



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

2022

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор **ДЕМИДЧИК В. В.** – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, 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 биотехнологии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: filipsova@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 Фоханьского университета, Фохань, Китай.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief	DEMIDCHIK V. V. , corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), 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 576:576.5+57.085.23

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И МОДЕЛИ ИХ ИЗУЧЕНИЯ *in vitro*

В. Э. МАНТИВОДА¹⁾, Н. Г. АНТОНЕВИЧ¹⁾, А. Е. ГОНЧАРОВ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Микроглиальные клетки – это один из ключевых клеточных элементов центральной нервной системы. В последние годы появляется все больше данных о роли микроглиальных клеток в патогенезе различных психических и нейродегенеративных заболеваний. Однако исследование микроглии головного мозга человека ограничено по техническим и этическим причинам, в связи с чем актуальным направлением современной биологии и медицины является создание новой клеточной модели *in vitro* микроглии человека. Цель настоящего обзора состоит в описании функциональных и иммунологических свойств микроглии, а также основных моделей *in vitro*, используемых в настоящее время для исследования свойств клеток в норме и при патологии.

Ключевые слова: микроглия; микроглиеподобные клетки; модели *in vitro*; клеточная биология.

Образец цитирования:

Мантивода ВЭ, Антоневиц НГ, Гончаров АЕ. Иммунобиологическая характеристика микроглиальных клеток и модели их изучения *in vitro*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:4–13.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-4-13>

For citation:

Mantsivoda VE, Antonevich NG, Hancharou AY. Immunobiological characteristics of microglial cells and *in vitro* models for their obtaining. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:4–13. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-4-13>

Авторы:

Вероника Эдуардовна Мантивода – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биофизики.
Наталья Георгиевна Антоневиц – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией иммунологии и клеточной биофизики.
Андрей Евгеньевич Гончаров – кандидат медицинских наук, доцент; директор.

Authors:

Veranika E. Mantsivoda, junior researcher at the laboratory of immunology and cell biophysics.
veronikamantivoda@gmail.com
Natalia G. Antonevich, PhD (biology); head of the laboratory of immunology and cell biophysics.
antonevich.n@gmail.com
Andrei Y. Hancharou, PhD (medicine), docent; director.
andrei.hancharou@gmail.com

IMMUNOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MICROGLIAL CELLS AND *in vitro* MODELS FOR THEIR OBTAINING

V. E. MANTSIVODA^a, N. G. ANTONEVICH^a, A. Y. HANCHAROU^a

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

Corresponding author: V. E. Mantsivoda (veronikamantivoda@gmail.com)

Microglial cells are one of the main cellular elements of the central nervous system. In recent years, more and more data has appeared about the role of microglial cells in the pathogenesis of various mental and neurodegenerative diseases. However, the study of human brain microglia is limited for technical and ethical reasons, so the development of a new *in vitro* cell model of human microglia is a perspective trend in biology and medicine. The aim of this review is to describe the functional and immunological properties of microglia and to analyse *in vitro* models that currently used for study the properties of cells in normal and pathological conditions.

Keywords: microglia; microglia-like cells; *in vitro* models; cell biology.

Введение

Микроглиальные клетки представляют собой иммунокомпетентные клетки центральной нервной системы (ЦНС). Основными функциями микроглии являются поддержание гомеостаза ЦНС путем удаления апоптотических клеток и клеточного мусора, участие в регуляции синаптической организации, миелинизации, возбудимости нервных клеток, а также оказание трофической поддержки нейронам [1; 2].

В последние годы публикуется все больше данных о роли микроглии в патогенезе различных психических и нейродегенеративных заболеваний. Так, нейровоспаление, ассоциированное с повышенной секрецией микроглией провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-10, IL-6), является одним из этиологических факторов развития шизофрении. Нейровоспаление оказывает негативное влияние на процессы, имеющие ключевое значение для нормального функционирования головного мозга (миелинизация, синаптический прунинг) [3; 4]. По данным ВОЗ, психические расстройства относятся к числу наиболее серьезных проблем общественного здравоохранения в Европейском регионе, занимая первое место среди факторов инвалидности и третье место (после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний) среди причин, ведущих к возникновению социального бремени заболеваний [5]. В связи с этим изучение работы микроглиальных клеток в норме и при патологии является актуальным направлением современной биологии и медицины. Но исследование микроглии головного мозга человека имеет ряд ограничений, связанных прежде всего со сложностью получения живых клеток по этическим и техническим причинам. Существуют альтернативные модели для изучения микроглиальных клеток. В первую очередь это использование перевиваемых линий клеток животных [6–8]. Микроглию человека также можно получить путем дифференцировки из моноцитов периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) [9; 10]. Однако стоит учитывать, что стандартизированный метод получения микроглиеподобных клеток отсутствует.

В данной статье изложены история открытия и теории происхождения микроглиальных клеток, описаны их иммунофункциональные свойства, а также освещены основные вопросы, связанные с исследованием микроглии, и возможности применения микроглиальных клеток в биологии и медицине.

История открытия и теории происхождения микроглиальных клеток

В 1899 г. немецким невропатологом Ф. Нисслем впервые описаны микроглиальные клетки, связанные с воспалением и повреждением. Они были названы *Stäbchenzellen*, или стержневыми клетками (*rod-like cells*). Данный тип микроглии обнаруживался у людей с психическими и нейродегенеративными заболеваниями. Однако из-за несовершенства методов выявления различных клеточных структур функцию этих клеток в то время установить не удалось [11].

Позднее, в 1913 г., знаменитый испанский врач-гистолог С. Рамон-и-Кахаль, активно занимаясь изучением строения нейроглии с помощью метода импрегнации ткани головного мозга солями металлов, установил, что нейроны и астроциты являются «первым и вторым элементами» нервной ткани. При этом ученым была обнаружена еще одна группа клеточных элементов «не астроцитарного и не нейронального происхождения», которую никак не удавалось окрасить. С. Рамон-и-Кахаль назвал такие

клеточные структуры «третьим элементом» нервной ткани, или адендритными клетками. Преимущественно они обнаруживались в белом веществе головного мозга, периваскулярных и периневральных пространствах [12].

Идентифицировать данные клетки, впервые используя термин «микроглия», в 1919 г. удалось П. дель Рио-Ортеге – ученику С. Рамон-и-Кахаля. П. дель Рио-Ортега разработал собственную модификацию окрашивания аммиачным карбонатом серебра для визуализации глиальных клеток. Благодаря данному методу были изучены и детально описаны морфология микроглии и ее функциональные особенности (фагоцитарная активность, способность к миграции), а также предложена концепция мезодермального происхождения микроглиальных клеток [13].

Следует отметить, что вопрос о происхождении микроглиальных клеток долгое время оставался предметом дискуссий и исследований. Начиная со второй половины XX в. ряд ученых придерживались концепции нейроэктодермального происхождения микроглиальных клеток, согласно которой микроглия формируется из нейроэктодермы, так как данный тип клеток имеет общие характеристики с другими клетками микроглии. Например, в 1975 г. ученые С. Фуджита и Т. Китакура утверждали, что у трех типов микроглии есть общий предшественник – глиобласт [14]. Также в 1975 г. на основании экспериментов с введением [3H]тимидина крысам и мышам установлено, что клетки микроглии в гиппокампе появляются через 2 дня после рождения из клеток-предшественников (глиобластов) [15]. Методами иммуногистохимического окрашивания было выявлено, что нейроэпителиальные клетки и микроглия имеют ряд общих маркеров, например липокортин-1 (аннексин-A1). Это послужило основанием для предположения нейроэпителиального происхождения микроглиальных клеток [16]. Тем не менее все эти данные требовали дополнительных доказательств, помимо экспрессии общих молекул, и не исключали того факта, что существуют источники микроглиальных клеток вне нейроэктодермы, которые колонизируют головной мозг до их обнаружения, к примеру желточный мешок или моноциты периферической крови. Таким образом, была предложена теория моноцитарного происхождения микроглии, согласно которой микроглиальные клетки формируются из моноцитов циркулирующей крови. Впервые эту гипотезу выдвинули немецкие ученые К. Санта и А. Юба в 1933 г. [17]. В 1985 г. удалось визуализировать популяцию клеток в развивающемся и зрелом головном мозге путем мечения специфичной для макрофагов мыши молекулой F4/80. Клетки F4/80⁺ наблюдали в сосудистых сплетениях головного мозга еще до появления микроглии. В течение первых 5 дней после рождения клетки F4/80⁺ мигрировали в паренхиме головного мозга и приобретали разветвленную морфологию, типичную для микроглиальных клеток [18], что и стало обоснованием данной теории.

В настоящее время наиболее убедительной и доказанной считается концепция мезодермального происхождения микроглии. Данное происхождение предполагал П. дель Рио-Ортега в 1932 г. при идентификации клеток. Используя метод импрегнации серебром, он обнаружил, что клетки амeboидной морфологии изначально концентрировались на поверхности головного мозга, а затем в процессе эмбрионального развития мигрировали в мозг через мозолистое тело, свод, внутреннюю капсулу, парус мозжечка и основания черепных нервов и превращались в разветвленную форму микроглии. Современные исследования с использованием нокаутных мышей, которые экспрессируют белок GFP под контролем промотора хемокинового рецептора CX3CR1, доказали, что микроглиальные клетки происходят из эритромиелоидных клеток-предшественников CD45⁺-kit⁺ в желточном мешке в ходе раннего эмбрионального развития [19; 20]. На 9-й день эмбрионального развития клетки-предшественники, имеющие фенотип CD45⁺-kit⁺-CX3CR1⁺, мигрируют в головной мозг до формирования гематоэнцефалического барьера и остаются там после его образования. Дифференцировка клеток-предшественников в клетки микроглии зависит от миелоидных транскрипционных факторов PU.1 и IRF8. Стоит отметить, что для раннего развития микроглии не требуются такие транскрипционные факторы, как Myb, Id2, Batf3 и Klf4, необходимые для дифференцировки других популяций миелоидных клеток, например моноцитов и дендритных клеток [20; 21]. Для поддержания популяции микроглии и ее выживания во взрослом организме нужна активация сигнального пути, опосредуемого рецептором CSF1R. Лигандами CSF1R являются молекулы CSF1 и IL-34 (открыт лишь в 2008 г.), продуцируемые в ЦНС (в первую очередь нейронами). Проведенные на мышах исследования показали, что дефицит IL-34 в головном мозге приводит к значительному снижению популяции микроглиальных клеток [22].

Гетерогенность морфологии и фенотипа микроглиальных клеток

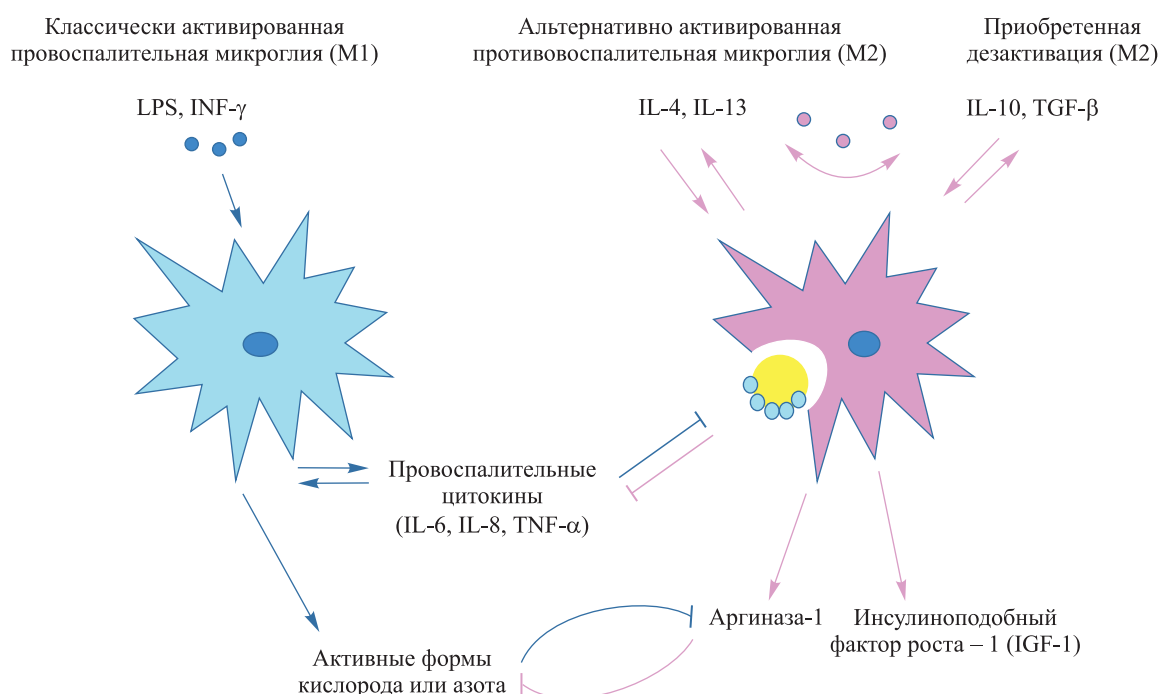
Микроглия составляет приблизительно 5–10 % от всех клеток ЦНС. Микроглиальные клетки, являясь иммунокомпетентными клетками ЦНС, обладают высокой пластичностью и претерпевают ряд морфологических и функциональных трансформаций в ответ на повреждение, травму или изменение их микроокружения. В нормальных физиологических условиях клетки микроглии обладают разветвленной морфологией, характеризующейся многочисленными отростками, которые осуществляют постоянный

мониторинг среды, при этом тело клетки остается фиксированным. В активированном состоянии клетки имеют амебоидную или стержневую (палочковидную) морфологию [2].

Подобно тканевым макрофагам, микроглию подразделяют на две функциональные категории – классически активированную провоспалительную (M1) и альтернативно активированную противовоспалительную (M2). Однако данное функциональное деление является упрощенным и дает лишь поверхностное представление о физиологических свойствах микроглиальных клеток.

Микроглия M1 характеризуется синтезом провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , и активных форм кислорода или азота. Данный фенотип наблюдается при активации INF- γ или микробными антигенами, например липополисахаридом (LPS).

Микроглия M2 активируется IL-4, IL-13 и оказывает противовоспалительное действие, синтезируя факторы для восстановления нейронов, такие как аргиназа, хитиназа типа 3 (Chi3l3). IL-4, IL-13 являются хорошо изученными противовоспалительными цитокинами, которые могут подавлять выработку провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF- α . Кроме того, микроглия M2 усиливает высвобождение нейротрофических факторов, в частности инсулиноподобного фактора роста – 1 (IGF-1), что способствует разрешению воспаления и выживанию нейронов. Микроглии M2 также присущ фенотип, характеризующийся состоянием приобретенной дезактивации (*acquired deactivation*). Он индуцируется прежде всего воздействием противовоспалительных цитокинов IL-10, TGF- β и поглощением апоптотических клеток (см. рисунок) [23; 24].



Состояния микроглиальных клеток в зависимости от пути активации и секретируемых молекул (с изменениями согласно данным работы [24])
Microglia states depending on the activation pathway and secreted molecules (with changes according to the data of work [24])

Недавно была принята концепция, согласно которой микроглия переходит из гомеостатического состояния в патологическое с последующим приобретением активированного DAM-фенотипа, ассоциированного с заболеванием (*disease-associated microglia*). Данный тип микроглии возникает при накоплении в окружающей среде апоптотических телец, образующихся в результате гибели нейронов, продуктов деградации липидов, внеклеточных скоплений белковых агрегатов, а также остатков миелина [25]. DAM-микроглия отличается высокой экспрессией Iba-1 и низкой экспрессией других микроглиальных маркеров, таких как P2RY12, P2RY13, CX3CR1, CD33 и TMEM119 [26]. Также для DAM-микроглии характерна повышенная фагоцитарная активность [25]. Фагоцитарная активность микроглии зависит от активации сигнального пути, опосредованного рецептором TREM2, экспрессия которого свойственна миелоидным клеткам. Недавние исследования выявили ряд мутаций в гене, кодирующем TREM2, которые повышают риск развития болезни Альцгеймера у людей в 3–4 раза. В головном мозге только микроглиальные клетки обладают высокой экспрессией TREM2, что дает основания предполагать важную роль микроглии в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [27].

Микроглиальные маркеры

Микроглиальные маркеры включают в себя как поверхностные, так и внутриклеточные молекулы (см. таблицу). К самым распространенным маркерам относят молекулу Iba-1. Было показано, что в головном мозге молекула Iba-1 специфична только для микроглиальных клеток и не экспрессируется нейронами, астроглией или олигодендроглией [28]. Также наиболее специфичными микроглиальными маркерами являются молекулы TMEM119 и P2RY12. С помощью синтезированного антитела к TMEM119 ученым удалось доказать, что в головном мозге мышей и человека экспрессия молекулы TMEM119 характерна только для микроглиальных клеток [29]. В 2003 г. были получены первые данные о присутствии рецептора P2RY12 на мембране клеток микроглии [30]. В настоящее время опубликовано большое количество работ, доказывающих, что в головном мозге P2RY12 не экспрессируется никакими клетками, кроме микроглиальных. P2RY12 является специфичным маркером для идентификации клеток микроглии на протяжении всей жизни человека [31].

Стоит отметить, что микроглиальные клетки, имея мезодермальное происхождение, разделяют экспрессию широкого спектра молекул миелоидного ряда (CD11b, CD14, F4/80, CD80, CD115 (CSF-R1), CX3CR1, CD16, CCR2, CD209) и панлейкоцитарного ряда (CD45, HLA-DR) [32–34].

Микроглиальные маркеры
Microglial markers

Маркер	Альтернативное название	Тип по локализации в клетке	Экспрессия	Функция
<i>Специфичные микроглиальные маркеры</i>				
Iba-1	Ионизированная кальцийсвязывающая адапторная молекула – 1	Внутриклеточный	Микроглия	Является кальцийсвязывающим белком
TMEM119	Трансмембранный белок – 119	Поверхностный	Микроглия	Способствует дифференцировке миобластов в остеобласты
P2RY12	Пуринергический рецептор P2Y12	Поверхностный	Тромбоциты, микроглия	Участвует в агрегации тромбоцитов, свертывании крови, миграции микроглиальных клеток
<i>Молекулы панлейкоцитарного ряда</i>				
CD45	Тирозиновая протеинфосфатаза C рецепторного типа, общий лейкоцитарный антиген	Поверхностный	Лимфоциты, лейкоциты, моноциты, макрофаги	Осуществляет активацию Т-клеток через Т-клеточный рецептор
HLA-DR	Человеческий лейкоцитарный антиген	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты	Выступает рецептором молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС II)
<i>Молекулы миелоидного ряда</i>				
CD14	—	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы	Является мембранным гликозилфосфатидилинозитолсвязанным белком и корцептором для Toll-подобных рецепторов, способствует клеточному ответу на низкие дозы LPS
CD11b	Интегрин альфа-M	Поверхностный	НК-клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, микроглия	Представляет собой альфа-субъединицу интегрина (MAC-1), обеспечивает клеточную адгезию, а также поглощение частиц, покрытых комплементом

Окончание таблицы
Ending table

Маркер	Альтернативное название	Тип по локализации в клетке	Экспрессия	Функция
CD209	Молекула межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрина (DC-SIGN)	Поверхностный	Дендритные клетки, макрофаги	Является С-лектиновым рецептором, осуществляет распознавание патогенов, обеспечивает клеточную адгезию
CD80	B7-1	Поверхностный	Т-лимфоциты, моноциты	Представляет собой мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, является лигандом молекул CD28 и CD152 (CTLA-4), а также костимуляторной молекулой, участвующей в активации Т-клеток
CD115	Рецептор колониестимулирующего фактора – 1 (CSF-R1)	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, остеокласты	Осуществляет регуляцию роста, дифференцировку миелоидных клеток
CX3CR1	Хемокиновый рецептор типа 1, рецептор типа 1 хемокина CX3C, фракталиновый рецептор	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, остеокласты, микроглия	Обеспечивает миграцию и адгезию клеток
CD16	FcγRIII	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, НК-клетки, нейтрофилы	Является низкоаффинным рецептором к иммуноглобулину G
CCR2	CD192, хемокиновый рецептор типа 2	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, микроглия	Выступает рецептором моноцитарного хемоаттрактантного белка – 1, обеспечивает хемотаксис моноцитов

Для различия резидентной микроглии и периваскулярных моноцитов или макрофагов используют количественную оценку уровня экспрессии (высокий (high) или низкий (low)). Таким образом, микроглиальные клетки описывают как CD11b^{high} CD45^{low}, а моноциты или макрофаги – как CD11b^{high} CD45^{high}, однако стоит учитывать, что экспрессия CD45 микроглией увеличивается с возрастом человека [35]. Также выявлено различие в экспрессии молекулы хемокинового рецептора CX3CR1 между микроглией и моноцитами. Микроглиальные клетки характеризуются высокой экспрессией CX3CR1 и низкой экспрессией молекулы CCR2 (CD192) (CX3CR1^{high} CCR2 (CD192)^{low}) по сравнению с моноцитами (CX3CR1^{low} CCR2 (CD192)^{high}) [36].

Однако микроглиальные клетки отличаются определенной степенью гетерогенности в экспрессии всех вышеперечисленных молекул (см. таблицу). Диапазон экспрессии варьируется в зависимости от степени активации микроглиальных клеток, локализации в головном мозге, возраста [34].

Модели *in vitro* микроглиальных клеток

За прошедшее время были созданы различные модели *in vitro* для изучения микроглии. Наиболее распространенными из них являются клеточные линии микроглии, полученные из головного либо спинного мозга грызунов (мышей (BV2, C8-B4, EOC, MG5, N3, N9) и крыс (HAPI, Ra2, MLS-9)), человеческого эмбриона (CHME-5, HMO6) или взрослого человека и immortalized путем вирусной трансдукции онкогенами *v-myc*, *v-raf*, *v-mil*, *c-myc*, *SV40 T antigen* либо путем спонтанной immortalization в клеточной культуре [6; 37].

Использование immortalized клеточных линий имеет как преимущества, так и недостатки. В частности, процесс immortalization приводит к изменению микроглиального фенотипа, а также некоторых функциональных свойств клеток, что вызывает затруднения при интерпретации результатов исследований [38]. Главным достоинством данной модели является ее доступность, так как клетки обладают неограниченной пролиферативной способностью, что обеспечивает большое количество биомассы для исследований. В то же время протоколы получения первичных культур микроглиальных клеток достаточно сложны в исполнении, а сами клетки обладают ограниченным потенциалом к делению [38; 39].

Применение первичной культуры микроглии ограничено по этическим и техническим причинам. Например, для получения первичной человеческой микроглии используют абортный материал или донорский материал после смерти человека. При этом стоит учитывать, что условия и время транспортировки в лабораторию, последующие технические манипуляции для выделения культуры микроглии будут непосредственно влиять не только на жизнеспособность, но и на функциональные свойства клеток [39]. Как упоминалось ранее, микроглия имеет различия в уровнях экспрессии некоторых генов в зависимости от возраста. Так, гены *TMEM119*, *MafB* экспрессируются только во взрослом организме, что свидетельствует о некорректности обобщения данных, полученных при исследовании только эмбриональной микроглии [40].

Было показано, что, несмотря на большое сходство человеческой модели микроглиальных клеток и зооморфных моделей (грызуны) в экспрессии молекул Iba-1, фактора транскрипции PU.1, а также схожую реакцию на эндогенные и экзогенные стимулы, например на LPS, M-CSF, существуют некоторые важные различия. Так, микроглия грызунов, в отличие от человеческой, не экспрессировала ряд генов, продукты которых вовлечены в иммунный ответ (гены рецепторов *TLR*, *Fcγ*, *SIGLEC (CD33)*, а также гены *TAL1*, *IFI16*, участвующие в регуляции пролиферации и клеточного цикла) [7]. Анализ транскриптомов при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона) выявил различия в экспрессии отдельных генов, соответствующих данным заболеваниям, между грызунами и человеком [41]. Таким образом, из-за межвидовых различий необходимо более внимательно подходить к вопросу экстраполяции данных, полученных при исследовании на зооморфных моделях.

В последние годы были предложены альтернативные модели микроглиальных клеток, основанные на дифференцировке из иПСК и моноцитов периферической крови человека. В 2007 г. впервые получены иПСК из фибробластов дермы взрослого человека путем их перепрограммирования с помощью введения четырех транскрипционных факторов – Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4 [42]. В дальнейшем стали появляться протоколы получения микроглиеподобных клеток из иПСК.

