов и 6 докторов биологических наук.

В настоящее время многочисленные ученики профессора И. К. Лопатина успешно работают в научно-исследовательских и природоохранных организациях как в Беларуси, так и за рубежом. Любовь Игоря Константиновича к энтомологии изменила их жизнь и повлияла на научные интересы. Любимый и глубокоуважаемый учитель стал для них образцом ученого и педагога.

*С. В. Буга¹, Ж. Е. Мелешко², О. Ю. Круглова³,
О. Л. Нестерова⁴, Ф. В. Сауткин⁵*

¹Сергей Владимирович Буга – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой зоологии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Sergey V. Buga, doctor of science (biology), full professor; head of the department of zoology, faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: *sergey.buga@gmail.com*

²Жюльетта Евгеньевна Мелешко – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры зоологии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Julietta E. Meleshko, PhD (biology), docent; associate professor at the department of zoology, faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: *julitt07@mail.ru*

³Оксана Юрьевна Круглова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры зоологии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Oksana Yu. Kruglova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of zoology, faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: *kruglovaoksana@mail.ru*

⁴Оксана Львовна Нестерова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Oksana L. Nesterova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: *neoxana@gmail.com*

⁵Федор Викторович Сауткин – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры зоологии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Fedor V. Sautkin, PhD (biology), docent; associate professor at the department of zoology, faculty of biology, Belarusian State University.

E-mail: *fvsautkin@gmail.com*

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

УДК 575(075.8)

Генетика [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец.: 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», 1-31 01 02 «Биохимия», 1-31 01 03 «Микробиология», 1-33 01 03 «Биоэкология», 6-05-0511-06 «Биотехнология», 1-31 01 04 «Биоинженерия и биоинформатика» / БГУ ; сост.: Н. П. Максимова [и др.]. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2023. 120 с. : ил. Библиогр.: с. 119–120. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/302000>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 20.09.2023, № 007920092023.

Содержание электронного учебно-методического комплекса направлено на изучение основ генетических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организмов, их развитие и размножение, а также изучение механизмов наследственности и изменчивости генетической информации организмов с использованием классических подходов и новейших достижений в области молекулярной генетики, биотехнологии и генетической инженерии.

УДК 612.8.015(075.8)+615.21(075.8)

Федорович С. В. Нейрохимия и основы нейрофармакологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец. 1-31 01 02 «Биохимия» / С. В. Федорович ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2023. 77 с. Библиогр.: с. 76–77. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/302141>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 26.09.2023, № 008126092023.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 «Биохимия». Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: клеточные основы нейробиологии, синапс, основные механизмы внутриклеточной сигнализации в постсинаптических нейронах, нейромедиаторы, патогенез основных нейродегенеративных и психиатрических заболеваний, основные классы нейрофармакологических лекарственных препаратов.

УДК 581.19(075.8)

Филипцова Г. Г. Биохимия растений [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс с креатив. компонентом для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», специализаций: 1-31 01 01-01 03 «Физиология растений», 1-31 01 01-02 03 «Физиология растений» / Г. Г. Филипцова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2023. 69 с. : ил. Библиогр.: с. 67–69. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/302234>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 28.09.2023, № 008228092023.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) с креативным компонентом по учебной дисциплине «Биохимия растений» предназначен для студентов, обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», специализациям 1-31 01 01-01 03 «Физиология растений», 1-31 01 01-02 03 «Физиология растений». Содержание ЭУМК предполагает повышение эффективности управления образовательным процессом и самостоятельной работой студентов по освоению учебной дисциплины «Биохимия растений» с помощью внедрения в образовательный процесс инновационных образовательных технологий, в том числе с выраженным креативным компонентом.

УДК 592/599(476)(075.8)

Сахвон В. В. Животный мир Беларуси [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», 1-31 01 01-01 «Биология (научно-производственная деятельность)», 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)», специализаций: 1-31 01 01-01 01 «Зоология», 1-31 01 01-02 01 «Зоология» / В. В. Сахвон, Ф. В. Сауткин ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2023. 159 с. Библиогр.: с. 158–159. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/303276>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 11.10.2023, № 008711102023.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 1-31 01 01 «Биология (по направлениям), 1-31 01 01-01 «Биология (научно-производственная деятельность)», 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)», специализаций 1-31 01 01-01 01 «Зоология», 1-31 01 01-02 01 «Зоология». Содержание ЭУМК предполагает формирование у студентов углубленного представления о таксономической структуре фауны Беларуси, разнообразии таксономических и экологических групп региональных природных комплексов, экологическом и практическом значении последних, представлений о фауногенезе и ходе естественно-исторического природного процесса, а также устойчивых навыков использования терминологического и понятийного аппарата рассматриваемых разделов зоологии, профессиональных навыков в области методологии исследований фауны, охраны и рационального использования животного мира.