В 2017 г. были представлены данные, описывающие дифференцировку иПСК в микроглиеподобные клетки в течение 5–6 недель. Изначально иПСК человека культивировали на протяжении 10 дней в среде с добавлением FGF2 (50 нг/мл), VEGF (50 нг/мл), TPO (50 нг/мл), SCF (10 нг/мл), IL-3 (10 нг/мл), IL-6 (50 нг/мл), периодически помещая в условия 5 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C для дифференцировки в миелоидные клетки-предшественники CD45⁺. Затем исходную среду меняли на бессывороточную среду DMEM/F12 (без фенолового красного), содержащую M-CSF (25 нг/мл), IL-34 (100 нг/мл), TGF-β1 (50 нг/мл), и культивировали в стандартных условиях на протяжении 25 дней (каждые 2 дня добавляли по 2 мл свежей среды, а на 12-й день заменяли 50 % от общего объема среды на свежую среду). На 25-й день дифференцировки к клеткам дополнительно добавляли гликопротеин OX-2 (CD200) (100 нг/мл) и хемокин CX3CL1 (100 нг/мл) и культивировали еще в течение 3 дней. Анализ экспрессии генов полученных микроглиеподобных клеток показал сходство с первичной культурой микроглии взрослого человека [9; 10].

В 1994 г. появились первые сведения о том, что культивирование полученных от крыс моноцитов или макрофагов на монослое астроцитов либо в астроцитарной кондиционированной среде приводит к дифференцировке клеток в микроглиальном направлении с характерной разветвленной морфологией [43]. Результаты этих исследований положили начало разработке модели индуцированных микроглиеподобных клеток (*induced microglia-like cells*), дифференцированных из моноцитов периферической крови человека, для изучения функциональных свойств микроглии как в норме, так и при патологии, в частности при нейродегенеративных и психических заболеваниях.

В 2006 г. опубликован первый протокол получения микроглиеподобных клеток, которые ученые использовали для изучения ВИЧ-инфекции [44]. Он основывался на выделении моноцитов из фракции мононуклеаров периферической крови с последующим культивированием клеток в питательной среде DMEM, содержащей FBS (10 %), смесь антибиотиков, GM-CSF (1 нг/мл) и M-CSF (10 нг/мл), на протяжении 2 дней. После этого моноциты пересевали и культивировали при тех же условиях, но уже с добавлением 25 % эмбриональной астроцитарной кондиционированной среды около 8 дней до появления

разветвленных микроглиеподобных клеток. Иммунофенотипический анализ полученных клеток показал высокую экспрессию специфичного для микроглии маркера Iba-1, а также среднюю экспрессию CD4, CD14 и низкую экспрессию HLA-DR, CCR5, CXCR4 [44].

Протоколы получения микроглиеподобных клеток имеют некоторые различия. Одни из них для индукции дифференцировки предусматривают применение только коктейля цитокинов IL-34 (100 нг/мл), GM-CSF (10 нг/мл), в то время как другие предполагают использование дополнительных факторов, таких как TGF- β , IFN- γ , M-CSF, а также астроцитарную кондиционированную среду и внеклеточный матрикс. Главным преимуществом данных методик является то, что получить микроглиеподобные клетки для дальнейших исследований удастся за 10–14 дней. При этом иммунофенотип клеток характеризуется экспрессией типичных микроглиальных маркеров, таких как P2RY12, CD68, Iba-1, IRF8, TMEM119, CD11b, HLA-DR [45–48]. Микроглиеподобные клетки и первичная микроглия также схожи в экспрессии генов *APOE*, *TREM2*, *C1QA-C*, *IRF8b*, *P2RX7*, *P2RY12* [47; 49].

Заключение

Согласно современным представлениям в ходе эмбрионального развития нативные микроглиальные клетки головного мозга происходят из эритромиелоидных клеток-предшественников CD45⁺c-kit⁺ желточного мешка. Для микроглиальных клеток характерна экспрессия общих миелоидных маркеров, ряда маркеров моноцитарно-макрофагальной линии, а также специфичных только для микроглии молекул. В настоящее время существуют три варианта получения микроглии для научно-исследовательских целей – первичная культура из тканей ЦНС, перевиваемые клеточные линии, а также дифференцировка из iPSC и моноцитов. Применение моделей микроглиальных клеток, основанных на дифференцировке из iPSC и моноцитов периферической крови человека, позволяет преодолеть ряд технических и этических сложностей, которые возникают при использовании первичной культуры или перевиваемых линий. Однако это достаточно новая область научных исследований. В дальнейшем требуются разработка стандартизированного метода получения микроглиеподобных клеток, подробное описание функциональных и морфологических свойств микроглии в целях расширения научной доказательной базы возможности ее использования в качестве модели *in vitro* для изучения клеток в норме и при патологии.

Библиографические ссылки/References

1. Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease. *Annual Review of Physiology*. 2017;79: 619–643. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406.
2. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological Reviews*. 2011;91(2):461–553. DOI: 10.1152/physrev.00011.2010.
3. De Picker LJ, Morrens M, Chance SA, Boche D. Microglia and brain plasticity in acute psychosis and schizophrenia illness course: a meta-review. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;8:238. DOI: 10.3389/fpsy.2017.00238.
4. Barichello T, Simoes LR, Quevedo J, Zhang XY. Microglial activation and psychotic disorders: evidence from pre-clinical and clinical studies. In: Khandaker GM, Meyer U, Jones PB, editors. *Neuroinflammation and schizophrenia*. Cham: Springer; 2020. p. 161–205 (Current topics in behavioral neurosciences; volume 44). DOI: 10.1007/7854_2018_81.
5. World Health Organization, Regional Office for Europe. *Mental health: facing the challenges, building solutions. Report from the WHO European ministerial conference*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2005. XI, 182 p.
6. Timmerman R, Burn SM, Bajramovic JJ. An overview of *in vitro* methods to study microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12:242. DOI: 10.3389/fncel.2018.00242.
7. Galatro TF, Holtman IR, Lerario AM, Vainchtein ID, Brouwer N, Sola PR, et al. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nature Neuroscience*. 2017;20(8):1162–1171. DOI: 10.1038/nn.4597.
8. Smith AM, Dragunow M. The human side of microglia. *Trends in Neurosciences*. 2014;37(3):125–135. DOI: 10.1016/j.tins.2013.12.001.
9. Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, Healy LM, Nguyen CHH, Newman SA, et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*. 2017;94(2):278–293. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.03.042.
10. Haenseler W, Sansom SN, Buchrieser J, Newey SE, Moore CS, Nicholls FJ, et al. A highly efficient human pluripotent stem cell microglia model displays a neuronal-co-culture-specific expression profile and inflammatory response. *Stem Cell Reports*. 2017; 8(6):1727–1742. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.05.017.
11. Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9:247. DOI: 10.1186/1742-2094-9-247.
12. Ramón y Cajal S. The structure and connexions of neurons. In: *Nobel lectures. Physiology or medicine, 1901–1921* [Internet]. Amsterdam: Elsevier Publishing Company; 1967 [cited 2021 August 30]. p. 220–253. Available from: <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/cajal-lecture.pdf>.
13. Tremblay M-È, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V, Sierra A. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2015;9:45. DOI: 10.3389/fnana.2015.00045.

14. Fujita S, Kitamura T. Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia. In: Jellinger K, Seitelberger F, editors. *Malignant lymphomas of the nervous system. International symposium organized by the Österreichische Arbeitsgemeinschaft für Neuro-pathologie und the Research Group of Neuropathology of the World Federation of Neurology; 1974 August 29–31; Wien, Austria*. Berlin: Springer-Verlag; 1975. p. 291–296 (Acta neuropathologica: supplementum; volume 6). DOI: 10.1007/978-3-662-08456-4_51.
15. Skoff RP. The fine structure of pulse labeled (^3H -thymidine cells) in degenerating rat optic nerve. *The Journal of Comparative Neurology*. 1975;161(4):595–611. DOI: 10.1002/cne.901610408.
16. McKanna JA. Lipocortin 1 immunoreactivity identifies microglia in adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research*. 1993; 36(4):491–500. DOI: 10.1002/jnr.490360415.
17. Sántha K, Juba A. Weitere Untersuchungen über die Entwicklung der Hortegaschen Mikroglia. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1933;98:598–613. DOI: 10.1007/BF01814660.
18. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*. 1985;15(2):313–326. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90215-5.
19. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841–845. DOI: 10.1126/science.1194637.
20. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Gomez Perdiguero E, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via PU.1- and IRF8-dependent pathways. *Nature Neuroscience*. 2013;16(3):273–280. DOI: 10.1038/nn.3318.
21. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656–661. DOI: 10.1126/science.1178331.
22. Ginhoux F, Prinz M, Nandi S. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015;7(8):a020537. DOI: 10.1101/cshperspect.a020537.
23. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2009;4(4):399–418. DOI: 10.1007/s11481-009-9164-4.
24. Tang Yu, Le Weidong. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(2):1181–1194. DOI: 10.1007/s12035-014-9070-5.
25. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*. 2018;173(5):1073–1081. DOI: 10.1016/j.cell.2018.05.003.
26. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*. 2014;17(1):131–143. DOI: 10.1038/nn.3599.
27. Yeh FL, Hansen DV, Sheng M. TREM2, microglia, and neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 2017;23(6): 512–533. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.03.008.
28. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba-1. *Molecular Brain Research*. 1998;57(1):1–9. DOI: 10.1016/S0169-328X(98)00040-0.
29. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *PNAS*. 2016;113(12):E1726–E1746. DOI: 10.1073/pnas.1525528113.
30. Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, et al. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia*. 2003;44(3):242–250. DOI: 10.1002/glia.10293.
31. Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J. P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*. 2017;65(2):375–387. DOI: 10.1002/glia.23097.
32. Akiyama H, McGeer PL. Brain microglia constitutively express β -2 integrins. *Journal of Neuroimmunology*. 1990;30(1):81–93. DOI: 10.1016/0165-5728(90)90055-r.
33. Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*. 2011;59(2):177–187. DOI: 10.1002/glia.21104.
34. Walker DG, Lue L-F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2015;7:56. DOI: 10.1186/s13195-015-0139-9.
35. Martin E, El-Behi M, Fontaine B, Delarasse C. Analysis of microglia and monocyte-derived macrophages from the central nervous system by flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;124:55781. DOI: 10.3791/55781.
36. Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *The Journal of Immunology*. 2012;188(1):29–36. DOI: 10.4049/jimmunol.1100421.
37. Rodhe J. Cell culturing of human and murine microglia cell lines. In: Joseph B, Venero JL, editors. *Microglia: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2013. p. 11–16 (Methods in molecular biology; volume 1041). DOI: 10.1007/978-1-62703-520-0_2.
38. Melief J, Sneeboer MAM, Litjens M, Ormel PR, Palmen SJMC, Huitinga I, et al. Characterizing primary human microglia: a comparative study with myeloid subsets and culture models. *Glia*. 2016;64(11):1857–1868. DOI: 10.1002/glia.23023.
39. Mizze MR, Miedema SSM, van der Poel M, Adelia, Schuurman KG, van Strien ME, et al. Isolation of primary microglia from the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. *Acta Neuropathologica Communications*. 2017;5:16. DOI: 10.1186/s40478-017-0418-8.
40. Lenz KM, Nelson LH. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:698. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00698.
41. Burns TC, Li MD, Mehta S, Awad AJ, Morgan AA. Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: a systematic bioinformatics-based critique of preclinical models. *European Journal of Pharmacology*. 2015;759:101–117. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.021.
42. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
43. Sievers J, Parwaresch R, Wottge H-U. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia*. 1994;12(4):245–258. DOI: 10.1002/glia.440120402.
44. Leone C, Le Pavec G, Mème W, Porcheray F, Samah B, Dormont D, et al. Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia*. 2006;54(3):183–192. DOI: 10.1002/glia.20372.

45. Ohgidani M, Kato TA, Setoyama D, Sagata N, Hashimoto R, Shigenobu K, et al. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu – Hakola disease. *Scientific Reports*. 2014;4:4957. DOI: 10.1038/srep04957.
46. Banerjee A, Lu Y, Do K, Mize T, Wu X, Chen X, et al. Validation of induced microglia-like cells (iMG cells) for future studies of brain diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021;15:629279. DOI: 10.3389/fncel.2021.629279.
47. Ormel PR, Böttcher C, Gigase FAJ, Missall RD, van Zuiden W, Fernández Zapata MC, et al. A characterization of the molecular phenotype and inflammatory response of schizophrenia patient-derived microglia-like cells. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020; 90:196–207. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.08.012.
48. Etemad S, Zamin RM, Ruitenberg MJ, Filgueira L. A novel *in vitro* human microglia model: characterization of human monocyte-derived microglia. *Journal of Neuroscience Methods*. 2012;209(1):79–89. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.05.025.
49. Sellgren CM, Gracias J, Watmuff B, Biag JD, Thanos JM, Whittredge PB, et al. Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nature Neuroscience*. 2019;22(3):374–385. DOI: 10.1038/s41593-018-0334-7.

Получена 25.08.2022 / исправлена 26.09.2022 / принята 26.09.2022.
Received 25.08.2022 / revised 26.09.2022 / accepted 26.09.2022.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 577.352.46

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ И РАДИОИЗОТОПНЫЙ АНАЛИЗ ПОТОКОВ ИОНОВ, ИНДУЦИРУЕМЫХ СОЛЕВЫМ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ, В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**В. В. САМОХИНА¹⁾, П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾,
А. И. СОКОЛИК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾**

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

Под действием стресс-факторов среды активируется выход важнейших электролитов неорганической и органической природы из клеток корня во внешнее пространство. Данное явление описано для засоления, засухи, атаки патогенов, воздействия тяжелых металлов, окислительного стресса и др. Выход электролитов также наблюдается

Образец цитирования:

Самохина ВВ, Гриусевич ПВ, Соколик АИ, Демидчик ВВ. Электрофизиологический и радиоизотопный анализ потоков ионов, индуцируемых солевым и окислительным стрессом, в клетках корня высших растений. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:14–25. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-14-25>

For citation:

Samokhina VV, Hryvusevich PV, Sokolik AI, Demidchik VV. Electrophysiological and radioisotope analysis of ion fluxes induced by salt and oxidative stress in higher plant root cells. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:14–25. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-14-25>

Авторы:

Вероника Валерьевна Самохина – старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений.

Полина Вацлавовна Гриусевич – старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

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

Authors:

Veranika V. Samokhina, senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, and researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology.

samokhina@bsu.by

Palina V. Hryvusevich, senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, and junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology. hryvusevich@bsu.by

Anatoliy I. Sokolik, PhD (biology), docent; head of the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

sokolik@bsu.by

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

dzemidchik@bsu.by

в рамках некоторых процессов нормальной физиологии как часть гравитропического ответа, формирования полярности и роста клетки растяжением. Несмотря на длительное изучение данного феномена, его молекулярный механизм остается непонятным. В настоящем исследовании для изучения биофизической и молекулярной природы выхода ионов из клеток корня развит комплексный подход на основе метода меченых атомов (загрузка $^{86}\text{Rb}^+$ с последующей регистрацией параметров его выхода из клеток корня), реверсивной генетики и техники локальной фиксации потенциала на мембране. Продemonстрировано, что в корнях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. выход K^+ при засолении и окислительном стрессе обеспечивается K^+ -каналами, кодируемыми геном *GORK* (*guard cell outward-rectifying K^+ channel*), а выход органических анионов – анионными каналами, кодируемыми геном *ALMT1* (*aluminum-activated malate transporter 1*). Установлены особенности совместного функционирования данных систем при стрессе.

Ключевые слова: метод локальной фиксации потенциала; электрофизиология растений; радиоизотопный анализ; $^{86}\text{Rb}^+$; ионный канал; GORK; ALMT1.

Благодарность. Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Характеризация пассивного транспорта органических анионов через плазматическую мембрану клеток корня высших растений» по гранту Министерства образования Республики Беларусь на 2022 г. (№ гос. регистрации 20220676), а также в рамках задания «Закономерности воздействия холодной плазмы на процессы клеточной сигнализации у высших растений» государственной программы научных исследований «Конвергенция-2025» (№ гос. регистрации 20211734).

Вклад авторов. В. В. Самохиной выполнен анализ выхода K^+ с использованием $^{86}\text{Rb}^+$ и написана часть работы, рассматривающая участие калиевых каналов GORK в стрессовых ответах у высших растений. П. В. Гриусевич проведена серия электрофизиологических тестов с помощью техники пэтч-кламп, а также написаны части статьи о молекулярной природе анионной и катионной проводимости. А. И. Соколик обеспечивал поддержку в проведении радиоизотопных тестов, приобретении изотопа, приготовлении изотопных растворов и расчете кинетических параметров выхода $^{86}\text{Rb}^+$. В. В. Демидчик осуществлял планирование экспериментов, подготовку растительного материала, анализ электрофизиологических данных и подготовку текста статьи.

ELECTROPHYSIOLOGICAL AND RADIOISOTOPE ANALYSIS OF ION FLUXES INDUCED BY SALT AND OXIDATIVE STRESS IN HIGHER PLANT ROOT CELLS

V. V. SAMOKHINA^a, P. V. HRYVUSEVICH^a,
A. I. SOKOLIK^a, V. V. DEMIDCHIK^a

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

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

Environmental stresses induce the release of electrolytes from root cells into the extracellular space, including key inorganic and organic ions. This phenomenon is described for salinity, drought, attack of pathogens, exposure to heavy metals, oxidative stress, etc. The efflux of electrolytes is also observed during some processes of normal physiology, being part of the gravitropic response, the formation of polarity and the growth of the cell elongation. Despite the long study of this phenomenon, today its molecular mechanism remains unclear. In the present study, a combined approach based on the labeled atom method (loading isotope $^{86}\text{Rb}^+$ followed by recording the parameters of its efflux from root cells), reverse genetics and the patch-clamp technique has been developed for testing the biophysical and molecular nature of the efflux of electrolytes from the root cells. It has been demonstrated that in the roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., the K^+ efflux during salinisation and oxidative stress is catalysed by K^+ channels encoded by the *GORK* gene (*guard cell outward-rectifying K^+ channel*), and the efflux of organic anions – by anion channels encoded by the *ALMT1* gene (*aluminum-activated malate transporter 1*). The characteristics of the combined functioning of these systems under stress have been established.

Keywords: patch-clamp; plant electrophysiology; radioisotope analysis; $^{86}\text{Rb}^+$; ion channel; GORK; ALMT1.

Acknowledgements. This study was supported as a part of the research project «Characterisation of the passive transport of organic anions across the plasma membrane of higher plant root cells» under a grant from the Ministry of Education of the Republic of Belarus for 2022 (No. 20220676), as well as within the framework of the assignment «Regularities of the impact of cold plasma on the processes of cell signaling in higher plants» of the state program of scientific research «Convergence-2025» (No. 20211734).

Author's contribution. V. V. Samokhina analysed K^+ efflux using $^{86}\text{Rb}^+$ and wrote a part of the work considering the participation of GORK potassium channels in stress responses in higher plants. P. V. Hryvusevich conducted a series of electrophysiological tests using the patch-clamp technique and also wrote parts of the article on the molecular nature of anion and cation conductivity. A. I. Sokolik provided support in carrying out radioisotope tests, isotope acquisition, preparation of isotope solutions, and calculation kinetic parameters of $^{86}\text{Rb}^+$ efflux. V. V. Demidchik carried out the planning of experiments, preparation of plant material, analysis of electrophysiological data and preparation of the article.

Введение

Активация выхода электролитов из клеток корня растений – важная реакция, наблюдаемая в ходе ответа на большинство стрессовых факторов, а также в рамках ряда процессов нормальной физиологии [1]. Данное явление характерно для ранних стадий влияния засоления [2], засухи [3], тяжелых металлов [4], повышенной кислотности почвы [5], свободного алюминия [6], ультрафиолета [7], экстремальных температур [8], ксенобиотиков и разнообразных патогенов [9]. Оно описано практически для всех важнейших семейств высших растений и считается универсальной маркерной реакцией на стресс [2; 10–18].

Несмотря на хорошую изученность стрессиндуцированного выхода (оттока, или утечки) электролитов, все еще не ясно, какими конкретно механизмами он реализуется. Так, известно, что выходящий поток электролитов состоит главным образом из ионов K^+ и противоионов (анионов) [19–22]. Тем не менее информация о конкретных ионных транспортерах, вовлеченных в данное явление, крайне фрагментарна. В частности, неясны молекулярные механизмы, запускающие активацию ионных транспортеров в ответ на стрессовое воздействие.

Сильный стресс может приводить к критическому снижению уровня K^+ в клетке (до 5–10 ммоль/л) [1], что в зависимости от степени повреждения вызывает обратимую или необратимую потерю K^+ , ионный дисбаланс, автофагию и запрограммированную клеточную гибель [7]. Недавно установлено, что введение в среду блокаторов ионных каналов приводит к значительному снижению оттока K^+ и анионов. Это предполагает вовлечение ионных каналов плазматической мембраны (ПМ) в данную реакцию, т. е. указывает на регулируемый характер рассматриваемого феномена [2; 23].

В оттоке катионов может быть задействована значительная группа ионных каналов. На сегодняшний день идентифицированы следующие семейства K^+ -проницаемых катионных каналов высших растений: потенциалзависимые K^+ -селективные каналы (Shakers); тандемно-поровые каналы (TPK); ионотропные глутаматные рецепторы (GLR); каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (CNGC); двупоровые каналы (TPC); механочувствительные каналы (MCA); механочувствительноподобные каналы (MSC); механочувствительные пьезоканалы (Piezo); аннексыны (ANN); каналы, активируемые гиперосмольностью (OSCA) [1; 7; 24; 25]. В последние годы показано, что в транспортировке выходящего потока K^+ доминируют деполяризационно-активируемые K^+ -селективные каналы семейства Shakers [24] и потенциалнезависимые неселективные катионные каналы [26]. Калиевые каналы (K^+ -каналы), активируемые при положительном напряжении на мембране, обеспечивают выходящий поток K^+ в большинстве растительных клеток, однако пока не ясно, какова молекулярная природа модулирования их активности при стрессе [27; 28]. Одним из возможных механизмов является воздействие активных форм кислорода (АФК), которые накапливаются в тканях растения при стрессе [29]. В последние годы показано, что на присутствие в среде АФК способны реагировать два типа K^+ -каналов:

- SKOR (*stelar K^+ outward-rectifying channel*) – опосредует отток K^+ из клеток стелы корня в ксилему [30];
- GORK (*guard cell outward-rectifying K^+ channel*) – может катализировать отток K^+ из устьичных клеток [23]. Примечательно, что ген *GORK* также обильно экспрессируется в эпидермисе корня [1]. Данный канал рассматривается в качестве наиболее вероятной доминирующей K^+ -проводящей системы при стрессе.

Выходящий поток анионов у высших растений обеспечивают анионные каналы [31], представленные тремя семействами генов: *SLAC* (*slow anion channel*), *ALMT* (*aluminum-activated malate transporter*) и *CLC* (*chloride channel*) [31]. Каналы CLC напрямую не задействованы в выходе анионов из клеток, поскольку локализованы в эндомембранах [32]. Имеются работы, показывающие прямое вовлечение каналов *SLAC1* в отток анионов из замыкающих клеток устьиц [33; 34]. Каналы *ALMT1* считаются важнейшей системой, транспортирующей из клеток корня как неорганические, так и органические анионы [31; 35; 36]. Однако пока не получено доказательство их роли на генетическом уровне, так как не проведены тесты на нокаутных линиях по гену *ALMT1*. Кроме того, непонятно, какой спектр анионов, помимо неорганических, данные каналы транспортируют.

Цель настоящего исследования – установить роль ионных каналов GORK и ALMT1 в обеспечении выходящих потоков катионов и анионов из клеток корня модельного вида *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с использованием метода меченых атомов (анализ выхода $^{86}Rb^+$), реверсивной генетики и техники локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп).

Материалы и методы исследования

Растительный материал, использованный в работе. Объектом исследования являлись 7–12-дневные проростки *A. thaliana* (L.) Heynh. следующих генотипов:

- WS-0 (экотип Wassilevskija);
- *gork1-1* (нокаутная линия по гену *GORK*);

- Col-0 (экотип Columbia-0);
- *almt1* (нокаутная линия по гену *ALMT1*).

Семена были предоставлены Ноттингемским фондовым центром арабидопсиса (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*, Великобритания). Растения *A. thaliana* (L.) Heynh. культивировались в стерильных условиях на поверхности среды Мурасиге и Скуга (*Duchefa Biochemie*, Нидерланды) с добавлением 1 % сахарозы и 0,35 % Phytigel™ (*Sigma-Aldrich*, США), pH титровался до уровня 6,0 с помощью KOH. Чашки Петри помещались в ростовую камеру с контролируемыми условиями освещения (плотность светового потока 100 мкмоль фотонов в секунду на 1 м²) и световым режимом 16 ч света и 8 ч темноты при температуре 22 °С. Внешний вид 7-дневных проростков различных генотипов, выращенных в стерильной культуре, представлен на рис. 1. Растения не отличались по ростовым показателям, длина корней достигала 5–6 см у всех генотипов.

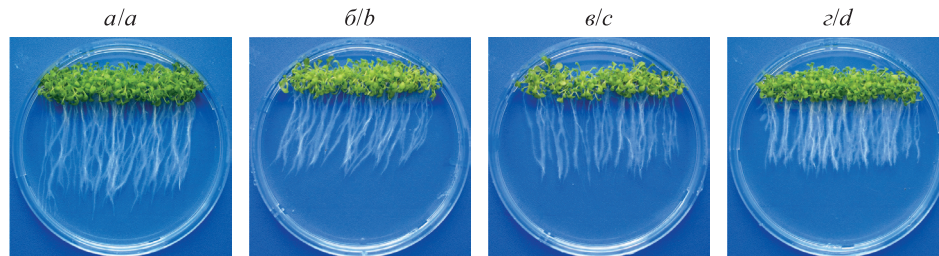


Рис. 1. Внешний вид проростков *A. thaliana* (L.) Heynh. различных генотипов, выращенных из семян в стерильной культуре на гелевой среде:
а – WS-0; б – *gork1-1*; в – Col-0; г – *almt1*

Fig. 1. Different genotypes of *A. thaliana* (L.) Heynh. seedlings grown from seeds in a sterile culture on gel medium:
a – WS-0; b – *gork1-1*; c – Col-0; d – *almt1*

Метод меченых атомов. В работе был использован изотоп $^{86}\text{Rb}^+$ (трейсер K^+), поставляемый фирмой-изготовителем (*POLATOM*, Польша) в форме хлорида. В связи с высоким периодом полураспада $^{86}\text{Rb}^+$ (18,6 дня) по сравнению с периодом полураспада $^{42}\text{K}^+$ (12 ч) данный трейсер применяется в качестве метки для изучения кинетики выхода K^+ [37]. Проростки закреплялись в специальных держателях и погружались в раствор состава 0,1 ммоль/л KCl, 0,1 ммоль/л CaCl_2 (уровень pH 6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (2 и 4 ммоль/л соответственно)), содержащий $^{86}\text{Rb}^+$. В течение 30 мин проростки загружались $^{86}\text{Rb}^+$, после чего переносились в раствор без изотопа. Далее определялся выход $^{86}\text{Rb}^+$. Остаточная активность проростков измерялась через определенные интервалы времени с помощью β -радиометра. Спустя 5 мин с момента начала регистрации выхода $^{86}\text{Rb}^+$ производилась обработка стрессорами, включая 200 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л H_2O_2 и смесь, генерирующую гидроксильные радикалы (1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2).

Анализ выходящего потока $^{86}\text{Rb}^+$ продемонстрировал наличие трех фаз – фазы I (до 5-й минуты), фазы II (с 5-й до 10-й минуты) и фазы III (с 10-й до 25-й минуты) (рис. 2).

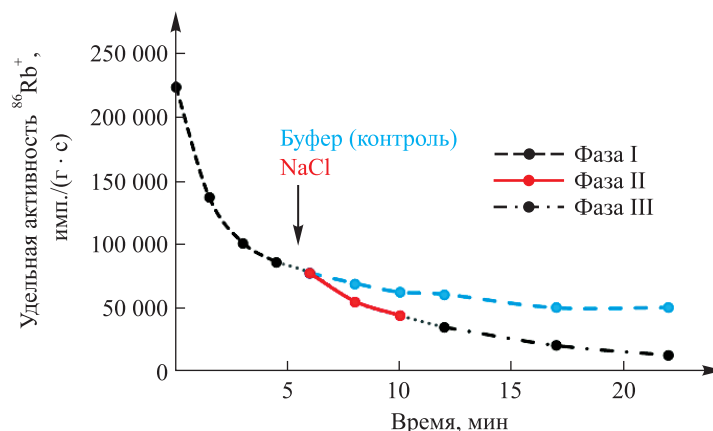


Рис. 2. Типичные кривые временного хода процесса выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. в контроле и под действием NaCl

Fig. 2. Typical time course curves of $^{86}\text{Rb}^+$ release from *A. thaliana* (L.) Heynh. roots in the control and in the presence of NaCl

Фаза I соответствовала выходу $^{86}\text{Rb}^+$ из клеточной стенки (апопласт). Фазы II и III были связаны с выходом $^{86}\text{Rb}^+$ из клеток корня (так называемый выход из симпласта).

По окончании эксперимента измерялась масса тестируемых корней и вычислялась удельная активность $^{86}\text{Rb}^+$, на основе которой рассчитывались значения скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ для фазы II при обработке стрессорами. Далее определялись их соотношения со значениями скорости выхода в контрольных условиях.

Выделение протопластов. Протопласты изолировались из тканей корня ферментативным методом согласно ранее разработанным протоколам [10]. Использовался ферментативный раствор следующего состава: 1,5 % целлюлазы OnozukaTM RS (*Yakult Honsha*, Япония), 1 % целлюлозы (*Calbiochem*, Великобритания), 0,1 % пектолиазы Y-23 (*Yakult Honsha*), 0,1 % альбумина (*Sigma-Aldrich*), 2 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л CaCl_2 , 1 ммоль/л MgCl_2 (уровень pH 5,8–6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (1 и 2 ммоль/л соответственно)). Осмоляльность всех растворов для работы в технике пэтч-кламп поддерживалась на уровне 300 мосмоль/кг добавлением D-сорбитола. После выделения протопласты содержались на льду, сохраняя жизнеспособность на протяжении 24 ч.

Регистрация и анализ ионных токов. Регистрация и анализ трансмембранных ионных токов выполнялись с применением техники пэтч-кламп [38]. Для создания гигаомной изоляции между специально изготовленной пэтч-пипеткой и ПМ протопласта использовался наружный раствор с высоким содержанием Ca^{2+} , состоящий из 20 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л KCl или NaCl (уровень pH 6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (1 и 2 ммоль/л соответственно)). Гигаомный контакт достигался за счет создания импульса негативного давления в пэтч-пипетке. Регистрация токов проводилась в конфигурации «целая клетка» (*whole-cell mode*). Состав пипеточного раствора варьировался в зависимости от цели эксперимента (см. далее по тексту). Экспериментальные растворы фильтровались через бактериальный фильтр (*Millipore*, Великобритания). Диффузионный потенциал растворов рассчитывался с помощью компьютерной программы JPCalc (*SDR Scientific*, Австралия), активность ионов – с помощью компьютерной программы *Geochem-EZ* (США).

Ионные токи через ПМ регистрировались усилителем PC-ONE Patch/Whole Cell Clamp (Cornerstone Series) (*Dagan*, США) с использованием компьютеризированного аналого-цифрового преобразователя Digidata 1322A (*Molecular Devices*, США). Для анализа данных применялись компьютерные программы *Clampex 9.2* и *Clampfit 9.2* (*Molecular Devices*). Протоколами фиксации напряжения на мембране предусматривалась подача прямоугольных импульсов от –180 до +95 мВ (регистрация наружунаправленных K^+ -токов и внутрьнаправленных Ca^{2+} -токов) и от –180 до –80 мВ (регистрация наружунаправленных анионных токов) с шагом 25 мВ при потенциале фиксации –90 мВ. Электрофизиологическая система была установлена на антивибрационном столе Nexus (*Thorlabs*, США). Использовались инвертированный микроскоп IM-2F (*Carl Zeiss*, Германия), микропозиционер MP-85 (*Sutter Instrument*, США) и набор периферийных устройств Axon Instruments (*Axon Instruments*, США). Токковые кривые и вольт-амперные характеристики (BAX) анализировались с помощью компьютерной программы *SigmaPlot 10.0* (*Systat Software Inc.*, США).

Статистическая обработка. Для обработки полученных результатов применялись стандартные методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками служили средняя арифметическая величина ($\bar{X}$), среднее квадратичное отклонение (σ) и ошибка средней величины (SE).

Результаты и их обсуждение

Регистрация скорости выходящего потока $^{86}\text{Rb}^+$. Одним из наименее инвазивных способов регистрации потока ионов является метод меченых атомов [39; 40]. В настоящей работе использовался меченый β -эмиттер $^{86}\text{Rb}^+$ – классический радиотрейсер K^+ . Применение рубидия было обусловлено его высоким сходством с K^+ по физико-химическим параметрам [39], а также тем, что ионтранспортные системы, обеспечивающие наружунаправленные потоки K^+ , проницаемы по отношению к $^{86}\text{Rb}^+$ [40].

При регистрации накопления $^{86}\text{Rb}^+$ в растении одновременно имеют место два потока – постоянный входящий и возрастающий выходящий. На рис. 3 и 4 представлены типичные кривые временного хода суммарного выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа и нокаутов по K^+ -каналу GORK в контрольных условиях и при воздействии засоления и окислительного стресса. Инкубация проростков *A. thaliana* (L.) Heynh. в растворе с изотопом на протяжении 30 мин приводила к накоплению $^{86}\text{Rb}^+$ в тканях растений. Средняя удельная активность $^{86}\text{Rb}^+$ составила 600–800 тыс. имп./г · с. Выходящий поток $^{86}\text{Rb}^+$ включал фазу I (до 5-й минуты), фазу II (с 5-й до 10-й минуты) и фазу III (с 10-й до 25-й минуты). Фазы наружунаправленного потока $^{86}\text{Rb}^+$ были зарегистрированы в контрольных условиях, а также при добавлении стрессоров в отмывочный раствор. При стрессе наблюдалось увеличение скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. во время фазы II. Фокус настоящего исследования был направлен на данную «цитоплазматическую» фазу, так как ее кинетические параметры отражают

работу ионно-канальных систем. Для нее рассчитаны скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ при обработке стрессорами и получены их соотношения со скоростью выхода в контрольных условиях (см. таблицу). В течение 2–4-й минуты (фаза I выхода) средняя удельная активность $^{86}\text{Rb}^+$ снижалась одинаково (в 3–4 раза, до уровня 200 тыс. имп./г·с) у *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа и линии *gork1-1*, лишенной функционального наружувывряющего K^+ -канала GORK (см. рис. 3 и 4).

Установлено, что у растений *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа выход $^{86}\text{Rb}^+$ под действием 200 ммоль/л NaCl ускорялся в 5,4 раза, под действием 1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2 – в 3,2 раза, а под действием 10 ммоль/л H_2O_2 – в 2,6 раза (см. таблицу). Скорость стрессиндуцируемого выхода $^{86}\text{Rb}^+$ у нокаутных по K^+ -каналу растений *gork1-1* была почти в 2 раза ниже, что свидетельствует об участии K^+ -канала GORK в оттоке K^+ из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. при стрессе.

Ранее выходящие потоки K^+ из тканей высших растений с использованием метода меченых атомов ($^{86}\text{Rb}^+$ как трэйсер K^+) были описаны для клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh., *Oryza sativa* L. и других видов [41–43]. В исследовании Ф. Жолдоса [43] отмечена массивная утечка K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) из корней *O. sativa* L. при обработке системным фунгицидом китазином ($1 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Было сделано предположение, что данное явление связано с нарушением целостности ПМ [43]. В лаборатории А. Мерфи установлено, что при воздействии Cu^{2+} наблюдается отток K^+ из корней арабидопсиса [41]. С использованием радиоизотопа $^{86}\text{Rb}^+$ также показано, что у линии *A. thaliana* (L.) Heynh. *akt-1* (K^+ -канал семейства Shakers, ответственный за вход K^+ в клетки корня высших растений) происходило снижение потоков K^+ в корнях, нарушение прорастания семян и замедление роста на фоне обеспеченности NH_4^+ [42]. Полученные в настоящем исследовании данные впервые указывают на конкретный тип ионных каналов, вовлеченных в наружунаправленный транспорт калия. Предположительно, канал GORK и канал АКТ-1 формируют единую систему для селективного выходящего и входящего потоков калия в корнях растений.

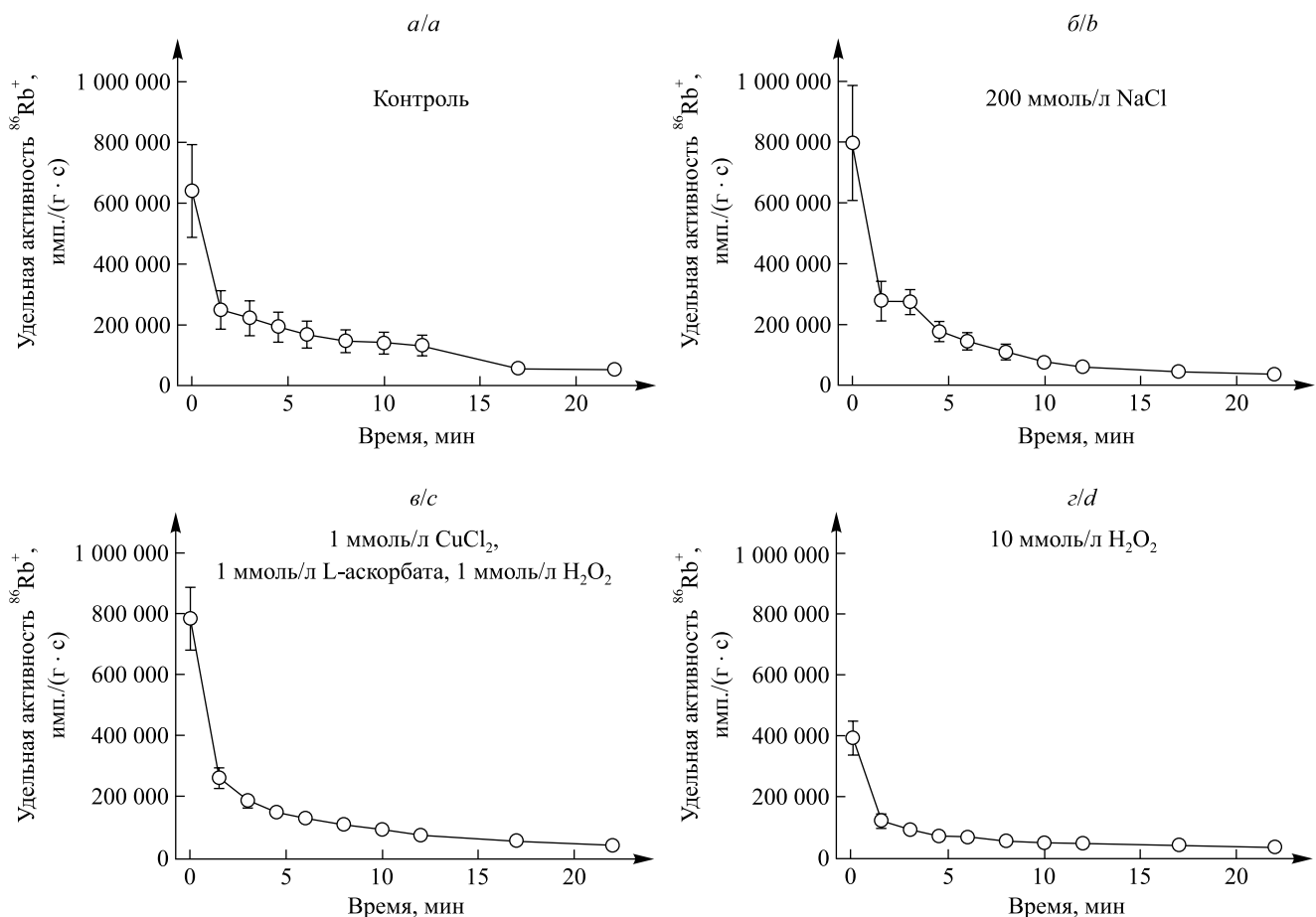


Рис. 3. Кривые временного хода процесса выхода $^{86}\text{Rb}^+$ ($n = 7-10$; $\bar{X} \pm \text{SE}$) из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (WS-0)

Fig. 3. Mean curves ($n = 7-10$; $\bar{X} \pm \text{SE}$) of the time course of $^{86}\text{Rb}^+$ release from *A. thaliana* (L.) Heynh. roots of wild-type (WS-0)

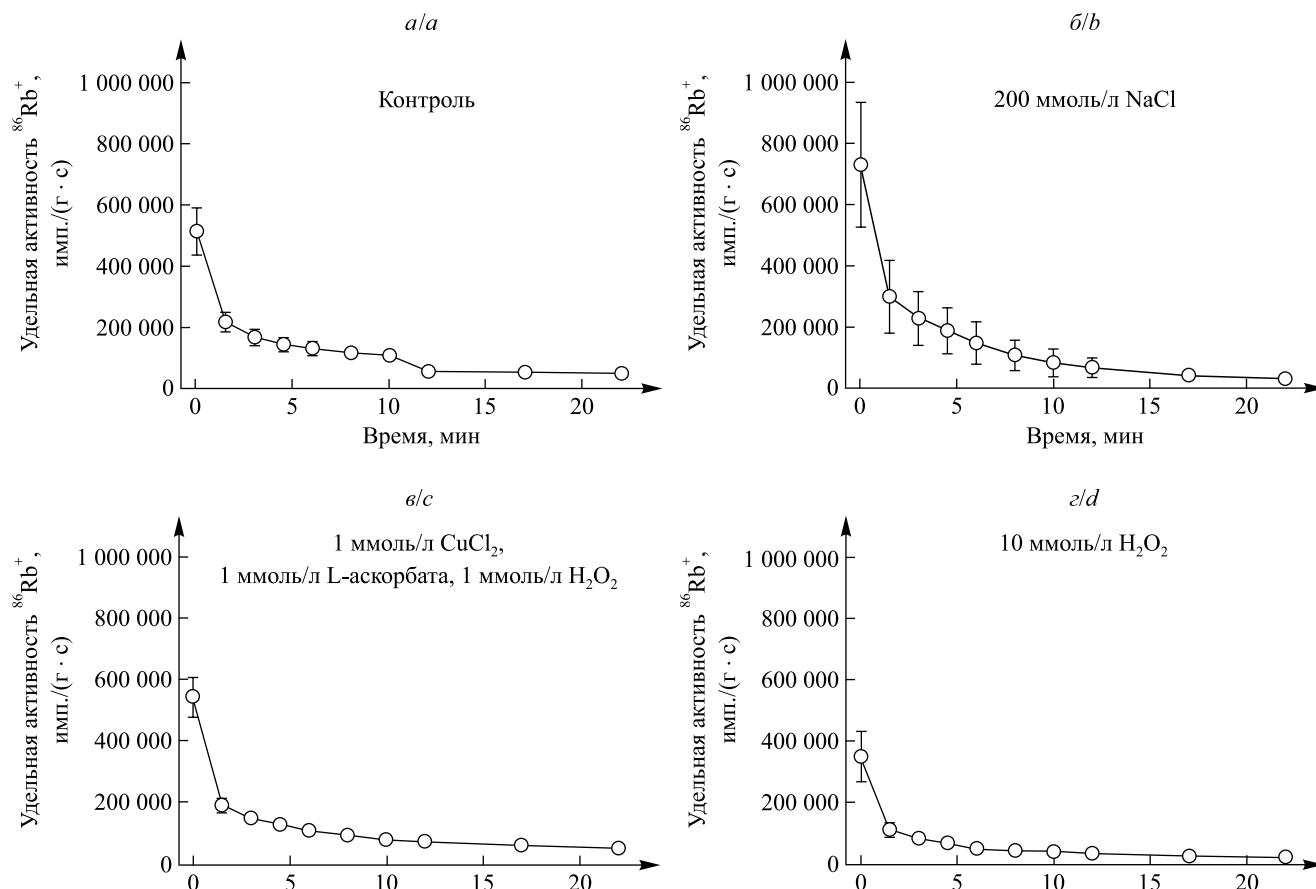


Рис. 4. Кривые временного хода процесса выхода $^{86}\text{Rb}^+$ ($n = 7-10$; $\bar{X} \pm \text{SE}$) из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. линии *gork1-1*
Fig. 4. Mean curves ($n = 7-10$; $\bar{X} \pm \text{SE}$) of the time course of $^{86}\text{Rb}^+$ release from *A. thaliana* (L.) Heynh. roots of *gork1-1* line

Средние значения скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из корней
A. thaliana (L.) Heynh. дикого типа (WS-0) и линии *gork1-1*
Mean values of $^{86}\text{Rb}^+$ release rate from *A. thaliana* (L.) Heynh.
roots of wild-type (WS-0) and *gork1-1* line

Состав растворов, которыми производилась обработка корней, загруженных $^{86}\text{Rb}^+$	Отношение скоростей, отн. ед. ($n = 8-10$; $\bar{X} \pm \text{SE}$)	
	WS-0	<i>gork1-1</i>
200 ммоль/л NaCl	$5,4 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,5$
1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2	$3,2 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,4$
10 ммоль/л H_2O_2	$2,6 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$

Анализ калиевых токов. В конфигурации «целая клетка» были зарегистрированы ионные токи через ПМ клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (WS-0) при окислительном стрессе. В данной технике возможно задать уровень содержания ионов во внутриклеточном пространстве (пипеточный раствор) и снаружи клетки (наружный раствор). В настоящем исследовании в пипеточном растворе поддерживался высокий уровень K^+ (50 ммоль/л) для регистрации его оттока из клеток, а также высокий уровень глюконат-ионов (40 ммоль/л), плохо проникающих через ПМ, и Cl^- (10 ммоль/л (минимальная активность для обеспечения электрического контакта)).

Анализ выходящих ионных токов продемонстрировал наличие классических быстро и медленно активирующихся компонент в наружунаправленной проводимости ПМ. Типичные кривые токов через ПМ представлены на рис. 5.