УДК 574.047(075.8)

Макаревич Т. А. Биотический круговорот [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-33 01 01 «Биоэкология» / Т. А. Макаревич, В. В. Гричик, О. Л. Нестерова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2023. 136 с. : ил. Библиогр.: с. 135–136. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/303632>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 20.10.2023, № 009020102023.

Электронный учебно-методический комплекс, предназначенный для студентов специальности 1-33 01 01 «Биоэкология», включает в себя теоретический раздел, раздел контроля знаний и вспомогательный раздел, содержащий учебно-программные материалы и список рекомендованной литературы. Курс «Биотический круговорот» предполагает формирование у студентов целостного представления о круговороте веществ и потоках энергии в биосфере, что обеспечит возможность практического применения полученных знаний и развития новых направлений исследований.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- Федорович С. В., Демидчик В. В. Повреждение синапсов центральной нервной системы при патологиях головного мозга: мембранные механизмы и способы коррекции..... 4

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ

- Авимова К. П., Сандаков Д. Б. Влияние размера группы при содержании на поведение мышей в стандартных тестах..... 12
- Волынчук Н. Н., Кабашишникова Л. Ф. Дрожжевые грибы как перспективные агенты биоконтроля микопатогенов винограда 24

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

- Гребенчук А. Е., Парфенова А. С., Лукашкова О. Н., Цыбовский И. С. Характеристика генетической структуры дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*) в Беларуси 34

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Кусенкова М. П. Оптимизация условий регенерации микрорастений ели европейской из высокопродуктивной эмбрионной линии..... 47

ЗООЛОГИЯ

- Синчук Н. В. Морфометрия разновозрастных личинок тополевой моли-пестрянки (*Phylloponorhynchus populifoliella* (Treitschke, 1833))..... 57

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

- Крюк Д. В., Жукова А. А., Новиков А. А., Послед О. С., Джанг Шуфенг, Адамович Б. В. Макрофиты как субстрат для развития моллюска *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 в Нарочанских озерах..... 68

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Махотин Р. А., Сидоров А. В. Возрастные особенности содержания глюкозы в гемолимфе моллюска *Lymnaea stagnalis* при повторяющемся гипергликемическом стрессе..... 81

ВЫДАЮЩИЕСЯ УЧЕНЫЕ

- Игорь Константинович Лопатин (1923–2012)..... 88
- Аннотации депонированных в БГУ работ..... 90

CONTENTS

REVIEWS

- Fedorovich S. V., Demidchik V. V.* Damage of central nervous system synapses at brain diseases: membrane mechanisms and methods of correction 4

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

- Avimova K. P., Sandakov D. B.* Influence of group size on mice behaviour in standard tests 12
- Volynchuk N. N., Kabashnikova L. F.* Yeast fungi as promising agents for biocontrol of myco-pathogens in grapes 24

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

- Hrebianchuk A. E., Parfionava N. S., Lukashkova V. M., Tsybovsky I. S.* Characteristics of the genetic structure of wild and farm populations of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Belarus 34

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

- Kusenkova M. P.* Optimisation of regeneration conditions of Norway spruce microplants from highly productive embryogenic line 47

ZOOLOGY

- Sinchuk N. V.* Morphometry of different instars larvae of the poplar leaf miner (*Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833)) 57

ECOLOGY AND CONSERVANCY

- Kruk D. V., Zhukava H. A., Novikov A. A., Posled O. S., Zhang Xiufeng, Adamovich B. V.* Macrophytes as a substrate for the mollusc *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 development in Narochan-skie lakes 68

SHORT COMMUNICATIONS

- Mahotin R. A., Sidorov A. V.* Peculiarities of age-dependent glucose content in the haemolymph of the mollusc *Lymnaea stagnalis* under repeated hyperglycemic impact 81

OUTSTANDING SCIENTISTS

- Igor Konstantinovich Lopatin (1923–2012) 88
- Indicative abstracts of the papers deposited in BSU 90

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.
№ 3. 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 31.10.2023.

Тираж 55 экз. Заказ 1028.

Республиканское унитарное предприятие
«СтройМедиаПроект».
ЛП № 02330/71 от 23.01.2014.
Ул. В. Хоружей, 13/61, 220123,
г. Минск, Республика Беларусь.

© БГУ, 2023

**Experimental Biology
and Biotechnology.
No. 3. 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 31.10.2023.

Edition 55 copies. Order number 1028.

Republic Unitary Enterprise
«StroiMediaProekt».
License for publishing No. 02330/71, 23 January, 2014.
13/61 V. Haruzhaj Str.,
Minsk 220123, Republic of Belarus.

© BSU, 2023