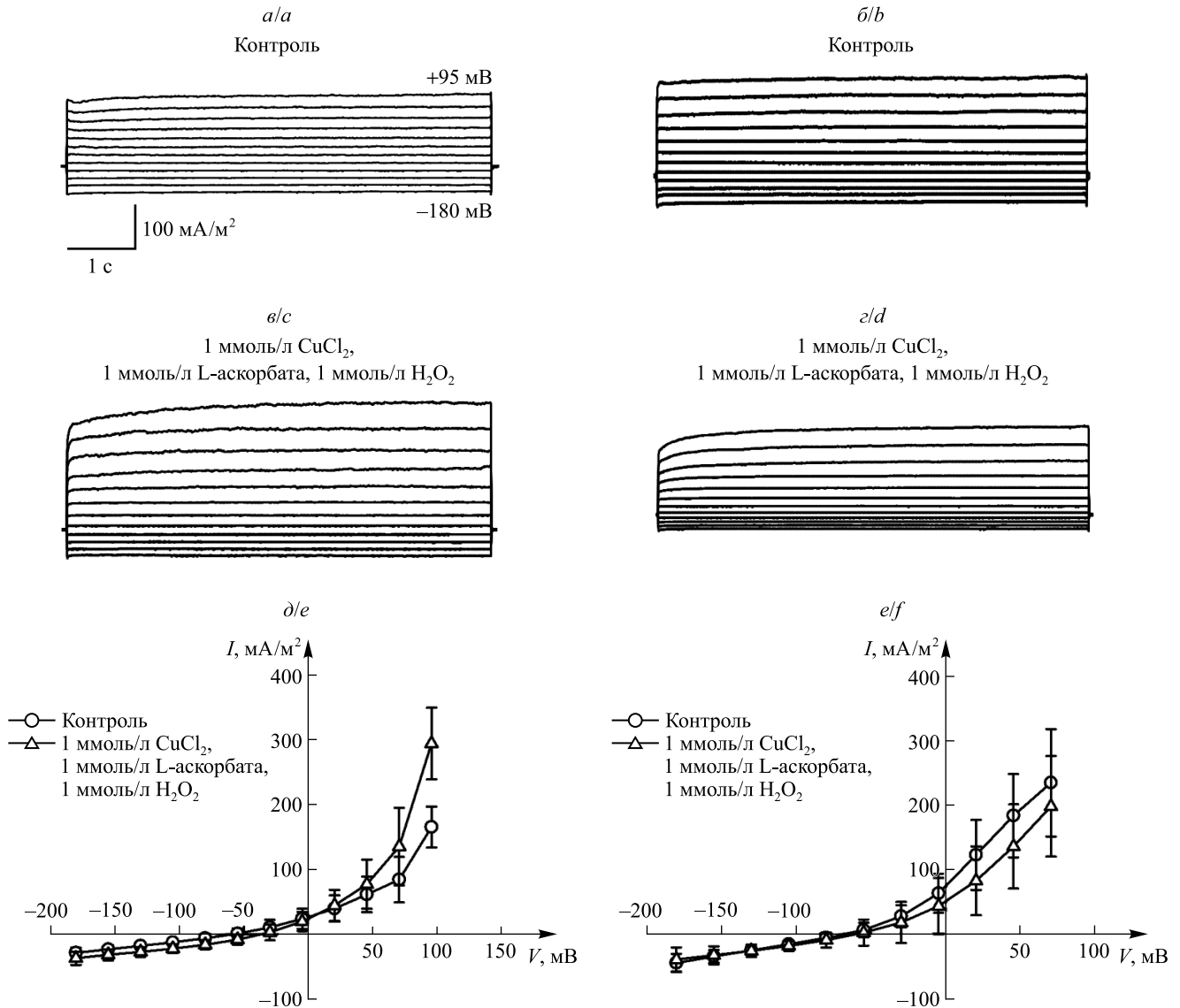


Рис. 5. Модификации ионных токов через ПМ протопластов, изолированных из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh.: а, в, д – дикого типа (WS-0); б, з, е – линии *gork1-1*. Типичные токовые кривые, полученные в ответ на прямоугольные импульсы напряжения в диапазоне от -180 до +95 мВ (а-з), и ВАХ, построенные по средним значениям токов ($n = 5-6$; $\bar{X} \pm SE$) (д, е). Наружный раствор – 20 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л KCl (pH 6,0 (2 ммоль/л MES, 1 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг). Пипеточный раствор – 40 ммоль/л K^+ -глюконата, 10 ммоль/л KCl, 100 нмоль/л Ca^{2+} (0,75 ммоль/л 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, 0,3 ммоль/л CaCl_2) (pH 7,2 (2 ммоль/л MES, 1 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг)

Fig. 5. Modifications of ion currents across the plasma membrane of *A. thaliana* (L.) Heynh. root cells in protoplasts isolated: а, с, е – from wild-type (WS-0); б, d, f – from *gork1-1* line. Typical current curves obtained using a series of square voltage pulses (from -180 to +95 mV) as a voltage-clamp protocol (а-d) and current-voltage curves obtained from the average values of currents ($n = 5-6$; $\bar{X} \pm SE$) (е, f). The standard bathing solution contained 20 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L KCl (pH 6.0 (2 mmol/L MES, 1 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg). The pipette solution contained 40 mmol/L K^+ gluconate, 10 mmol/L KCl, 100 nmol/L Ca^{2+} (0.75 mmol/L 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 0.3 mmol/L CaCl_2) (pH 7.2 (2 mmol/L MES, 1 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg)

Введение в наружный раствор смеси, генерирующей гидроксильные радикалы (1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2), приводило к увеличению медленно активирующейся компоненты выходящего тока и небольшому росту мгновенных токов (быстрой компоненты проводимости) во всех протестированных протопластах ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$). Активация ионных токов наблюдалась в течение 15–20 мин с момента начала генерации $\text{HO}^\bullet$ в наружном растворе (введения смеси, генерирующей гидроксильные радикалы). В контрольных условиях максимальная плотность ионного тока при деполяризации ПМ у растений *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа составляла $(165,4 \pm 31,6) \text{ мА/м}^2$ ($n = 6$; $X \pm \text{SE}$), воздействие $\text{HO}^\bullet$ приводило к повышению плотности тока до $(294,3 \pm 55,3) \text{ мА/м}^2$ ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$). Наружунаправленная проводимость снижалась при замене калия на блокатор K^+ -каналов (30 ммоль/л ТЭА⁺) в составе пипеточного раствора. Полученные данные свидетельствуют о том, что в отток K^+ при воздействии $\text{HO}^\bullet$ вовлечены ТЭА⁺-чувствительные K^+ -селективные каналы, которые, как было показано ранее, кодируются геном *GORK* и локализуются в ПМ клеток ризодермы высших растений [23]. В контрольных условиях зарегистрирована низкая внутрьнаправленная проводимость. Так как в наружном растворе поддерживался высокий уровень Ca^{2+} (20 ммоль/л), вероятно, данная проводимость была обусловлена входом Ca^{2+} в клетку. Введение в наружный раствор смеси, генерирующей гидроксильные радикалы, не вызывало изменение этой компоненты. Использование протокола регистрации ионных токов при высоком напряжении (более +90 мВ) приводило к нарушению гигаомного контакта в большинстве случаев (80 % протопластов).

Для установления группы ионных каналов, обеспечивающих отток K^+ при окислительном стрессе, была проведена серия электрофизиологических тестов на трансгенной линии *A. thaliana* (L.) Heynh. *gork1-1*, лишенной функционального наружувыврямляющего K^+ -канала *GORK*. Анализ ионных токов через ПМ протопластов, выделенных из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. данной линии, в контрольных условиях продемонстрировал наличие только быстро активирующейся компоненты тока (отсутствие времязависимости наружувыврямляющих токов) (см. рис. 5). Редукция медленной части тока свидетельствует об отсутствии активности канала *GORK*. Мгновенная компонента тока, вероятно, была обусловлена активацией неселективных катионных каналов, ответственных за наружувыврямляющий поток K^+ . Введение в наружный раствор смеси, генерирующей гидроксильные радикалы, не приводило к модификации ионных токов через ПМ клеток корня арабидопсиса ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$). В контрольных условиях максимальная плотность ионного тока при деполяризации ПМ у растений *A. thaliana* (L.) Heynh., нокаутных по гену *GORK*, составила $(234,1 \pm 83,2) \text{ мА/м}^2$ ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$), воздействие $\text{HO}^\bullet$ приводило к снижению плотности тока до $(197,5 \pm 78,0) \text{ мА/м}^2$ ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$).

Полученные данные указывают на активацию каналов *GORK* под действием $\text{HO}^\bullet$. АФК-активируемые ионные каналы ранее были описаны в клетках корня *A. thaliana* (L.) Heynh. [44; 45], *Pisum sativum* L. [46], пыльцевой трубке *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai [47] и *Lilium longiflorum* Thunb. [48]. В настоящем исследовании, как и в более ранних работах других авторов, показано, что при воздействии АФК активируются две группы ионных токов – внутрьнаправленные Ca^{2+} -токи и наружувыврямляющие K^+ -токи [44]. Внутрьнаправленная проводимость характеризовалась низкой селективностью и потенциалнезависимостью. Наружувыврямляющая проводимость обладала высокой селективностью к K^+ , кинетика активации напоминала активацию Shakers-подобных K^+ -каналов [38]. Позднее было установлено, что для образования АФК и активации ионных каналов ПМ в апопластическом пространстве клеток корня в цикле Хабера – Вейса необходимы переходные металлы (Cu^{2+} или др.), L-аскорбиновая кислота и H_2O_2 [29].

Анализ анионных токов. В настоящем исследовании были зарегистрированы и проанализированы наружувыврямляющие токи L-малата из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (Col-0) и линии *almt1*, лишенной канала *ALMT1*. У растений дикого типа зарегистрированы быстро активирующиеся токи, характеризующиеся слабой зависимостью от потенциала на мембране и чувствительные к блокатору анионных каналов – 9-антраценкарбоновой кислоте (рис. 6). Максимальный ток через ПМ при гиперполяризации у растений дикого типа составил $-159,1 \text{ мА/м}^2$ ($n = 13$; $X \pm \text{SE}$). При этом малатный ток у линии *almt1* при подаче на мембрану напряжения -180 мВ составил $-28,6 \text{ мА/м}^2$ ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$).

Таким образом, в настоящей работе показано, что нокаутирование канала *ALMT1* приводит к снижению оттока малата из клеток корня высших растений. Ранее было продемонстрировано, что каналы *ALMT* обеспечивают выходящие потоки фумарата, цитрата, Cl^- , NO_3^- и других анионов из клеток растений [35; 36]. Вероятно, отток K^+ из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. через наружувыврямляющие K^+ -каналы *GORK* происходит совместно с утечкой органических кислот (малат и др.) через каналы *ALMT1*.

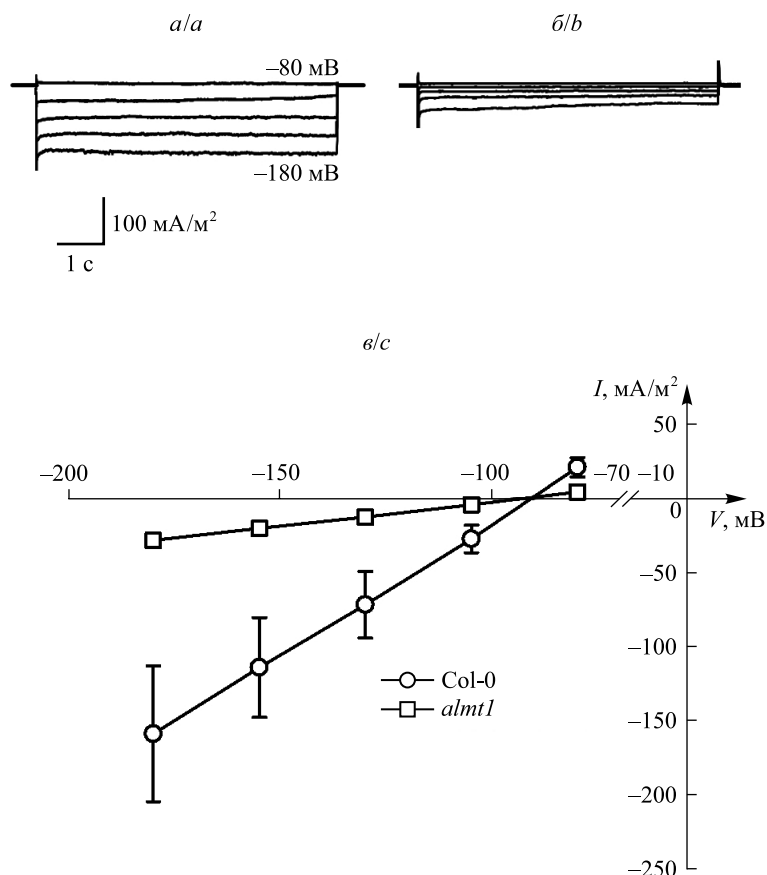


Рис. 6. Токи малата через ПМ клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (Col-0) и линии *almt1*. Типичные токовые кривые, полученные в ответ на прямоугольные импульсы напряжения в диапазоне от -180 до -80 мВ (*a* – Col-0; *b* – *almt1*), и ВАХ, построенные по средним значениям токов ($n = 5-13$; $\bar{X} \pm SE$) (*в*). Наружный раствор – 20 ммоль/л $CaCl_2$, $0,1$ ммоль/л $NaCl$ (рН $6,0$ (2 ммоль/л MES, 1 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг). Пипеточный раствор – 40 ммоль/л NaOH, 40 ммоль/л L-малата, 100 нмоль/л Ca^{2+} ($0,75$ ммоль/л 1,2-бис(*o*-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, $0,3$ ммоль/л $CaCl_2$) (рН $7,2$ (10 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг)

Fig. 6. Malate currents across the plasma membrane of *A. thaliana* (L.) Heynh. root cells in protoplasts isolated from wild-type (Col-0) and *almt1* line. Typical current curves obtained using a series of square voltage pulses (from -180 to -80 mV) as a voltage-clamp protocol (*a* – Col-0; *b* – *almt1*) and current-voltage curves obtained from the average values of currents ($n = 5-13$; $\bar{X} \pm SE$) (*c*). The standard bathing solution contained 20 mmol/L $CaCl_2$, 0.1 mmol/L $NaCl$ (pH 6.0 (2 mmol/L MES, 1 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg). The pipette solution contained 40 mmol/L NaOH, 40 mmol/L L-malate, 100 nmol/L Ca^{2+} (0.75 mmol/L 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 0.3 mmol/L $CaCl_2$) (pH 7.2 (10 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg)

Заключение

В настоящем исследовании с использованием метода меченых атомов продемонстрировано, что обработка $NaCl$, $HO^\bullet$ и H_2O_2 стимулирует выход K^+ ($^{86}Rb^+$) из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. Показано, что K^+ -канал GORK опосредует индуцированный $NaCl$, $HO^\bullet$ и H_2O_2 выход K^+ из клеток корня, так как растения, нокаутные по данной транспортной системе, демонстрируют более медленную кинетику выхода $^{86}Rb^+$. С помощью техники пэтч-клэмп получено подтверждение того, что K^+ -каналы GORK играют доминирующую роль в наружунаправленном токе K^+ из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. при окислительном стрессе. Установлено, что нокаутирование этого канала приводит к снижению выхода K^+ под действием АФК. Также в работе впервые получено экспериментальное (на основе электрофизиологических данных) доказательство того, что ионные каналы ALMT1 катализируют отток органических анионов (на примере малата) из клеток корня.

Библиографические ссылки/References

1. Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*. 2014; 65(5):1259–1270. DOI: 10.1093/jxb/eru004.
2. Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin TA, Smith SJ, Miller AJ, et al. Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant Physiology*. 2006;141(4):1653–1665. DOI: 10.1104/pp.106.082388.
3. Verma H, Devi K, Baruah AR, Sarma RN. Relationship of root aquaporin genes, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;4*, *OsPIP2;5*, *OsTIP2;1* and *OsNIP2;1* expression with drought tolerance in rice. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2020;80(1):50–57. DOI: 10.31742/IJGPB.80.1.6.
4. Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian LV, Taiz L. Early copper-induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiology*. 1999;121(4):1375–1382. DOI: 10.1104/pp.121.4.1375.
5. Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors. In: Canning BJ, Spina D, editors. *Sensory nerves*. Dordrecht: Springer; 2009. p. 283–332 (Handbook of experimental pharmacology; volume 194). DOI: 10.1007/978-3-540-79090-7_9.
6. Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarría-Machado I, Martínez-Estévez M. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:01767. DOI: 10.3389/fpls.2017.01767.
7. Demidchik V, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):28–46. DOI: 10.1071/FP16380.
8. Cui Yongmei, Lu Shan, Li Zhan, Cheng Jiawen, Hu Peng, Zhu Tianquan, et al. Cyclic nucleotide-gated ion channels 14 and 16 promote tolerance to heat and chilling in rice. *Plant Physiology*. 2020;183(4):1794–1808. DOI: 10.1104/pp.20.00591.
9. Blatt MR, Grabov A, Brearley J, Hammond-Kosack K, Jones JDG. K⁺ channels of *Cf-9* transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *The Plant Journal*. 1999;19(4):453–462. DOI: 10.1046/j.1365-3113.1999.00534.x.
10. Demidchik V, Tester M. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*. 2002;128(2):379–387. DOI: 10.1104/pp.010524.
11. Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, et al. Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology*. 2007;145(4):1714–1725. DOI: 10.1104/pp.107.110262.
12. Hanin M, Ebel C, Ngom M, Laplace L, Masmoudi K. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:01787. DOI: 10.3389/fpls.2016.01787.
13. Atkinson MM, Midland SL, Sims JJ, Keen NT. Syringolide 1 triggers Ca²⁺ influx, K⁺ efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease-resistance gene *Rpg4*. *Plant Physiology*. 1996;112(1):297–302. DOI: 10.1104/pp.112.1.297.
14. Finlayson JE, Pritchard MK, Rimmer SR. Electrolyte leakage and storage decay of five carrot cultivars in response to infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1989;11(3):313–316. DOI: 10.1080/07060668909501119.
15. Kang H-M, Saltveit ME. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum*. 2002;115(4):571–576. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150411.x.
16. Biswas SK, Pandey NK, Rajik M. Inductions of defense response in tomato against *Fusarium wilt* through inorganic chemicals as inducers. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2012;3(4):128–135. DOI: 10.4172/2157-7471.1000128.
17. McKersie BD, Stinson RH. Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. *Plant Physiology*. 1980;66(2):316–320. DOI: 10.1104/pp.66.2.316.
18. Becwar MR, Stanwood PC, Roos EE. Dehydration effects on imbibitional leakage from desiccation-sensitive seeds. *Plant Physiology*. 1982;69(5):1132–1135. DOI: 10.1104/pp.69.5.1132.
19. Bajji M, Kinet J-M, Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*. 2002;36(1):61–70. DOI: 10.1023/A:1014732714549.
20. Kashtoh H, Baek K-H. Structural and functional insights into the role of guard cell ion channels in abiotic stress-induced stomatal closure. *Plants*. 2021;10(12):2774. DOI: 10.3390/plants10122774.
21. Colcombet J, Mathieu Y, Peyronnet R, Agier N, Lelièvre F, Barbier-Brygoo H, et al. R-type anion channel activation is an essential step for ROS-dependent innate immune response in *Arabidopsis* suspension cells. *Functional Plant Biology*. 2009;36(9):832–843. DOI: 10.1071/FP09096.
22. Guo Wei, Wang Chengcheng, Zuo Zhangli, Qiu Jin-Long. The roles of anion channels in *Arabidopsis* immunity. *Plant Signaling & Behavior*. 2014;9(7):e29230. DOI: 10.4161/psb.29230.
23. Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, et al. *Arabidopsis* root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
24. Demidchik V, Davenport RJ, Tester M. Nonselective cation channels in plants. *Annual Reviews of Plant Biology*. 2002;53:67–107. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540.
25. Hedrich R. Ion channels in plants. *Physiological Reviews*. 2012;92(4):1777–1811. DOI: 10.1152/physrev.00038.2011.
26. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175(3):387–404. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
27. Dreyer I, Uozumi N. Potassium channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278(22):4293–4303. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08371.x.
28. Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*. 2018;220(1):49–69. DOI: 10.1111/nph.15266.
29. Demidchik V. ROS-activated ion channels in plants: biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4):1263. DOI: 10.3390/ijms19041263.
30. Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, et al. Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*. 1998;94(5):647–655. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81606-2.
31. Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse J-M, Gambale F, Thomine S, et al. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*. 2011;62:25–51. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042110-103741.

32. Nedelyaeva OI, Shuvalov AV, Balnokin YuV. Chloride channels and transporters of the CLC family in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2020;67(5):767–784. DOI: 10.1134/S1021443720050106.
33. Linder B, Raschke K. A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Letters*. 1992;313(1):27–30. DOI: 10.1016/0014-5793(92)81176-m.
34. Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, et al. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signaling. *Nature*. 2008;452(7186):487–491. DOI: 10.1038/nature06608.
35. Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, et al. The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *The Plant Journal*. 2007;52(6):1169–1180. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03367.x.
36. Meyer S, Scholz-Starke J, De Angeli A, Kovermann P, Burla B, Gambale F, et al. Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *The Plant Journal*. 2011;67(2):247–257. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04587.x.
37. Sim CC, Zaharah AR. Potassium uptake kinetics by oil palm root via radiotracer techniques. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2014;13(4–8):195–197. DOI: 10.3923/ajps.2014.195.197.
38. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG, editor. *Plant electrophysiology: signaling and responses*. Heidelberg: Springer; 2012. p. 339–369. DOI: 10.1007/978-3-642-29110-4_14.
39. Läuchli A, Epstein E. Transport of potassium and rubidium in plant roots: the significance of calcium. *Plant Physiology*. 1970;45(5):639–641. DOI: 10.1104/pp.45.5.639.
40. Demidchik V. Mechanisms and physiological roles of K^{+} efflux from root cells. *Journal of Plant Physiology*. 2014;171(9):696–707. DOI: 10.1016/j.jplph.2014.01.015.
41. Murphy A, Taiz L. Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 *Arabidopsis* ecotypes. *New Phytologist*. 1997;136(2):211–222. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00738.x.
42. Lebaudy A, Véry A-A, Sentenac H. K^{+} channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Letters*. 2007;581(12):2357–2366. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.058.
43. Zsoldos F. Uptake and efflux of ions in fungicide-treated rice plants. *Plant and Soil*. 1974;41(1):41–49.
44. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116(1):81–88. DOI: 10.1242/jcs.00201.
45. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422(6930):442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
46. Zepeda-Jazo I, Velarde-Buendía AM, Enríquez-Figueroa R, Bose J, Shabala S, Muñiz-Murguía J, et al. Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca^{2+} and K^{+} transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiology*. 2011;157(4):2167–2180. DOI: 10.1104/pp.111.179671.
47. Wu H, Shabala L, Zhou M, Shabala S. Chloroplast-generated ROS dominate NaCl induced K^{+} efflux in wheat leaf mesophyll. *Plant Signaling & Behavior*. 2015;10(5):e1013793. DOI: 10.1080/15592324.2015.1013793.
48. Breygina MA, Abramochkin DV, Maksimov NM, Yermakov IP. Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts. *Plant Biology*. 2016;18(5):761–767. DOI: 10.1111/plb.12470.

Получена 21.06.2022 / исправлена 24.06.2022 / принята 24.06.2022.
Received 21.06.2022 / revised 24.06.2022 / accepted 24.06.2022.

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ОБРАБОТАННЫХ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ: МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К ЗАСУХЕ

Т. Г. КУРЬЯНЧИК¹⁾, Н. В. КОЗЕЛ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Установлено существенное влияние почвенной засухи на морфометрические показатели листьев растений ячменя сортов Бровар и Аванс, концентрацию в них фотосинтетических пигментов, а также накопление активных форм кислорода. Показано, что при засухе обработка листьев растений ячменя сорта Бровар 5-аминолевулиновой кислотой вызывает снижение содержания белков антенных комплексов фотосистем, что приводит к уменьшению размера светособирающей антенны и является эффективным механизмом защиты фотосинтетического аппарата от окислительного стресса. Тонкая подстройка компонентов фотосинтетического аппарата листьев растений ячменя сорта Бровар к действию засухи может быть ключевым фактором, определяющим устойчивость этого сорта к данному виду абиотического стресса. У сорта Аванс указанные адаптационные механизмы либо отсутствуют, либо проявляются в меньшей степени, что приводит к более интенсивному развитию окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи.

Ключевые слова: почвенная засуха; 5-аминолевулиновая кислота; окислительный стресс; активные формы кислорода; фотосинтетический аппарат; ячмень.

PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF BARLEY PLANTS TREATED WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID: MECHANISMS OF ADAPTATION TO DROUGHT

T. G. KURYANCHYK^a, N. V. KOZEL^a

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

Corresponding author: T. G. Kuryanchyk (t.kuryanchyk@gmail.com)

A significant effect of soil drought on the morphometric parameters of the leaves of barley plants of the Brovar and Avans varieties, the accumulation of reactive oxygen species, as well as the content of photosynthetic pigments in them has been established. It has been shown that during drought, the treatment of leaves of barley plants of the Brovar variety

Образец цитирования:

Курьянчик ТГ, Козел НВ. Фотосинтетический аппарат растений ячменя, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой: механизмы адаптации к засухе. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:26–38.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-26-38>

For citation:

Kuryanchyk TG, Kozel NV. Photosynthetic apparatus of barley plants treated with 5-aminolevulinic acid: mechanisms of adaptation to drought. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:26–38. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-26-38>

Авторы:

Татьяна Геннадьевна Курьянчик – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Authors:

Tatsiana G. Kuryanchyk, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.

t.kuryanchyk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7727-3451>

Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.

kozel.mikalai@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

with 5-aminolevulinic acid causes a decrease in the content of proteins of photosystem antenna complexes, which leads to a decrease in the size of the light-harvesting antenna and is an effective mechanism for protecting the photosynthetic apparatus from oxidative stress. Fine adjustment of the photosynthetic apparatus components of leaves of barley plants of the Brovar variety to drought may be a key factor in determining the resistance of this variety to this type of abiotic stress. In the Avans variety, these adaptation mechanisms are either absent or manifest to a lesser extent, which leads to a more intensive development of oxidative stress in plants of this variety under the action of soil drought.

Keywords: soil drought; 5-aminolevulinic acid; oxidative stress; reactive oxygen species; photosynthetic apparatus; barley.

Введение

Ячмень – одна из основных зерновых культур, которая занимает ведущее место в сельскохозяйственном производстве Беларуси. Различные абиотические факторы окружающей среды, такие как засуха, засоление, высокая или низкая температура и др., влияют на все стадии роста и развития растений ячменя и могут приводить к изменению критически важных физиологических и биохимических процессов в растительном организме. Фотосинтез также подвергается сильному воздействию стрессовых факторов, в результате чего может изменяться ультраструктура органелл и концентрация фотосинтетических пигментов, метаболитов и ферментов, участвующих в этом процессе [1]. Вызванный засухой стресс и последующее ухудшение водного статуса клеток замедляют рост и развитие растений, нарушают минеральное питание и газообмен листьев, снижают содержание фотосинтетических пигментов, а также отрицательно влияют на скорость фотосинтеза, ограничивая диффузию CO_2 через устьица, и потенциально вызывают образование высокореактивных и цитотоксичных молекул – активных форм кислорода (АФК), которые способны повредить фотосинтетический аппарат (ФСА) растительной клетки, что в конечном итоге приводит к значительным потерям урожая [2–4]. Так, снижение содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов (Хл) и каротиноидов (Кар)) может происходить из-за вызванных стрессом нарушений в биосинтезе пигментов или их разрушения. Однако степень повреждения растительной клетки в результате действия абиотических стрессовых факторов зависит от вида и сорта растения, продолжительности воздействия и переносимости стресса [1].

В случае засухи ключевую роль играют адаптационные механизмы, в частности механизмы адаптации ФСА, позволяющие растению преодолеть стрессовое воздействие [5]. Важным аспектом повышения эффективности сельскохозяйственного производства при стремительном изменении климата, в том числе в условиях частых засух, выступает создание эффективных экологически чистых регуляторов роста растений и антистрессоров, что дает возможность снизить негативные последствия от действия биотических и абиотических стрессовых факторов. В связи с этим крайне актуальными являются исследования, направленные на разработку новых подходов к повышению устойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур в неблагоприятных условиях культивирования [3–8].

Экзогенное применение различных небольших молекул или регуляторов роста растений – хорошо известный метод повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды [9]. В последние годы большой интерес и популярность в сельском хозяйстве, и в частности в растениеводстве, приобретает использование 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) – важнейшего метаболита растительной клетки, предшественника тетрапирролов, который в низких концентрациях положительно влияет на рост и развитие растений в стрессовых условиях [10]. Так, в работах [11; 12] сотрудников лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси впервые были выявлены росторегулирующие, а затем и антистрессовые свойства АЛК – первичного предшественника Хл и гема. Установлено, что при засолении экзогенная АЛК стимулирует накопление в клетках листьев растений ячменя пролина, выполняющего защитную функцию, а также приводит к активации ключевого антиоксидантного фермента – аскорбатпероксидазы [12]. Кроме того, показаны стимуляция экзогенной АЛК экспрессии гена *Nar1* нитратредуктазы, повышение ее содержания и активности в листьях растений ячменя, выращиваемых в условиях солевого стресса, что способствовало формированию у них солеустойчивости [13; 14]. Выявлен механизм контроля распределения ассимилированного азота между системами синтеза АЛК, пролина и белка при субстратной активации нитратредуктазы, а также солевым стрессом и подавлении активности фермента, основанный на участии дельта-1-пирролин-5-карбоксилатсинтазы в этом процессе. Установлено, что адаптация растений ячменя к солевому стрессу, подавляющему экспрессию гена *Nar1*, осуществляется за счет усиления синтеза АЛК, Хл, Кар и гема, а также стимуляции дельта-1-пирролин-5-карбоксилатсинтазы и образования пролина. Стоит отметить, что ответные реакции растений на засуху и засоление часто сходны, так как и в случае засухи, и в случае засоления почв растительный организм получает недостаточное для нормального роста и развития количество воды.

Таким образом, представлялось актуальным изучить воздействие АЛК на физиологическое состояние растений ячменя при дефиците влаги в почве. Целью данной работы являлись исследование состояния ФСА растений ячменя при засухе и изучение влияния на ФСА в таких условиях АЛК как универсального стрессопротектора.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования в данной работе использовали проростки растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) засухоустойчивого сорта Бровар [15] и сорта Аванс, выращенные в строго контролируемых лабораторных условиях в режиме 14 ч света (интенсивность 6000 лк) и 10 ч темноты под люминесцентными лампами Philips TL-D 36W/765 при температуре (23 ± 1) °C и относительной влажности воздуха (35 ± 2) % как при нормальном водоснабжении (ежедневный полив водопроводной водой), так и при засухе (отсутствие полива с момента посадки).

Выращивание растений и определение морфометрических показателей. Исследование влияния засухи на зеленые проростки ячменя проводили в культуре, выращенной в почве. Для этого семена растений ячменя предварительно проращивали на асептически обработанных пластиковых сетках при температуре (23 ± 1) °C в течение 1 сут. Затем отобранные по размеру корней проростки высаживали в сосуды, заполненные 300 г почвогрунта «Восторг» (Карио, Беларусь) с массовой долей воды 50 %. Обработку листьев растений ячменя АЛК производили мелкодисперсным опрыскиванием на 4-е сутки после высадки в грунт пророщенных семян. Концентрация АЛК составляла 10 мг/л. Варианты экспериментов были следующими:

1) контроль – ежедневный полив водопроводной водой (из расчета 25 мл воды на 300 г влажного грунта) без обработки АЛК;

2) АЛК + H₂O – ежедневный полив водопроводной водой с обработкой АЛК;

3) засуха – отсутствие полива и обработки АЛК;

4) АЛК + засуха – обработка АЛК без полива.

Длину зеленых проростков измеряли от зерновки через 7 сут после высадки в почву.

Определение сухой массы листьев растений ячменя, или массовой доли воды. Определение сухой массы листьев, или массовой доли воды, проводили согласно методу, описанному в работе Е. В. Вязова¹. Навески листьев растений ячменя массой 1 г помещали в стеклянные бюксы, масса которых предварительно была измерена на аналитических весах CE224-C (Сартогосм, Россия). Затем бюксы с навесками листьев ставили в вакуумный сушильный шкаф VacuCell 111 Standard (МММ Medcenter Einrichtungen, Германия) и высушивали образцы при температуре 100 °C и давлении 0,05 атм в течение 2 ч. Через 1; 1,5 и 2 ч после начала сушки бюксы с навесками листьев взвешивали, чтобы зафиксировать сухую массу, которая не менялась в последних двух измерениях. Это свидетельствовало о полной потере образцами воды. Массовую долю воды рассчитывали по разнице между начальной и конечной массой бюкса с образцами.

Определение общего содержания АФК. Определение общего содержания АФК *in vitro* проводили с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата (ДХФ-ДА), который после деацетилирования окисляется АФК (H₂O₂, •ОН, ROO• и др.) до флуоресцентного соединения ДХФ [16].

Для получения экстракта навески листьев растений ячменя массой 0,2 г помещали в фарфоровую ступку, приливали 1,6 мл 0,2 н. HClO₄ и растирали до получения гомогената, который затем центрифугировали в течение 10 мин при температуре 4 °C и ускорении 17 000g с использованием центрифуги с охлаждением Sigma 1-15K (Sigma Laborzentrifugen, Германия). Нейтрализацию кислотного значения pH (до 7,5–7,6) осуществляли с помощью 4 моль/л КОН. Затем все пробы инкубировали в термостате в течение 20 мин при температуре 37 °C.

Определение АФК проводили, регистрируя флуоресценцию ДХФ ($\lambda_{\text{воз}} = 496$ нм, $\lambda_{\text{набл}} = 524$ нм). Среда измерения содержала 0,15 моль/л буфер Tris-HCl (pH 7,5), нейтрализованный супернатант и 0,5 ммоль/л раствор ДХФ-ДА. Контролем служила проба, состоящая из 0,15 моль/л буфера Tris-HCl (pH 7,5) и 0,5 ммоль/л раствора ДХФ-ДА [17]. Флуориметрический анализ проводили с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (Solar, Беларусь). По количеству образовавшегося в ходе реакции ДХФ судили о накоплении АФК. Концентрацию ДХФ рассчитывали в относительных единицах, контрольный вариант принимали за единицу.

Определение содержания H₂O₂ в листьях растений ячменя. Определение содержания пероксида водорода в экстрактах листьев растений ячменя проводили с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии H₂O₂, катализируемая пероксидазой хрена [18].

¹Вязов Е. В. Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата и защитной системы растений огурца к светодиодному излучению различного спектрального состава : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02. Минск, 2017. 21 с.

Навески листьев растений ячменя массой 0,2 г помещали в фарфоровую ступку и, приливая 1,6 мл 0,2 н. HClO_4 , растирали до гомогената, который затем центрифугировали в течение 10 мин при ускорении 17 000g с использованием центрифуги Sigma 1-15K. Для нейтрализации кислотного значения pH супернатанта добавляли 4 моль/л КОН и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000g.

Определение H_2O_2 осуществляли, регистрируя убыль флуоресценции скополетина ($\lambda_{\text{воз}} = 370$ нм, $\lambda_{\text{набл}} = 464$ нм), на спектрофлуориметре CM 2203. Среда измерения содержания H_2O_2 состояла из 0,1 моль/л буфера Tris-HCl (pH 7,0), раствора пероксидазы хрена (200 ед. на 1 мл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Реакцию запускали добавлением нейтрализованного супернатанта. Первым контролем служила проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера Tris-HCl и супернатанта, вторым контролем – проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера Tris-HCl, раствора пероксидазы хрена (5 ед. на 10 мкл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Концентрацию пероксида водорода рассчитывали в относительных единицах, контрольный вариант принимали за единицу [19].

Определение содержания Хл, феофитина (Фео) и Кар. Состав и содержание Хл *a*, Хл *b*, Фео *a*, Фео *b* и Кар в листьях растений ячменя определяли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) (Macherey-Nagel, Германия) по методике, разработанной в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно исследованиям [20; 21].

Экстракцию пигментов из растений осуществляли с помощью 100 % ацетона. Разделение пигментов на колонке проводили с использованием раствора *A* (90,0 % ацетонитрила, 9,9 % H_2O , 0,1 % триэтиламина) и раствора *B* (100 % этилацетат) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu) в диапазоне 200–800 нм. Визуализацию профиля хроматограммы осуществляли по спектрам поглощения при 440 нм (для Хл *a*, Хл *b* и Кар) и 410 нм (для Фео *a* и Фео *b*). Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы и коэффициенты, полученные для каждого пигмента с помощью стандартов. Расчет содержания пигментов производили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = \frac{S_{440} F_{\text{пигм}} V}{V_{\text{аликв}} m},$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг/г сухой массы; S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм (для Фео – 410 нм); $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета; V – объем супернатанта, мкл; $V_{\text{аликв}}$ – аликвота, мкл; m – масса навески, г.

В работе были использованы следующие реагенты: ацетон марки «х. ч.» ($\geq 99,8$ %) (Экос-1, Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9$ %) и этилацетат для ВЭЖХ ($\geq 99,7$ %) (Honeywell, Германия), триэтиламин ($\geq 99,5$ %) (AppliChem, Германия), стандарты фотосинтетических пигментов (Sigma-Aldrich, Германия).

Определение содержания белковых компонентов пигмент-белковых комплексов фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) с помощью вестерн-блоттинга. Выделение из растений белков и их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле, а также вестерн-блоттинг выполняли, как описано в работе [22]. Навеску листьев растений ячменя массой 0,1 г растирали в жидком азоте до порошка, переносили в пробирку типа «эппендорф», приливали среду выделения, содержащую 56 ммоль/л дитиотреитола, 56 ммоль/л Na_2CO_3 , 12 % сахарозы, 2 ммоль/л этилендиаминтетраацетата, 2 % додецилсульфата натрия, и тщательно перемешивали, используя миксер Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, США). После этого пробы инкубировали в течение 10 мин при температуре 80 °C на термоблокере TS-100 (Biosan, Латвия), затем снова перемешивали и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000g на центрифуге Biofuge PICO (Thermo Fisher Scientific, США). В полученном экстракте определяли содержание белка по методу Бредфорда [23] и при необходимости разбавляли пробы буфером для экстракции в целях выравнивания в них содержания белка.

Разделение белков осуществляли с помощью денатурирующего гель-электрофореза на установке для вертикального гель-электрофореза Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, США), используя коммерческие препараты разделяющего и концентрирующего гелей. После разделения белков осуществляли их электроперенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) с порами размером 0,45 мкм. Гель помещали на мембрану и укладывали на поверхность системы турбоблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) между слоями хроматографической бумаги, предварительно смочив их в анодном буфере.

Иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, проводили с помощью поликлональных антител (Agrisera, Швеция) на белок D1 реакционного центра ФС II, а также на белки светособирающих комплексов ФС I (Lhca2) и ФС II (Lhcb2, Lhcb4). Количество белков

рассчитывали денситометрически в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу *TotalLab 2.01 (Nonlinear Dynamics Ltd.)*.

Статистическая обработка полученных результатов. Для статистической обработки экспериментальных данных и регистрации полученных результатов использовали программы *Excel 2019 (Microsoft)* и *SigmaPlot 12.5 (Systat Software)*, а также статистические методы, принятые в области биологических исследований [24, с. 28–50]. Основными статистическими характеристиками служили средняя арифметическая величина ($\bar{x}$), среднее квадратическое отклонение (s), ошибка средней величины ($S_{\bar{x}}$). На графиках и в таблицах приведены средние значения и ошибка средней величины ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$). Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и данного числа степеней свободы (df). Все описанные в работе эксперименты проводили в 5–14-кратной биологической повторности на 7-е сутки после высадки в почву пророщенных семян.

Результаты и их обсуждение

Влияние почвенной засухи на морфометрические показатели проростков ячменя. В ходе проведенных опытов было проанализировано влияние почвенной засухи на всхожесть семян, морфометрические показатели растений и содержание в проростках ячменя воды при действии АЛК в концентрации 10 мг/л. Концентрация была выбрана в соответствии с данными работы [10], где опрыскивание проростков ячменя раствором АЛК в такой концентрации приводило к наиболее значительной стимуляции роста растений. Образцы, выращенные в почве с поливом, в опытах выступали в качестве контроля. В экспериментах использовались два сорта ячменя – засухоустойчивый сорт Бровар [15], а также сорт Аванс, который сейчас активно возделывается в Беларуси, однако согласно проведенным нами предварительным исследованиям более подвержен негативному воздействию почвенной засухи, чем сорт Бровар.

Так, в ходе исследования была выявлена более высокая (на 10,3 %) всхожесть семян засухоустойчивого сорта Бровар по сравнению с таковой сорта Аванс в условиях дефицита влаги в почве (табл. 1).

Таблица 1

Всхожесть семян растений ячменя сортов Бровар и Аванс

Table 1

Germination of seeds of barley plants of the Brovar and Avans varieties

Вариант эксперимента	Сорт Бровар			Сорт Аванс		
	Общее количество семян	Количество проростков	Всхожесть, %	Общее количество семян	Количество проростков	Всхожесть, %
Контроль	222	216	97,0 ± 2,4	442	423	95,6 ± 0,4
Засуха	258	228	88,7 ± 4,2	520	419	78,4 ± 3,8*

* Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Изучение морфометрических показателей первого листа ячменя, определяемых по длине проростков от зерновки, показало, что дефицит воды приводит к уменьшению длины проростков на 23,4 и 20,4 % у необработанных и обработанных АЛК растений сорта Бровар соответственно и на 33,4 и 17,4 % у необработанных и обработанных АЛК растений сорта Аванс соответственно по сравнению с длиной проростков у контрольных растений (табл. 2). Обработка растений АЛК при ежедневном поливе увеличивает длину проростков в среднем на 6,9 % для сортов Бровар и Аванс по сравнению с длиной проростков у необработанных растений.

Анализ массовой доли воды в проростках ячменя показал незначительное, но достоверное снижение этого показателя в условиях засухи – в среднем на 2,6 % для сорта Бровар и на 1,9 % для сорта Аванс по сравнению с массовой долей воды в образцах, выращенных при нормальном водоснабжении (см. табл. 2).

Отметим также, что обработка растений ячменя сорта Бровар АЛК приводила к видимому увеличению длины корней, чего не наблюдалось для сорта Аванс (рис. 1). Таким образом, можно предположить, что как в условиях засухи, так и при нормальном поливе обработка растений ячменя АЛК проявляется в определенном ростостимулирующем эффекте, который более выражен для засухоустойчивого сорта Бровар.

Таблица 2

Изменение длины проростков растений ячменя,
а также массовой доли воды в них под влиянием почвенной засухи

Table 2

Change in the length of seedlings of barley plants,
as well as the mass fraction of water in them under the influence of soil drought

Вариант эксперимента	Сорт Бровар		Сорт Аванс	
	Длина проростков от зерновки, см	Массовая доля воды, %	Длина проростков от зерновки, см	Массовая доля воды, %
Контроль	16,0 ± 0,2	92,4 ± 0,1	14,4 ± 0,1	91,6 ± 0,2
АЛК + H ₂ O	17,2 ± 0,2*	92,3 ± 0,1	15,5 ± 0,3	92,3 ± 0,1
Засуха	12,3 ± 0,2*	89,7 ± 0,4*	9,6 ± 0,1*	88,9 ± 0,2*
АЛК + засуха	12,8 ± 0,3*	89,8 ± 0,5*	11,9 ± 0,2*	91,1 ± 0,5*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

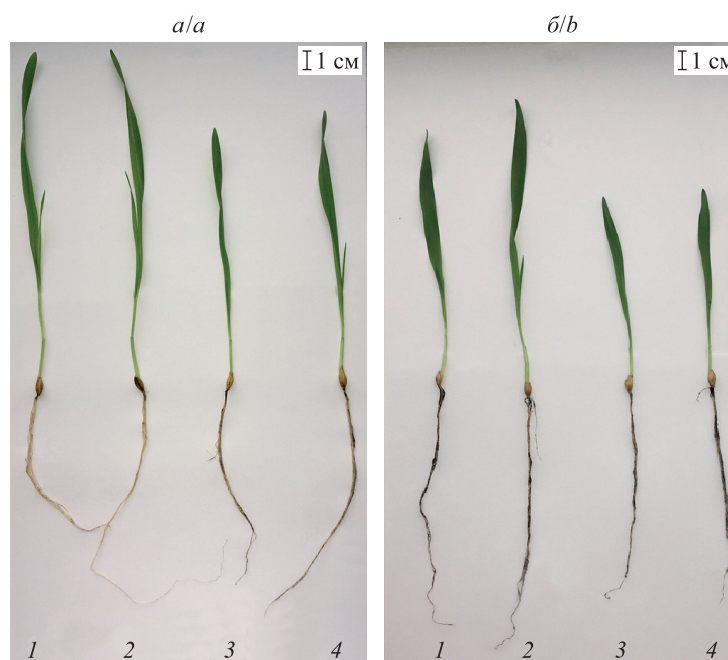


Рис. 1. Внешний вид растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б).
Варианты эксперимента: 1 – контроль; 2 – АЛК + H₂O; 3 – засуха; 4 – АЛК + засуха

Fig. 1. Appearance of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties.
Experiment options: 1 – control; 2 – ALA + H₂O; 3 – drought; 4 – ALA + drought
(ALA – 5-aminolevulinic acid)

Влияние почвенной засухи на накопление АФК в листьях растений ячменя. Для оценки степени стрессового воздействия на растения ячменя почвенной засухи было проанализировано накопление в листьях опытных и контрольных вариантов АФК в целом и H₂O₂ в частности. Результаты, представленные на рис. 2, четко демонстрируют индукцию окислительного стресса под действием почвенной засухи: во всех опытных вариантах наблюдалось существенное (до 100 %) увеличение содержания АФК в листьях.

Однако следует обратить внимание на три факта. Во-первых, обработка растений АЛК приводила к увеличению количества АФК как в опытных (АЛК + засуха), так и в контрольных (АЛК + H₂O) вариантах обоих сортов по сравнению с уровнем АФК в необработанных растениях (см. рис. 2), что может быть причиной активации под действием малых концентраций АЛК метаболических процессов, прежде всего фотосинтеза и дыхания [25–27]. Во-вторых, в условиях засухи содержание АФК в листьях растений ячменя сорта Аванс превышало уровень АФК в листьях растений ячменя сорта Бровар, что

указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях сорта Аванс при засухе. В-третьих, не происходило накопления повышенных количеств H_2O_2 на фоне увеличения содержания общего пула АФК при действии почвенной засухи (рис. 3), что свидетельствует об инициации окислительного стресса по пути образования синглетного кислорода, а не супероксидного радикала, являющегося предшественником H_2O_2 . В связи с этим можно предположить, что хлоропласты играют ключевую роль в развитии окислительных процессов в растениях ячменя при засухе.

Дальнейшие исследования были направлены на выявление особенностей ответа хлоропластных компонентов при действии почвенной засухи на растения ячменя в присутствии АЛК и без нее.

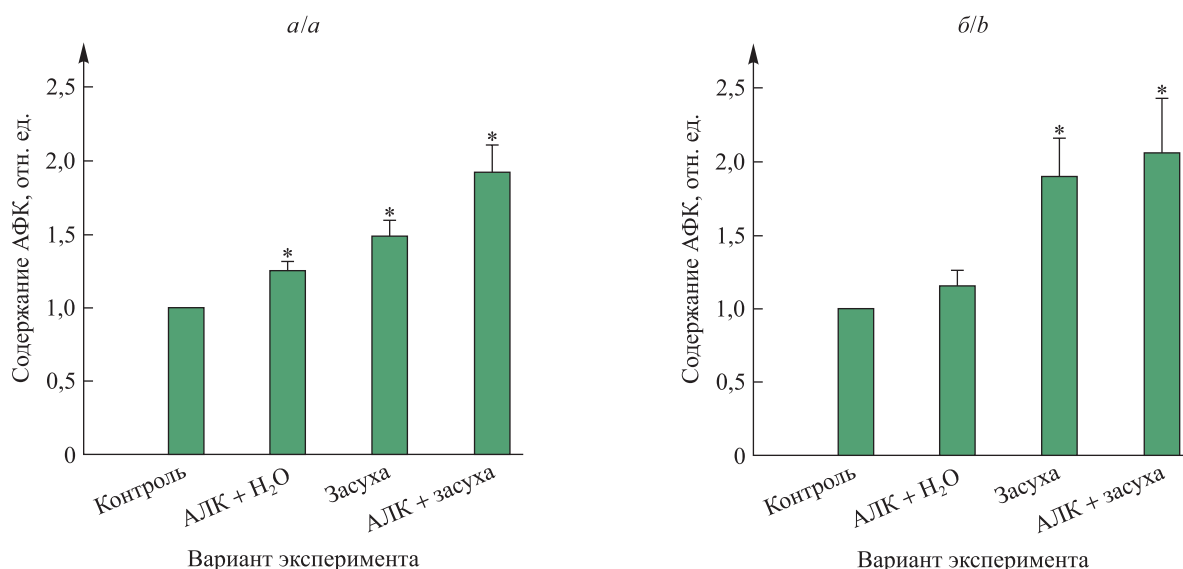


Рис. 2. Изменение содержания АФК в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 2. Changes in the content of reactive oxygen species in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under the influence of soil drought (asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

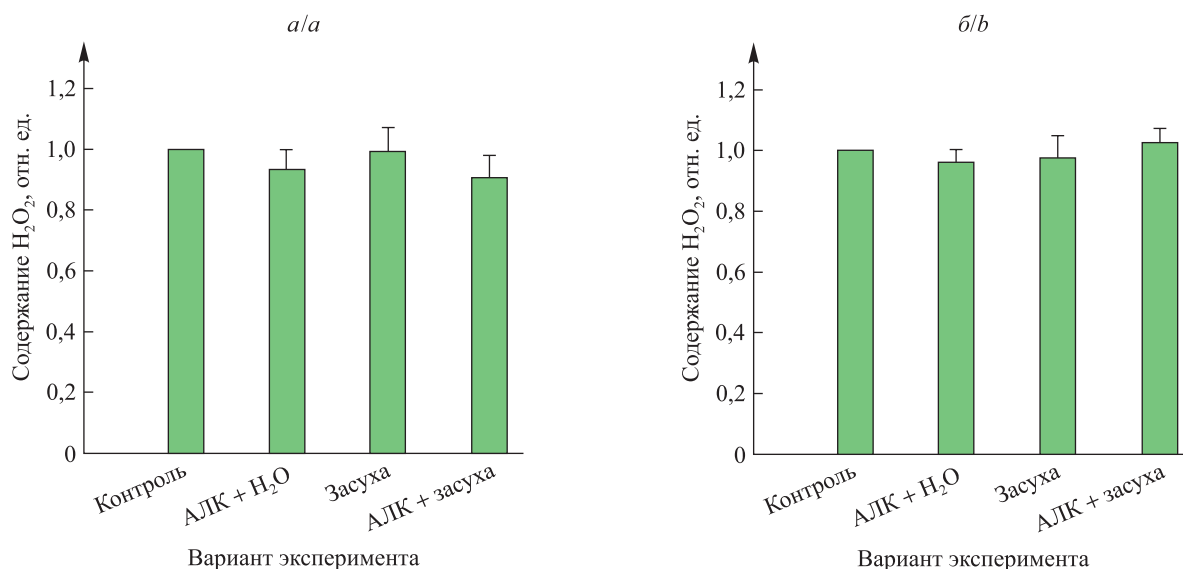


Рис. 3. Изменение содержания H_2O_2 в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи

Fig. 3. Changes in the content of H_2O_2 in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under the influence of soil drought

Влияние почвенной засухи на содержание Хл, Фео и Кар в листьях растений ячменя. Методом ВЭЖХ был проанализирован качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов листьев растений ячменя в условиях почвенной засухи. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить во всех исследуемых вариантах наличие Кар (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина), а также Хл *a*, Хл *b*, Фео *a* и следовых количеств Фео *b* [20].

В ходе настоящего исследования было изучено изменение содержания Хл *a*, Хл *b* и Кар в 7-дневных зеленых листьях растений ячменя в нормальных условиях (вариант «контроль») и при абиотическом стрессе, вызванном почвенной засухой (вариант «засуха»), а также после обработки АЛК в аналогичных условиях (варианты «АЛК + H₂O» и «АЛК + засуха»). Результаты представлены на рис. 4 и в табл. 3, 4. Установлено, что под действием почвенной засухи в листьях растений ячменя сорта Бровар достоверно снижается общее содержание Хл (Хл *a* + Хл *b*) на 13,6 % относительно контроля. Такая же закономерность наблюдается у этого сорта для Хл *a* (снижение показателя на 15,2 %) на фоне отсутствия изменений содержания Хл *b* (см. рис. 4, *a*). Однако при обработке растений ячменя сорта Бровар раствором АЛК в концентрации 10 мг/л достоверных отличий содержания Хл по сравнению с контролем не обнаружено, что указывает на стабилизирующее действие АЛК на пигментный аппарат.

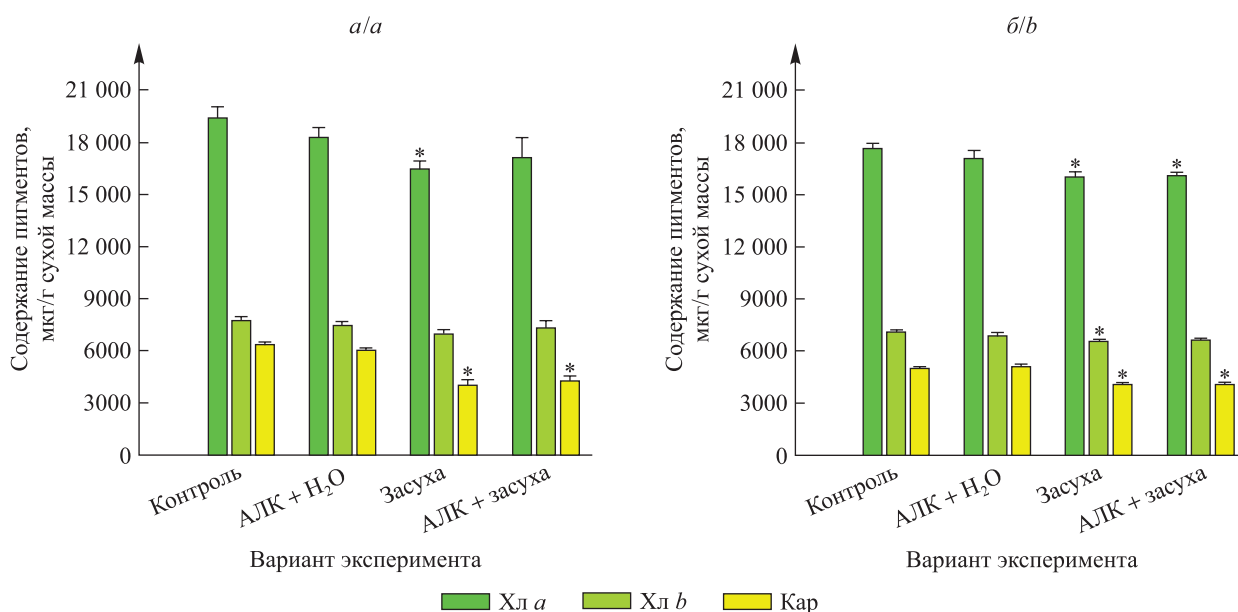


Рис. 4. Изменение содержания пигментов (Хл *a*, Хл *b* и Кар) в листьях растений ячменя сортов Бровар (*a*) и Аванс (*b*), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 4. Changes in the content of pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids) in the leaves of barley plants of the Brovary (*a*) and Avans (*b*) varieties treated with ALA, under the influence of soil drought (asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

Для сорта Аванс наблюдали несколько иную картину. Хотя почвенная засуха и приводила к снижению уровня фотосинтетических пигментов, оно было существенно меньшим, чем у сорта Бровар (см. рис. 4, *b*). При этом исходное содержание Хл и Кар в листьях растений ячменя сорта Аванс было значительно ниже (на 8,7 % для Хл и 20,1 % для Кар) их содержания в листьях растений ячменя сорта Бровар. В связи с этим даже большее снижение уровня фотосинтетических пигментов в условиях засухи в листьях растений ячменя сорта Бровар не привело к уменьшению их количества относительно содержания пигментов в аналогичных вариантах сорта Аванс.

Также было проанализировано влияние недостатка воды на уровень Кар (см. рис. 4). Установлено, что растения ячменя сорта Бровар, выращенные в условиях почвенной засухи, отличаются от контроля пониженным содержанием данных соединений (на 37,0 и 33,2 % меньше в пересчете на сухой вес для вариантов «засуха» и «АЛК + засуха» соответственно). При этом наблюдается уменьшение концентрации как кислородсодержащих (ксантофилловых) Кар – неоксантина, виолаксантина и лютеина (на 44,1; 45,6 и 23,8 % для варианта «засуха» и на 34,3; 43,6 и 17,7 % для варианта «АЛК + засуха» соответственно), так и бескислородного Кар – β -каротина (на 41,3 % для варианта «засуха» и на 41,4 % для варианта «АЛК + засуха») (см. табл. 3).

Таблица 3

Изменение содержания Кар и Фео в листьях растений ячменя сорта Бровар, обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи

Table 3

Changes in the content of carotenoids and pheophytin in the leaves of barley plants of the Brovar variety, treated with ALA, under the influence of soil drought

Вариант эксперимента	Содержание пигментов, мкг/г сухой массы				
	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Фео <i>a</i>	β-Каротин
Контроль	1132 ± 102	793 ± 40	1901 ± 38	120 ± 1	2425 ± 103
АЛК + H ₂ O	1100 ± 52	746 ± 21	1793 ± 60	120 ± 5	2263 ± 1
Засуха	633 ± 59*	431 ± 45*	1448 ± 61*	123 ± 14	1424 ± 249*
АЛК + засуха	744 ± 101*	447 ± 42*	1564 ± 138	111 ± 3*	1420 ± 22*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Растения ячменя сорта Аванс, выращенные в условиях недостатка влаги в почве (в присутствии АЛК и без нее), также отличаются от контрольных растений более низким содержанием Кар. Так, наблюдается уменьшение концентрации неоксантина, виолаксантина и лютеина (на 20,9; 31,1 и 12,2 % для варианта «засуха» и на 2,3; 9,1 и 14,9 % для варианта «АЛК + засуха» соответственно), а также β-каротина (на 20,7 % для варианта «засуха» и на 26,9 % для варианта «АЛК + засуха») (см. табл. 4).

Таблица 4

Изменение содержания Кар и Фео в листьях растений ячменя сорта Аванс, обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи

Table 4

Changes in the content of carotenoids and pheophytin in the leaves of barley plants of the Avans variety, treated with ALA, under the influence of soil drought

Вариант эксперимента	Содержание пигментов, мкг/г сухой массы				
	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Фео <i>a</i>	β-Каротин
Контроль	717 ± 35	373 ± 26	1698 ± 36	104 ± 3	2202 ± 56
АЛК + H ₂ O	847 ± 22*	504 ± 21*	1685 ± 51	102 ± 3	2061 ± 69
Засуха	567 ± 40*	257 ± 20*	1490 ± 41*	115 ± 7	1747 ± 66*
АЛК + засуха	700 ± 11	339 ± 7	1445 ± 38*	164 ± 18*	1610 ± 45*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Приведенные выше данные указывают, что дефицит влаги в почве отрицательно влияет на накопление пигментов в клетках растений ячменя. При этом обработка листьев растений ячменя сорта Бровар АЛК в условиях засухи приводила к тому, что содержание хлорофилльных пигментов в них достоверно не отличалось от контроля, тогда как у не обработанных раствором АЛК растений уровень хлорофилльных пигментов достоверно отличался от контроля. Для растений ячменя сорта Аванс такого эффекта действия АЛК не наблюдалось.

Более наглядно стрессопротекторные свойства АЛК демонстрирует изменение содержания Фео *a* по отношению к уровню Хл *a* (Фео *a* / Хл *a*) в листьях растений ячменя сорта Бровар (рис. 5). Так, в варианте «засуха» показатель Фео *a* / Хл *a* увеличился на 19,7 % по сравнению с контролем, а в варианте «АЛК + засуха» – только на 4,9 % по сравнению с контролем, что находится в пределах погрешности эксперимента. Для растений сорта Аванс наблюдался рост показателя Фео *a* / Хл *a* на 23,2 % для варианта «засуха» и на 73,7 % для варианта «АЛК + засуха», что указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи и его усугубление при добавлении АЛК.

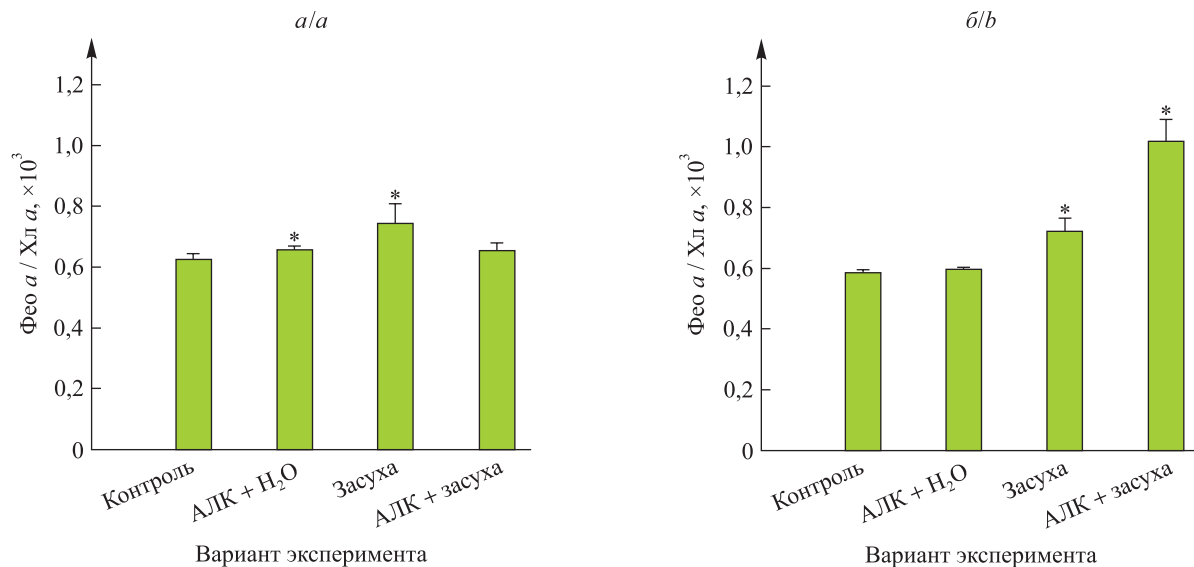


Рис. 5. Изменение содержания Фео *a* по отношению к уровню Хл *a* в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК в условиях почвенной засухи (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 5. Changes in the content of pheophytin *a* in relation to chlorophyll *a* level in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under soil drought (asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

Влияние почвенной засухи на содержание структурных белков ФС в листьях растений ячменя.

Анализ содержания структурных белков ФС II (PsbA, Lhcb2, Lhcb4) и ФС I (Lhca2) показал принципиально разную регуляцию синтеза этих компонентов хлоропластных мембран в ответ на действие почвенной засухи в сочетании с обработкой растений АЛК для сортов Бровар и Аванс. Так, в листьях растений ячменя сорта Бровар при нормальном поливе АЛК стимулировала синтез белка внешней антенны ФС II Lhcb2, а также белка антенны ФС I Lhca2 (рис. 6, а). При почвенной засухе обработка листьев АЛК, наоборот, приводила к снижению содержания белков антенных комплексов ФС, что является эффективным фотопротекторным механизмом защиты ФСА в таких условиях.

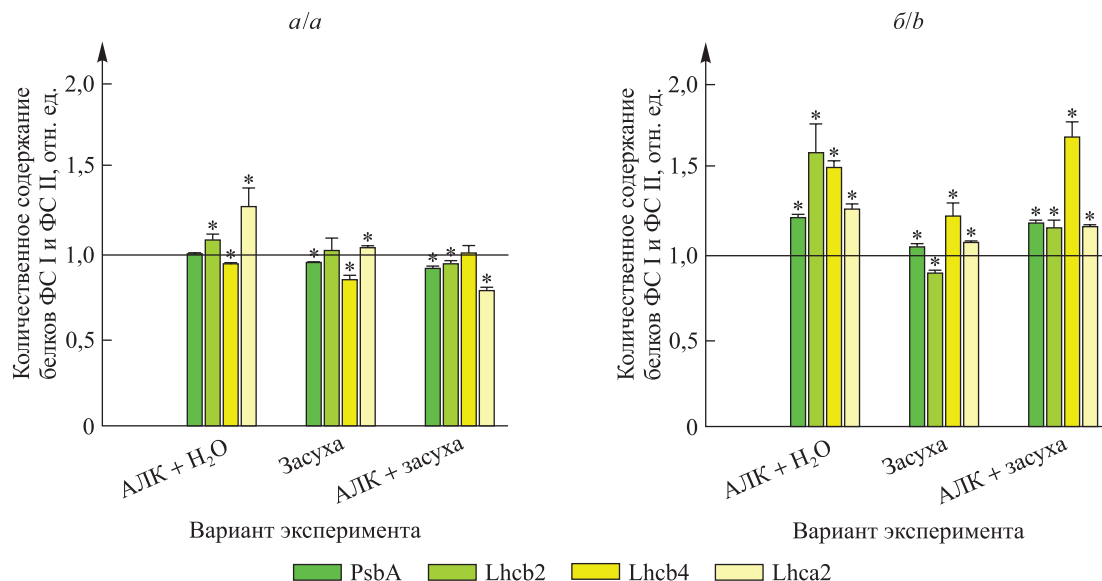


Рис. 6. Содержание белков ФС I и ФС II в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК, в условиях почвенной засухи (контроль принят за единицу и представлен базовой линией; звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 6. The content of photosystem I and photosystem II proteins in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under soil drought conditions (control is taken as a unit and represented by the baseline; asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

Для сорта Аванс наблюдался противоположный ответ растительной клетки на обработку листьев АЛК в условиях засухи: количество всех проанализированных белков увеличивалось относительно их уровня и в контроле, и в варианте «засуха», что потенциально опасно с точки зрения развития в таких растениях фотоокислительного стресса при недостатке влаги (рис. 6, б).

Полученный результат объясняет существенно более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях сорта Аванс, чем в растениях сорта Бровар, при действии почвенной засухи и говорит о наличии у сорта Бровар дополнительных механизмов, связанных с регуляцией синтеза структурных белков фотосинтетических мембран и определяющих его засухоустойчивость. По мнению авторов, уменьшение количества пигментов в листьях этого сорта обусловлено в основном не деструкцией в результате стресса, а снижением их синтеза, что может быть адаптационной реакцией растений, позволяющей минимизировать вероятность образования АФК в фотосинтетических мембранах при недостатке влаги, а также оптимизировать в данных условиях использование энергии света для фотосинтетических процессов. На это указывает преимущественное снижение Кар (неоксантин, виолаксантин и β -каротин), активно участвующих в светосборе.

Заключение

Таким образом, установлено существенное влияние почвенной засухи на морфометрические показатели листьев растений ячменя сортов Бровар и Аванс, накопление в них АФК, а также содержание фотосинтетических пигментов. При действии засухи выявлено значительное снижение ростовых показателей растений (в частности, длины листьев более чем на 20 %), возрастание общего содержания АФК, уменьшение количества Хл и Кар. Наибольшее снижение содержания фотосинтетических пигментов в условиях засухи было отмечено для листьев растений ячменя сорта Бровар. При этом обработка листьев растений ячменя сорта Бровар АЛК в условиях засухи приводила к тому, что содержание хлорофилльных пигментов в них достоверно не отличалось от контроля, тогда как у не обработанных раствором АЛК растений уровень хлорофилльных пигментов достоверно отличался от контроля. Для растений ячменя сорта Аванс такого эффекта действия АЛК не наблюдалось.

Показано, что при засухе показатель Фео a / Хл a для растений сорта Бровар увеличился на 19,7 % по сравнению с контролем, а при использовании АЛК – только на 4,9 %. Для растений сорта Аванс отмечен рост показателя Фео a / Хл a на 23,2 % для варианта «засуха» и на 73,7 % для варианта «АЛК + засуха», что указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи и его усугубление при добавлении АЛК.

Выявлено, что при обработке листьев растений ячменя сорта Бровар АЛК в условиях недостатка воды в почве снижается содержание белков антенных комплексов ФС. Это приводит к уменьшению размера светособирающей антенны и является эффективным механизмом защиты ФСА в подобных условиях. Для сорта Аванс наблюдался противоположный ответ растительной клетки на обработку листьев АЛК в условиях засухи: количество всех проанализированных белков ФС увеличивалось относительно их уровня в контроле и варианте «засуха», что потенциально опасно с точки зрения развития в таких растениях фотоокислительного стресса при недостатке влаги.

Обнаруженная тонкая подстройка компонентов ФСА листьев растений ячменя сорта Бровар к действию засухи может быть одним из ключевых факторов, определяющих устойчивость этого сорта к данному виду абиотического стресса. У сорта Аванс указанные адаптационные механизмы либо отсутствуют, либо проявляются в меньшей степени, что приводит к более интенсивному развитию окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи. В случае обработки листьев растений ячменя сорта Аванс АЛК стресс не снимается, а, наоборот, усиливается.

Библиографические ссылки

1. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
2. Noctor G, Reichheld J-P, Foyer CH. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;80:3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
3. Wang Xuxu, Gao Yangang, Wang Qingjie, Chen Min, Ye Xinlin, Li Dongmei, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.
4. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.

6. Cominelli E, Conti L, Tonelli C, Galbiati M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*. 2013;30(4):355–361. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.001.
7. Kebede A, Kang MS, Bekele E. Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley. In: Sparks DL, editor. *Advances in agronomy. Volume 156*. Cambridge: Elsevier; 2019. p. 265–314. DOI: 10.1016/bs.agron.2019.01.008.
8. Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun B-G, et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019;161:120–133. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
9. Chan Zhulong, Shi Haitao. Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules. *Plant Signaling & Behavior*. 2015;10(3):e991577. DOI: 10.4161/15592324.2014.991577.
10. Яронская ЕБ, Балута ТВ, Коляго ВМ, Шальго НВ. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя и содержание пигментов. В: Зорина ТЕ, редактор. *Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Шестой съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков; 6–8 октября 2004 г.; Минск, Беларусь. Часть I*. Минск: Редакционно-издательский центр Академии управления при Президенте Республики Беларусь; 2004. с. 117–119.
11. Averina NG, Yaronskaya EB. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth. *Photosynthetica*. 1991;25(1):27–31.
12. Averina NG, Gritskevich ER, Vershilovskaya IV, Usatov AV, Yaronskaya EB. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2010;57(6):792–798. DOI: 10.1134/S1021443710060075.
13. Beyzaei Z, Averina NG, Sherbakov RA. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37(2):11. DOI: 10.1007/s11738-014-1752-0.
14. Beyzaei Z, Sherbakov RA, Averina NG. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2014;33(4):745–750. DOI: 10.1007/s00344-014-9422-4.
15. Доманская ИН, Радюк МС, Будакова ЕА, Самович ТВ, Спивак ЕА, Шальго НВ, составители. *Технология ДНК-манипулирования генов устойчивости ячменя к засухе*. Минск: Право и экономика; 2011. 31 с.
16. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):145–157. DOI: 10.1006/niox.1996.0113.
17. Козел НВ, Шальго НВ. Антиоксидантная система листьев ячменя при фотоокислительном стрессе, индуцированном бенгальским розовым. *Физиология растений*. 2009;56(3):351–358.
18. Козел НВ. *Фотоокислительные процессы, индуцированные в растениях ячменя и табака сенситизаторами ксантеиновой природы* [диссертация]. Минск: [б. и.]; 2009. 146 с.
19. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*. 1997;202(2):133–141. DOI: 10.1016/S0022-1759(96)00244-x.
20. Каляга ТГ, Козел НВ. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:46–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.
21. Azarin K, Usatov A, Makarenko M, Kozel N, Kovalevich A, Dremuk I, et al. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology*. 2020;103(4–5):373–389. DOI: 10.1007/s11103-020-00997-x.
22. Jansson S, Stefánsson H, Nyström U, Gustafsson P, Albertsson P-Å. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1997;1320(3):297–309. DOI: 10.1016/S0005-2728(97)00033-9.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
24. Рокицкий ПФ. *Биологическая статистика*. 3-е издание. Минск: Высшая школа; 1973. 320 с.
25. Wu Y, Jin X, Liao W, Hu L, Dawuda MM, Zhao X, et al. 5-Aminolevulinic acid (ALA) alleviated salinity stress in cucumber seedlings by enhancing chlorophyll synthesis pathway. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:635. DOI: 10.3389/fpls.2018.00635.
26. Liu D, Wu L, Naeem MS, Liu H, Deng X, Xu L, et al. 5-Aminolevulinic acid enhances photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant system in oilseed rape under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;35(9):2747–2759. DOI: 10.1007/s11738-013-1307-9.
27. Емельянова АВ, Обуховская ЛВ, Аверина НГ. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на дыхательную активность растений озимого рапса, обогащенных антоцианами. В: Смолич ИИ, Демидчик ВВ, Падутов ВЕ, редакторы. *Клеточная биология и биотехнология растений. Тезисы докладов II Международной научно-практической конференции; 28–31 мая 2018 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2018. с. 38.

References

1. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
2. Noctor G, Reichheld J-P, Foyer CH. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;80:3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
3. Wang Xuxu, Gao Yangang, Wang Qingjie, Chen Min, Ye Xinlin, Li Dongmei, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.
4. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.
6. Cominelli E, Conti L, Tonelli C, Galbiati M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*. 2013;30(4):355–361. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.001.

7. Kebede A, Kang MS, Bekele E. Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley. In: Sparks DL, editor. *Advances in agronomy. Volume 156*. Cambridge: Elsevier; 2019. p. 265–314. DOI: 10.1016/bs.agron.2019.01.008.
8. Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun B-G, et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019;161:120–133. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
9. Chan Zhulong, Shi Haitao. Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules. *Plant Signaling & Behavior*. 2015;10(3):e991577. DOI: 10.4161/15592324.2014.991577.
10. Yaronskaya EB, Baluta TV, Kolyago VM, Shalygo NV. [Influence of 5-aminolevulinic acid on the growth of barley plants and pigment content]. In: Zorina TE, editor. *Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya «Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem». Shestoi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov; 6–8 oktyabrya 2004 g.; Minsk, Belarus'. Chast' I* [International scientific conference «Molecular, membrane and cellular bases of biosystems functioning». Sixth congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists; 2004 October 6–8; Minsk, Belarus. Part 1]. Minsk: Editorial and Publication Centre of the Academy of Public Administration under the aegis of the President of the Republic of Belarus; 2004. p. 117–119. Russian.
11. Averina NG, Yaronskaya EB. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth. *Photosynthetica*. 1991; 25(1):27–31.
12. Averina NG, Gritskovich ER, Vershilovskaya IV, Usatov AV, Yaronskaya EB. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2010;57(6):792–798. DOI: 10.1134/S1021443710060075.
13. Beyzaei Z, Averina NG, Sherbakov RA. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37(2):11. DOI: 10.1007/s11738-014-1752-0.
14. Beyzaei Z, Sherbakov RA, Averina NG. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2014;33(4):745–750. DOI: 10.1007/s00344-014-9422-4.
15. Domanskaya IN, Radyuk MS, Budakova EA, Samovich TV, Spivak EA, Shalygo NV, compilers. *Tekhnologiya DNK-tipirovaniya genov ustoiчивosti yachmenya k zasukhe* [DNA typing technology for drought resistance genes in barley]. Minsk: Pravo i ekonomika; 2011. 31 p. Russian.
16. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):145–157. DOI: 10.1006/niox.1996.0113.
17. Kozel NV, Shalygo NV. [Antioxidant system of barley leaves under photooxidative stress induced by rose bengal]. *Fiziologiya rastenii*. 2009;56(3):351–358. Russian.
18. Kozel NV. *Fotooksislitel'nye protsessy, indutsirovannye v rasteniyakh yachmenya i tabaka sensibilizatorami ksantenovoi prirody* [Photo-oxidative processes induced in barley and tobacco plants by sensitizers of xanthene nature] [dissertation]. Minsk: [s. n.]; 2009. 146 p. Russian.
19. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*. 1997;202(2):133–141. DOI: 10.1016/S0022-1759(96)00244-X.
20. Kaliaha TG, Kozel NV. The effect of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:46–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.
21. Azarin K, Usatov A, Makarenko M, Kozel N, Kovalevich A, Dremuk I, et al. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology*. 2020;103(4–5):373–389. DOI: 10.1007/s11103-020-00997-X.
22. Jansson S, Stefánsson H, Nyström U, Gustafsson P, Albertsson P-Å. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1997;1320(3):297–309. DOI: 10.1016/S0005-2728(97)00033-9.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
24. Rokitskii PF. *Biologicheskaya statistika* [Biological statistics]. 3rd edition. Minsk: Vysshaya shkola; 1973. 320 p. Russian.
25. Wu Y, Jin X, Liao W, Hu L, Dawuda MM, Zhao X, et al. 5-Aminolevulinic acid (ALA) alleviated salinity stress in cucumber seedlings by enhancing chlorophyll synthesis pathway. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:635. DOI: 10.3389/fpls.2018.00635.
26. Liu D, Wu L, Naeem MS, Liu H, Deng X, Xu L, et al. 5-Aminolevulinic acid enhances photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant system in oilseed rape under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;35(9):2747–2759. DOI: 10.1007/s11738-013-1307-9.
27. Yemelyanova HV, Obukhovskaya LV, Averina NG. [Influence of 5-aminolevulinic acid on the respiratory activity of winter rapeseed plants enriched with anthocyanins]. In: Smolich II, Demidchik VV, Padutov VE, editors. *Kletochnaya biologiya i biotekhnologiya rastenii. Tezisy dokladov II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 28–31 maya 2018 g.; Minsk, Belarus'* [Cell biology and plant biotechnology. Abstracts of the 2nd International scientific and practical conference; 2018 May 28–31; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2018. p. 38. Russian.

Получена 27.06.2022 / исправлена 18.07.2022 / принята 19.07.2022.
Received 27.06.2022 / revised 18.07.2022 / accepted 19.07.2022.

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА И ЕГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ОГУРЦА *CUCUMIS SATIVUS* ПРИ ФУЗАРИОЗНОМ ЗАРАЖЕНИИ

Л. Ф. КАБАШНИКОВА¹⁾, И. Н. ДОМАНСКАЯ¹⁾, Л. В. ПАШКЕВИЧ¹⁾,
И. А. ДРЕМУК¹⁾, А. В. МАРТЫСЮК¹⁾, О. В. МОЛЧАН²⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Изучены ответные реакции хлоропластов у растений огурца сорта Кустовой, выращенных при освещении разной интенсивности (6000 и 11 000 лк) или при LED-освещении с преобладанием красного и дальнего красного света, на заражение грибом *Fusarium oxysporum*. В хлоропластах, сформированных при пониженной освещенности, через 72 ч после инфицирования возросло количество хлорофиллов и каротиноидов, тогда как в хлоропластах, сформированных при повышенной освещенности, наблюдалось существенное усиление катаболизма пигментов. При фузариозе в условиях изученного светового диапазона не был задействован виолаксантиновый цикл, а фотохимическая активность хлоропластов мало зависела от уровня освещенности. Преобладание красного или дальнего красного света вызывало повышение содержания хлорофиллов и каротиноидов в пересчете на сухую массу листа по сравнению с таковым у растений, выращенных на белом свете. При заражении на белом и красном свете происходило увеличение, а при заражении на дальнем красном свете – уменьшение общего содержания хлорофиллов и каротиноидов относительно их уровня в здоровых растениях. Установлено, что фузариозное увядание привело к снижению фотохимической активности фотосистемы I и сопряженного с ней транспорта электронов (на 20 %) в хлоропластах, сформированных на красном и дальнем красном свете. Также отмечено снижение функциональной эффективности фотосистемы II, скорее всего, за счет необратимых изменений пигмент-белковых комплексов при обоих режимах LED-освещения. Рассмотрены различные механизмы ответной реакции хлоропластов растений огурца на инфицирование патогеном в зависимости от световых условий формирования фотосинтетических мембран.

Ключевые слова: хлорофилл; каротиноиды; фотосистема I; фотосистема II; свет разной интенсивности; красный свет; дальний красный свет; *Cucumis sativus*; *Fusarium oxysporum* sp.

Образец цитирования:

Кабашникова ЛФ, Доманская ИН, Пашкевич ЛВ, Дремук ИА, Мартысюк АВ, Молчан ОВ. Влияние интенсивности света и его спектрального состава на фотосинтетическую активность огурца *Cucumis sativus* при фузариозном заражении. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:39–52. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-39-52>

For citation:

Kabashnikova LF, Domanskaya IN, Pashkevich LV, Dremuk IA, Martysiuk HV, Molchan OV. Influence of light intensity and its spectral composition on photosynthetic activity of cucumber *Cucumis sativus* under fusarium wilt. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:39–52. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-39-52>

Авторы:

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

Ирина Николаевна Доманская – кандидат биологических наук; научный сотрудник лаборатории прикладной биофизики и биохимии.

Любовь Валерьевна Пашкевич – научный сотрудник лаборатории прикладной биофизики и биохимии.

Ирина Александровна Дремук – кандидат биологических наук; научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Анна Викторовна Мартысюк – младший научный сотрудник лаборатории прикладной биофизики и биохимии.

Ольга Викторовна Молчан – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией водного обмена и фотосинтеза растений.

Authors:

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

kabashnikova@mail.ru

Irina N. Domanskaya, PhD (biology); researcher at the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

domanin07@mail.ru

Lyubov V. Pashkevich, researcher at the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

ljubi.k87@gmail.com

Irina A. Dremuk, PhD (biology); researcher at the laboratory of plant cell biophysics and biochemistry.

irinadremuk@yandex.by

Hanna V. Martysiuk, junior researcher at the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

anya.mart@list.ru

Olga V. Molchan, PhD (biology), docent; head of the laboratory of water exchange and photosynthesis of plants.

olga_molchan@mail.ru

INFLUENCE OF LIGHT INTENSITY AND ITS SPECTRAL COMPOSITION ON PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF CUCUMBER *CUCUMIS SATIVUS* UNDER FUSARIUM WILT

L. F. KABASHNIKOVA^a, I. N. DOMANSKAYA^a, L. V. PASHKEVICH^a,
I. A. DREMUK^a, H. V. MARTYSIUK^a, O. V. MOLCHAN^b

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

^bV. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: L. F. Kabashnikova (kabashnikova@mail.ru)

The responses of cucumber chloroplasts of the Kustovoi variety formed under lighting of different intensity (6000 and 11 000 lx) or under LED lighting with a predominance of red light and far red light to infection with fungus *Fusarium oxysporum* were studied. The amount of chlorophylls and carotenoids in chloroplasts formed at low light increased in 72 h after infection, and at high light a significant increase in pigment catabolism was observed. Under fusarium wilt, the violaxanthin cycle was not involved in the conditions of the studied light range, and the photochemical activity of chloroplasts did not depend much on the level of illumination. The predominance of red light or far red light caused an increase in both chlorophylls and carotenoids content in terms of the dry mass of the leaf compared to their content in plants grown on white light. Infection on white light and red light caused an increase in the total content of chlorophylls and carotenoids, and a decrease in these parameters relative to healthy plants was noted on far red light. Fusarium wilt led to a decrease in photochemical activity and electron transport of photosystem I (by 20 %) in chloroplasts on red light and far red light. A decrease in the functional efficiency of photosystem II was also observed, most likely due to irreversible changes in pigment-protein complexes with two types of LED lighting. Various mechanisms of the response of cucumber chloroplasts to pathogen infection are discussed, depending on the light conditions of the formation of photosynthetic membranes.

Keywords: chlorophyll; carotenoids; photosystem I; photosystem II; light of different intensity; red light; far red light; *Cucumis sativus*; *Fusarium oxysporum* sp.

Введение

Свет является важным индуктором иммунитета растений. Он действует как центральный сигнал окружающей среды, запускающий различные адаптивные и фотоморфогенные реакции в органах растений [1]. У растений развилось несколько фоторецепторов, которые воспринимают изменения интенсивности, направления, длины волны света, а также его суточной и сезонной ритмичности. Среди них наиболее подробно охарактеризованы фитохромы – фоторецепторы, поглощающие красный свет (КС) и дальний красный свет (ДКС) [2]. В настоящее время считается, что свет тесно связан с реакцией растений на абиотические и биотические факторы за счет общих сигнальных каскадов [3]. По этой причине важной задачей представляется выяснение механизмов влияния света на адаптацию хлоропластов при патологическом процессе. Лучше всего охарактеризованы сигнальные пути, которые опосредуют реакцию растений на свет и температуру. Фоторецептор фитохром *B* действует как термодатчик в процессе термоморфогенеза растений, определенного набора событий морфогенеза и изменения структуры, происходящих при высокой температуре окружающей среды [4].

Патогены представляют собой разрушительную угрозу для выживания и размножения растений. В процессе эволюции у растений выработались универсальные защитные механизмы, позволяющие справляться с этими биотическими стрессорами [5]. У различных видов растений было идентифицировано множество генов и сигнальных молекул, индуцируемых патогенами и травоядными насекомыми. Наиболее хорошо изученными являются два стрессовых фитогормона – салициловая кислота (СК) и жасмоновая кислота (ЖК). Примечательно, что на пути индукции защитных реакций растений сильно влияют свет и температура. Координированная связь между защитой растений и световыми циклами широко изучалась в последние годы [6; 7]. Показано, что период возникновения и развития защитных реакций изменяется в зависимости от интенсивности и длины волны света, а также переходов свет – темнота [8; 9]. Световая регуляция защиты растений иллюстрируется двумя основными аспектами:

- синхронизацией атак патогенов со световыми циклами (так как поведенческие и физиологические паттерны вредителей и патогенов синхронизированы с дневными циклами света, растения способны предсказывать возникновение их атак);

• компромиссом между ростом и защитой [10] (поскольку защитные реакции требуют затрат метаболических ресурсов и энергии, растения имеют весьма ограниченные возможности для их реализации, следовательно, чрезмерное выделение метаболитов и энергии для защитных реакций может привести к замедлению роста, поэтому предполагается, что растения должны точно отслеживать информацию об окружающем освещении, чтобы оптимизировать затраты на энергообеспечение [3]).

Недавние исследования показали, что световые сигналы играют важную роль в модуляции защитных реакций [7; 8]. В условиях низкого отношения КС/ДКС содержание ЖК уменьшается, и растения проявляют низкую чувствительность к обработке СК или ЖК при индукции защитных реакций [9]. Соответственно, мутанты с дефицитом фитохрома *B*, имеющие конститутивный фенотип избегания тени, проявляют гиперчувствительность к патогенам [9]. В то же время в условиях темноты биосинтез СК и чувствительность растений снижаются, а защитные реакции нарушаются [6; 8]. Двойные мутанты по фитохрому *A* и фитохрому *B* также демонстрируют значительное снижение чувствительности к СК и системной приобретенной резистентности. Это указывает на то, что опосредованная фитохромом передача световых сигналов важна для СК-ассоциированных защитных реакций. Напротив, в условиях высокого отношения КС/ДКС световая стабилизация FHY3 и FAR1 – двух гомологичных транскрипционных факторов, важных для передачи сигналов фитохрома *A*, – негативно влияет на биосинтез и передачу сигналов СК [7]. Вполне вероятно, что опосредованная фитохромом *A* световая регуляция биосинтеза и передачи сигналов СК способствует точной настройке защитных реакций, связанных с СК-регуляцией.

Более того, показано, что фитохром *B* регулирует биосинтез ЖК и чувствительность к ней растений в зависимости от соотношения КС и ДКС [11; 12]. В условиях низкого отношения КС/ДКС экспрессия гена *sulfotransferase 2A* (*ST2A*), который участвует в метаболизме ЖК, повышается зависимым от фитохрома *B* образом [12]. Индукция гена *ST2A* связана с уменьшением накопления ЖК. Между тем низкое отношение КС/ДКС и мутация фитохрома *B* вызывают быструю деградацию белков, хорошо известных как репрессоры функции ЖК [13; 14]. Очевидно, что фитохром *A* и фитохром *B* имеют решающее значение для усиления защитных реакций при патогенезе.

Влияние света на иммунитет растений при атаке разных типов патогенов (грибов, бактерий, вирусов) изучалось длительное время, но чаще в темноте [10], чем на свету. Эти исследования выполнялись в основном на мутантах арабидопсиса и очень редко на овощных культурах. В частности, проведенные на томатах исследования показали, что в условиях низкого отношения КС/ДКС мутант *phyB1phyB2*, избегающий тени, характеризуется повышенной чувствительностью к растительоядным насекомым, таким как трипсы и гусеницы *Spodoptera eridania* [15]. Кроме того, обнаружено, что у томатов снижается устойчивость к грибковому патогену *Botrytis cinerea*, когда фитохром *B* генетически или физиологически инактивирован [16]. Как и у арабидопсиса [12], этот эффект инактивации фитохрома *B*, по крайней мере, частично зависит от ЖК. Установлено, что у томатов ингибирование ответа с участием ЖК при низком отношении КС/ДКС приводит к повышению содержания растворимых сахаров в листьях, что, вероятно, способствует росту грибов и повышению их патогенности [16].

Во многих регионах мира овощные культуры, включая огурец, выращиваются в теплицах или других защищенных помещениях, при этом предпочтение обычно отдается светодиодной технологии, которая обеспечивает улучшенную энергоэффективность освещения, а также контроль над спектральным составом света. В связи с этим крайне важно подобрать оптимальное соотношение источников света разного диапазона излучения. Известно, что выращивание на КС стимулирует прибавку сухой массы, разрастание корней и стеблей и другие процессы [17], увеличивает содержание хлорофиллов (Хл), повышает эффективность функционирования фотосистемы II (ФС II) у *Arabidopsis thaliana* [18]. Установлено, что ДКС и соотношение КС и ДКС имеют важное значение для большинства фоторецепторных процессов, к числу которых принадлежит формирование фотосинтетического аппарата. Показано, что добавление синего света (СС) положительно влияет на развитие растений, а применение в светокультуре КС и СС усиливает синергетический эффект, при этом оптимальное соотношение КС, ДКС и СС для каждой культуры индивидуально [19].

Таким образом, цель данной работы – изучение влияния интенсивности и спектрального состава освещения на пигментный фонд и структурно-функциональное состояние фотосинтетических мембран растений огурца в условиях патогенного заражения *Fusarium oxysporum* sp. (*F. ox.*).

Материалы и методы исследования

Выращивание растений. В работе использовали зеленые растения огурца сорта Кустовой белорусской селекции, которые на протяжении 40 сут выращивали в климатоканнере под натриевыми лампами (тип ЖКУ 28-400-001 ХХЛ1, напряжение 220 В, мощность 400 Вт, степень защиты IP23/IP53) при разной освещенности (6000 и 11 000 лк, это соответствует 180 и 330 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с) с фотопериодом

14 ч света и 10 ч темноты при температуре 24 °С в грунте на основе торфа «Универсальный» (*Terra Vita*, Россия). Затем часть растений обрабатывали суспензией спор гриба *F. ox.* (10^{-6} спор на 1 мл) из расчета 5 мл на растение. Гриб *F. ox.* предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение 2 недель. Анализ проводили через 72 ч после инокуляции патогеном. Контролем служили растения, обработанные дистиллированной водой.

Другая серия опытов была посвящена изучению влияния LED-освещения разного спектрального состава на пигментный фонд и структурно-функциональное состояние фотосистемы I (ФС I) и ФС II хлоропластов огурца сорта Кустовой в условиях заражения грибом *F. ox.* Растения выращивали под белым светом (БС) люминесцентных ламп (вариант «БС») при температуре 22–23 °С и влажности 65 % в режиме 14 ч света (интенсивность 100 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с) и 10 ч темноты до появления зачатка первого листа (10 сут). Затем растения переносили на LED-освещение (вариант «КС» получен при сочетанном освещении источниками света КС4 и КДК2, а вариант «ДКС» – при сочетанном освещении источниками света КС4 и КДК5). При этом в спектральном составе LED-освещения, включающем все диапазоны физиологически активной радиации (от 400 до 800 нм), варьировали соотношение уровней плотности потока фотонов (табл. 1).

Таблица 1

Распределение физиологически значимых
спектральных диапазонов у LED-излучателей КС и ДКС

Table 1

Distribution of physiologically significant
spectral ranges in the red light and far red light LED emitters

Диапазон, нм	Распределение, %	
	Излучатели КС	Излучатели ДКС
400–499	13,86	14,64
500–599	16,26	4,55
600–699	58,19	56,91
700–800	11,69	23,90
Всего	100,0	100,0

Вариант «КС», отличающийся повышенной долей КС, имеет индексы КС/ДКС = 5,0 и КС/СС = 4,0. Вариант «ДКС» характеризуется повышенной долей ДКС (КС/ДКС = 2,0) при сохранении на постоянном уровне фотосинтетически активной радиации (КС/СС = 4,0). В таких условиях LED-освещения растения огурца дорастивали до полного развития первого и второго листа (25 сут). Интенсивность света составляла 100 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с для всех вариантов освещения. Обработку суспензией спор гриба *F. ox.* осуществляли по приведенной выше схеме и анализировали пробы через 72 ч после заражения.

Определение содержания Хл и каротиноидов (Кар). Качественную и количественную оценку содержания Хл и Кар в образцах проводили с помощью хроматографа высокого давления LC-20 Prominence (*Shimadzu*, Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 3 мкм, длина 15 см) (*Macherey-Nagel*, Германия) [20]. Пигменты экстрагировали 100 % ацетоном. Разделение пигментов в колонке производили с использованием раствора А (90,0 % ацетонитрила, 9,9 % фильтрованной Н₂О, 0,1 % триэтиламина) и раствора В (100 % этилацетат) по программе со скоростью потока 0,5 мл/мин. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм для каждого пигмента. Содержание пигментов определяли спектрофотометрическим методом, применяя детектор с диодной матрицей SPD-M20A Prominence (*Shimadzu*). Площади пиков хроматограммы использовали для количественного определения Хл и Кар. Одновременно проводили экстракцию фотосинтетических пигментов ацетоном по методу Шлыка [21] и рассчитывали их количество на сырую массу листа.

Фотохимическая активность ФС I и ФС II. Флуоресценцию Хл *a* регистрировали на флуориметре Dual-PAM-100 (*Heinz Walz*, Германия) по методикам, изложенным в работах [22; 23]. После затемнения листьев возбуждали фоновую флуоресценцию Хл (F_0) измерительным светом низкой интенсивности (0,04 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с, 460 нм), модулированным с частотой 20 Гц. При включении актиничного света (125 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с, 635 нм) интенсивность флуоресценции достигала максимальной величины (F_m), затем снижалась за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути. Применение вспышки насыщающего света (10 000 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с, 635 нм) приводило к увеличению интенсивности флуоресценции с величины F_0 до величины F'_m . После вспышки насыщающего

света выключается актиничный свет и включается источник ДКС, возбуждающий только ФС I. При этом пул переносчиков электронов быстро и полностью окисляется. Величина флуоресценции достигает значения F_0' . По полученным значениям F_0 , F_0' , F_m , F_m' и F_v ($F_v = F_m - F_0$) рассчитывали максимальный (потенциальный) квантовый выход фотохимических реакций ФС II (F_v/F_m), эффективный квантовый выход ФС II ($Y(II)$) квантовые выходы нерегулируемого ($Y(NO)$) и регулируемого ($Y(NPQ)$) нефотохимического тушения флуоресценции Хл, коэффициенты нефотохимического тушения флуоресценции Хл (qN и NPQ), коэффициент фотохимического тушения флуоресценции Хл (qP), долю открытых реакционных центров (qL), а также эффективность функционирования электронтранспортной цепи, или скорость транспорта электронов ($ETR(II)$), согласно работе [24].

Измерения фотохимической активности ФС I проводили на том же приборе с двухволновым (830 и 875 нм) модулем регистрации флуоресценции пигмента P700 по представленной в работах [24; 25] методике. Рассчитывали параметры фотохимической активности ФС I: эффективность функционирования электронтранспортной цепи, или скорость транспорта электронов ($ETR(I)$), максимальную флуоресценцию пигмента P700 (P_m), эффективный квантовый выход ФС I ($Y(I)$) и параметры квантовых выходов нефотохимического тушения флуоресценции Хл ($Y(ND)$ и $Y(NA)$), характеризующие донорные ($Y(ND)$) и акцепторные ($Y(NA)$) свойства пигмента P700.

Статистическая обработка данных. Все исследования проводили в 3–5-кратной биологической повторности. Достоверность различий средних значений определяли с использованием компьютерных программ *Statistica* (версия 10.0) (*StatSoft*) и *Excel 2010* (*Microsoft*). Статистически достоверными считались различия между показателями при $p \leq 0,05$ (в таблицах и на графиках отмечены звездочкой).

Результаты и их обсуждение

Изучено действие света разной интенсивности (6000 и 11 000 лк) на фотосинтетическую активность листьев растений огурца, инфицированных патогенным грибом *F. ox*. Установлено, что в здоровых листовых тканях, сформированных в условиях повышенной освещенности (11 000 лк), содержание фотосинтетических пигментов в пересчете на сырую массу листа было снижено по сравнению с таковым в растениях, выращенных при пониженной освещенности (6000 лк), на 20 % (для Хл *a* и Кар), 25 % (для Хл *b*) и 24 % (для Хл *a* + Хл *b*) (данные по ацетоновой экстракции пигментов). Поскольку соотношение пигментов при этом не менялось, причину различий следует искать в разном содержании хлорофиллоносных тканей. От интенсивности освещения зависело и влияние фузариоза на содержание фотосинтетических пигментов. На низкоинтенсивном свете заражение грибом стимулировало рост количества фотосинтетических пигментов на 12–15 % по сравнению с контролем при постоянном отношении Хл *a* / Хл *b*, а также (Хл *a* + Хл *b*) / Кар. Заражение на высокоинтенсивном свете приводило к снижению содержания Хл *a*, Хл *b* и Кар на 19–21 % по отношению к их уровню в контрольных растениях, выращенных при освещенности 11 000 лк.

Хроматографическое разделение ацетоновых экстрактов из листьев растений огурца позволило выявить восемь пиков, принадлежащих фотосинтетическим пигментам, с практически одинаковым временем выхода каждого из них во всех образцах. Отмечены лишь количественные различия, характеризующиеся разной высотой пиков и разными площадями, занимаемыми каждым из пиков во всех вариантах. Ксантофилловые пигменты идентифицировали по времени выхода и спектрам поглощения пиков, а затем сравнивали с литературными данными. В результате в экстрактах из листьев растений огурца было зафиксировано присутствие ксантофиллов (неоксантина, виолаксантина, антероксантина, лютеина, изомера зеаксантина), фотосинтетических пигментов Хл *a* и Хл *b*, а также β -каротина (рис. 1, *a*, *б*). Сравнительный анализ хроматограмм здоровых листьев растений, выращенных при освещенности 6000 и 11 000 лк, показал, что при более высокой интенсивности света общая площадь пиков, предположительно принадлежащих пигменту зеаксантину, в 3 раза больше, чем при низкой интенсивности света. Различия в содержании ксантофиллов воспроизводились во всех опытах, что говорит о наличии определенных тенденций изменения содержания зеаксантина при увеличении интенсивности света, ранее описанных в литературе [26]. Известно, что ксантофилловый, или виолаксантиновый, цикл является одним из наиболее важных фотозащитных механизмов у высших растений [27]. При высокоинтенсивном освещении результатом активной работы электронтранспортной цепи фотосинтеза становится активация фермента виолаксантин деэпоксидазы. Происходит восстановление эпоксидных групп виолаксантина (через образование антероксантина) до зеаксантина, который и выполняет фотопротекторную функцию [27; 28]. В проведенных экспериментах тенденция к увеличению содержания зеаксантина отмечена только для здоровых растений, выращенных на свете высокой интенсивности, а при заражении грибом виолаксантиновый цикл не был задействован в защитных реакциях в условиях использованного диапазона интенсивности БС.

Результаты экспериментов с применением метода ВЭЖХ очень четко продемонстрировали зависимость влияния фузариозного заражения на содержание фотосинтетических пигментов от интенсивности освещения. В инфицированных растениях, выращенных при освещенности 6000 лк, содержание Хл *a*, Хл *b* и их суммы возрастало. При заражении в условиях более высокой интенсивности света было заметно ингибирующее действие патогена на содержание всех фотосинтетических пигментов (см. рис. 1, *a*, *б*).

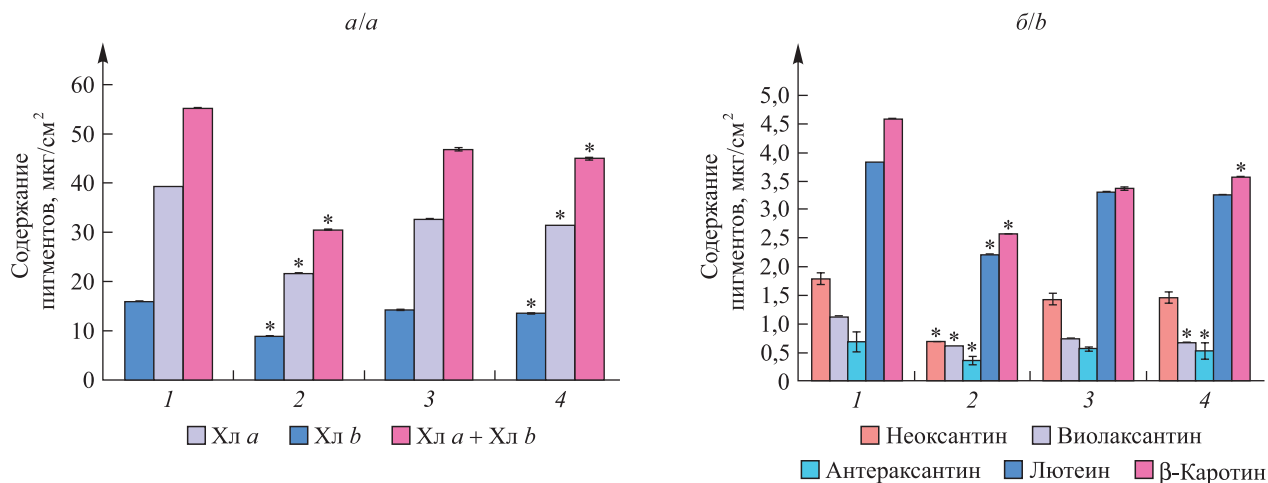


Рис. 1. Влияние интенсивности освещения и инфицирования грибом *F. ox.* на содержание Хл (*a*) и Кар (*б*) в листьях растений огурца: 1 – здоровые растения, выращенные при освещенности 11 000 лк; 2 – инфицированные растения, выращенные при освещенности 11 000 лк; 3 – здоровые растения, выращенные при освещенности 6000 лк; 4 – инфицированные растения, выращенные при освещенности 6000 лк (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с соответствующим контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 1. Effects of light intensity and infection with fungus *Fysarium oxysporum* (*F. ox.*) on content of chlorophylls (*a*) and carotenoids (*b*) in cucumber leaves:

1 – healthy plants grown in light 11 000 lx; 2 – infected plants grown in light 11 000 lx;

3 – healthy plants grown in light 6000 lx; 4 – infected plants grown in light 6000 lx

(asterisk marked the significant differences compared with the corresponding control ($p \leq 0.05$))

Показано, что условия освещения не влияют на потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II (F_v/F_m) и нефотохимическое тушение флуоресценции Хл (qN) в листьях растений огурца (табл. 2). Однако более низкая интенсивность света приводит к падению скорости транспорта электронов ($ETR(II)$) и стимулирует восстановление акцептора электронов Q_A , на что указывает снижение коэффициента фотохимического тушения флуоресценции Хл (qP).

Таблица 2

Параметры ПАМ-флуориметрии в листьях здоровых и инфицированных грибом *F. ox.* растений огурца, выращенных при разной интенсивности света

Table 2

Parameters of PAM fluorimetry in the leaves of healthy and infected with the fungus *F. ox.* cucumber plants grown at different light intensity

Параметры	Освещенность 6000 лк			Освещенность 11 000 лк		
	Контроль	<i>F. ox.</i>	Процент к контролю	Контроль	<i>F. ox.</i>	Процент к контролю
F_v/F_m	0,734 ± 0,011	0,747 ± 0,022	101,8	0,739 ± 0,014	0,753 ± 0,025	102,0
$ETR(II)$	13,900 ± 0,280	12,200 ± 0,240*	87,7	15,700 ± 0,320	14,400 ± 0,350	91,7
$Y(II)$	0,252 ± 0,005	0,258 ± 0,008	102,3	0,289 ± 0,004	0,262 ± 0,007	90,6
qP	0,388 ± 0,009	0,370 ± 0,013	95,4	0,444 ± 0,012	0,396 ± 0,011*	89,2
qN	0,431 ± 0,015	0,476 ± 0,007	110,4	0,423 ± 0,011	0,479 ± 0,010*	113,2
qL	0,181 ± 0,009	0,148 ± 0,008	81,8	0,221 ± 0,006	0,170 ± 0,009*	76,9

* Достоверные различия по сравнению с соответствующим контролем ($p \leq 0,05$).

Инфицирование растений огурца грибом *F. ox.* в условиях повышенной освещенности (11 000 лк) не оказывало влияния на потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II (F_v/F_m). Но при этом наблюдалось ингибирующее действие грибного заражения на скорость транспорта электронов (ETR(II)) и коэффициент фотохимического тушения флуоресценции Хл (qP) в листьях растений огурца, выращенных при повышенной освещенности. Схожая тенденция изменения основных характеристик индукции флуоресценции ФС II в хлоропластах растений огурца при инфицировании грибом *F. ox.* отмечена и для образцов, выращенных при более низкой освещенности (6000 лк). Таким образом, в зараженных растениях огурца фотохимическая активность ФС II снижалась незначительно (независимо от уровня освещенности и содержания фотосинтетических пигментов).

Следующая серия экспериментов была проведена на растениях огурца, сформированных при LED-освещении различного спектрального состава (БС, КС и ДКС), а затем инфицированных грибом *F. ox.* Установлено, что в здоровых листьях при освещении КС и ДКС содержание Хл и Кар в пересчете на сухую массу листа было увеличено (на 15 и 60 % соответственно) по сравнению с их содержанием в растениях, выращенных на БС. Влияние грибного заражения в условиях БС выразилось в увеличении общего содержания Хл (Хл a + Хл b), фракции Хл a и отношения Хл a / Хл b на 14–16 % по сравнению с аналогичными показателями для необработанных листьев (рис. 2). На КС заражение грибом стимулировало накопление всех фракций фотосинтетических пигментов (количество Хл a выросло на 18 %, Хл b – на 12 %, Кар – на 16 %) по сравнению с контролем при постоянном отношении Хл a / Хл b и (Хл a + Хл b) / Кар. Заражение на ДКС приводило к снижению содержания хлорофилльных пигментов, их фракций и Кар на 22–25 % по отношению к уровню здоровых растений.

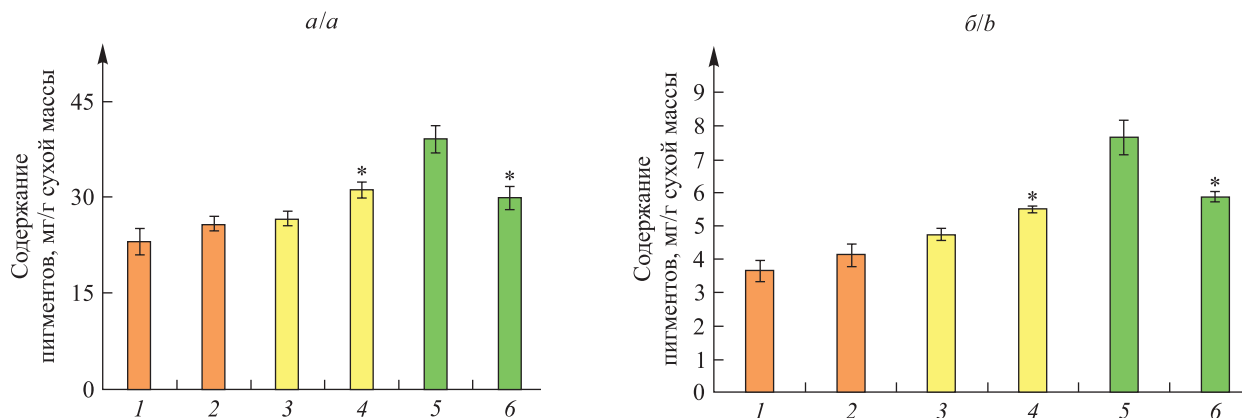


Рис. 2. Изменение общего содержания Хл (a) и Кар (b) в листьях здоровых и зараженных грибом *F. ox.* растений огурца, выращенных на свету разного спектрального состава: 1 – БС (контроль); 2 – БС + *F. ox.*; 3 – КС (контроль); 4 – КС + *F. ox.*; 5 – ДКС (контроль); 6 – ДКС + *F. ox.* (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с соответствующим контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 2. Changes in the total content of chlorophylls (a) and carotenoids (b) in the leaves of healthy and infected with the fungus *F. ox.* cucumber plants which grown under different light spectra:

1 – white light (control); 2 – white light + *F. ox.*; 3 – red light (control); 4 – red light + *F. ox.*; 5 – far red light (control); 6 – far red light + *F. ox.*

(asterisk marked the significant differences compared with the corresponding control ($p \leq 0.05$))

Методом РАМ-флуориметрии в здоровых листьях растений огурца установлено значительное увеличение скорости транспорта электронов в ФС II (ETR(II)) при LED-освещении (на 85 % при выращивании на КС и на 45 % при выращивании на ДКС) по сравнению с ETR(II) на БС (рис. 3, a). Для ФС I этот параметр достоверно увеличивался только у растений, выращенных на КС (на 47 %) (рис. 3, b), а при выращивании на ДКС он практически не отличался от ETR(II) на БС. Зарегистрировано существенное увеличение коэффициента фотохимического тушения флуоресценции Хл (qP) ФС II (на 74 % при выращивании на КС и на 46 % при выращивании на ДКС) по сравнению с qP на БС (табл. 3), что свидетельствует об усилении активности ФС II не только за счет функционирования электронтранспортной цепи, но и за счет улучшения светосбора. Показатели потенциального квантового выхода фотохимических реакций ФС II (F_v/F_m) в контрольных растениях, выращенных на БС, КС и ДКС, существенно не отличались (см. табл. 3).

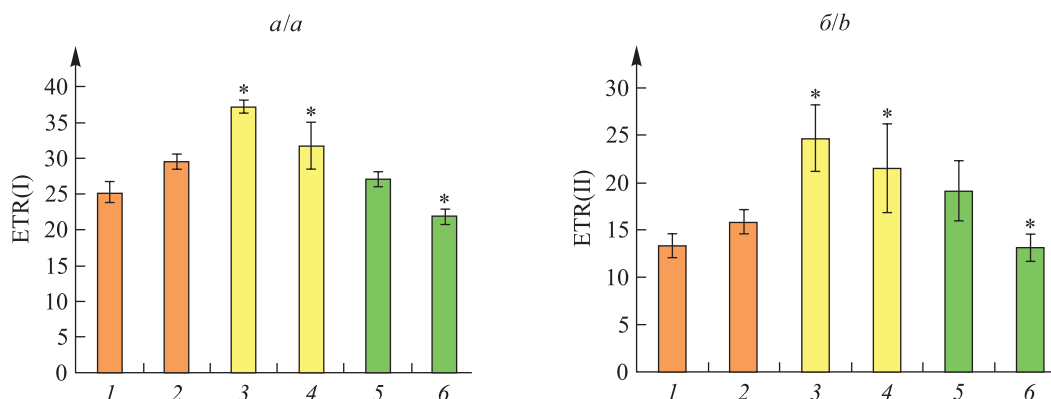


Рис. 3. Эффективность функционирования электронтранспортной цепи ФС I (а) и ФС II (б) в листьях растений огурца, выращенных на свету разного спектрального состава, до и после инфицирования грибом *F. ox.*

Fig. 3. The efficiency of functioning of the electron transport chain of photosystem I (a) and photosystem II (b) in cucumber leaves which grown under different light spectra, before and after infection with fungus *F. ox.*

Таблица 3

Абсолютные и относительные значения параметров ПАМ-флуориметрии ФС II в листьях растений огурца, выращенных на БС, КС и ДКС, до и после инфицирования грибом *F. ox.*

Table 3

Absolute and relative values of PAM fluorimetry parameters of photosystem II in cucumber leaves grown on white light, red light and far red light before and after infection with fungus *F. ox.*

Параметры	Вариант эксперимента					
	БС (контроль)	БС + <i>F. ox.</i>	КС (контроль)	КС + <i>F. ox.</i>	ДКС (контроль)	ДКС + <i>F. ox.</i>
F_m	$4,687 \pm 0,031$ 100,0**	$4,098 \pm 0,001^*$ 87,4**	$5,436 \pm 0,241$ 100,0**	$5,277 \pm 0,249$ 97,1**	$5,127 \pm 0,323$ 100,0**	$5,346 \pm 0,100$ 104,3**
F_v/F_m	$0,775 \pm 0,009$ 100,0**	$0,783 \pm 0,003$ 101,0**	$0,802 \pm 0,006$ 100,0**	$0,797 \pm 0,005$ 99,3**	$0,793 \pm 0,007$ 100,0**	$0,788 \pm 0,001$ 99,4**
ETR(II)	$13,300 \pm 1,270$ 100,0**	$15,870 \pm 1,287$ 119,3**	$24,720 \pm 3,530$ 100,0**	$21,520 \pm 4,670^*$ 87,1**	$19,120 \pm 3,140$ 100,0**	$13,150 \pm 1,410^*$ 68,8**
$Y(II)$	$0,242 \pm 0,023$ 100,0**	$0,288 \pm 0,023$ 119,0**	$0,450 \pm 0,064$ 100,0**	$0,392 \pm 0,085^*$ 87,1**	$0,348 \pm 0,057$ 100,0**	$0,239 \pm 0,026^*$ 68,6**
$Y(NO)$	$0,530 \pm 0,003$ 100,0**	$0,484 \pm 0,011$ 91,3**	$0,415 \pm 0,040$ 100,0**	$0,405 \pm 0,054$ 97,6**	$0,383 \pm 0,042$ 100,0**	$0,442 \pm 0,020$ 115,4**
$Y(NPQ)$	$0,228 \pm 0,020$ 100,0**	$0,228 \pm 0,012$ 100,0**	$0,136 \pm 0,024$ 100,0**	$0,204 \pm 0,030$ 150,0**	$0,269 \pm 0,020$ 100,0**	$0,319 \pm 0,006$ 118,6**
NPQ	$0,431 \pm 0,036$ 100,0**	$0,470 \pm 0,014$ 109,0**	$0,320 \pm 0,028$ 100,0**	$0,500 \pm 0,008$ 156,2**	$0,701 \pm 0,045$ 100,0**	$0,734 \pm 0,016$ 104,7**
qP	$0,341 \pm 0,025$ 100,0**	$0,406 \pm 0,030$ 119,6**	$0,593 \pm 0,076$ 100,0**	$0,538 \pm 0,112$ 90,7**	$0,499 \pm 0,078$ 100,0**	$0,350 \pm 0,039^*$ 70,1**
qN	$0,361 \pm 0,023$ 100,0**	$0,383 \pm 0,008$ 106,1**	$0,287 \pm 0,020$ 100,0**	$0,395 \pm 0,005$ 137,6**	$0,487 \pm 0,020$ 100,0**	$0,499 \pm 0,006$ 102,5**
qL	$0,131 \pm 0,007$ 100,0**	$0,166 \pm 0,014$ 126,7**	$0,280 \pm 0,055$ 100,0**	$0,274 \pm 0,083$ 97,9**	$0,243 \pm 0,052$ 100,0**	$0,152 \pm 0,021^*$ 62,6**

* Достоверные различия по сравнению с соответствующим контролем ($p \leq 0,05$).

** Относительные значения параметров в процентах.

Заражение грибом *F. ox.* приводит к снижению как эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС II ($Y(II)$), так и скорости транспорта электронов (ETR(II)) в листьях растений, выращенных на КС и ДКС, на 13 и 30 % соответственно по отношению к показателям у здоровых растений (см. табл. 3). В литературе уменьшение эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС II, а также скорости транспорта электронов в ФС II связывают с увеличением Q_B -невосстанавливающих реакционных центров ФС II [29]. Особенно четко снижение эффективности функционирования ФС II видно при анализе световых кривых, демонстрирующих зависимость ETR(II) от интенсивности актиничного света (фотосинтетически активного излучения (PAR)) (рис. 4). Так, при низкой интенсивности актиничного света уменьшение ETR(II) для листьев, выросших на КС, после грибного заражения составляет 7–9 %, а при высокой интенсивности достигает 15 %. При выращивании растений огурца на ДКС описанные различия становятся еще больше: в случае фотосинтетически активного излучения 11 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с снижение скорости транспорта электронов в ФС II при фузариозе составляет 5–6 %, а в случае фотосинтетически активного излучения 221 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с достигает 27 % (см. рис. 4). Возможной причиной снижения скорости транспорта электронов и эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС II под действием гриба *F. ox.* на КС и ДКС могут быть изменения, происходящие в белковых комплексах реакционного центра ФС II, так как параметры ETR(II) и $Y(II)$ не связаны с активацией дополнительных диссипационных механизмов. Косвенным доказательством высказанного предположения является то обстоятельство, что в данных опытах показатели тушения флуоресценции qP и qN и квантовые выходы нерегулируемой ($Y(NO)$) диссипации энергии в ФС II изменялись незначительно.

Фотосинтетический аппарат растений, воспринимая изменения интенсивности и спектрального состава света через свои пигменты (Хл и Кар), может выступать в качестве сайта, где запускается такой сигнальный механизм, как фотосинтетическая адаптация к условиям освещения [30], включающая нефотохимическое тушение флуоресценции Хл. Механизм нефотохимического тушения флуоресценции Хл является наиболее быстрым ответом, позволяющим минимизировать генерацию активных форм кислорода при избытке световой энергии.

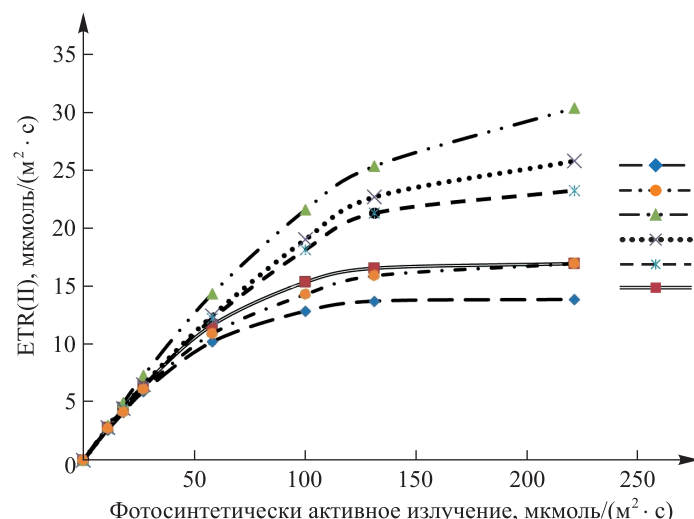


Рис. 4. Зависимость эффективности переноса электронов в ФС II от интенсивности актиничного света в листьях растений огурца, выращенных на БС, КС и ДКС, до и после инфицирования грибом *F. ox.*: 1 – БС (контроль); 2 – БС + *F. ox.*; 3 – КС (контроль); 4 – КС + *F. ox.*; 5 – ДКС (контроль); 6 – ДКС + *F. ox.*

Fig. 4. The dependence of the electron transfer efficiency in photosystem II on the intensity of actinic light for cucumber leaves grown on white light, red light and far red light before and after infection with fungus *F. ox.*: 1 – white light (control); 2 – white light + *F. ox.*; 3 – red light (control); 4 – red light + *F. ox.*; 5 – far red light (control); 6 – far red light + *F. ox.*

С нефотохимическим тушением флуоресценции Хл связаны четыре параметра индукции флуоресценции Хл – qN , NPQ, $Y(NPQ)$ и $Y(NO)$. Для того чтобы определить вклады в утилизацию световой энергии регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции Хл, характеризующего адаптацию фотосинтетического аппарата к избыточному количеству энергии, и нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции Хл, связанного с неадаптационной диссипацией световой энергии, были рассчитаны соответствующие квантовые выходы $Y(NPQ)$ и $Y(NO)$. Обращает на себя внимание

значительный рост (на 40–56 %) трех из четырех параметров нефотохимического тушения флуоресценции Хл (qN , NPQ, $Y(NPQ)$) относительно контрольных значений в листьях растений огурца, выращенных на КС, после заражения грибом *F. ox.* (см. табл. 3).

Описанное выше снижение активности ФС II (параметров ETR(II) и $Y(II)$) после фузариозной инвазии, учитывая большие значения показателя нефотохимического тушения флуоресценции Хл в условиях LED-освещения с преобладанием КС, может быть связано со стрессовым воздействием. Значения квантовых выходов регулируемого и нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции Хл позволяют утверждать, что избыточная световая энергия эффективно утилизируется адаптационным механизмом нефотохимического тушения флуоресценции Хл в варианте «КС + *F. ox.*», в то время как в вариантах «БС + *F. ox.*» и «ДКС + *F. ox.*» данный механизм оказывается недостаточно эффективным.

Измерение поглощения пигмента Р700 с помощью метода импульсно-модулированной флуоресцентной спектроскопии дает сходную информацию о ФС I (состояние донорной и акцепторной сторон, квантовые выходы и т. д.). Изменения по сравнению с контролем зарегистрированы для параметра P_m , характеризующего максимальную флуоресценцию пигмента Р700: в листьях растений огурца, выращенных на БС, после заражения патогеном он снизился на 20 % (табл. 4). Для растений огурца, выращенных на КС и ДКС, уровни максимальной флуоресценции пигмента Р700 в здоровых и инфицированных листьях не различались. Полученные результаты свидетельствуют о большей редукции комплексов ФС I по сравнению с редукцией комплексов ФС II под действием гриба *F. ox.* только в растениях, выращенных на БС [31].

Также выявлены различия в квантовых выходах нефотохимического тушения флуоресценции Хл ФС I в листьях растений огурца, выращенных на свету разного спектрального состава. Как известно, параметр $Y(ND)$ является мерой диссипации энергии на донорной, а параметр $Y(NA)$ – на акцепторной стороне ФС I [25]. Изучение квантовых выходов фотохимических реакций ФС I в инфицированных листьях показало уменьшение параметра $Y(NA)$ на акцепторной стороне ФС I растений, выращенных на ДКС (на 13 %) и соответствующее увеличение параметра $Y(ND)$, указывающего на более высокое редокс-состояние ФС I на донорной стороне (см. рис. 3, б). При выращивании на КС грибное заражение стимулировало фотохимические реакции ФС I как на донорной, так и на акцепторной стороне данной фотосистемы. При этом значения эффективного квантового выхода ($Y(I)$) и скорости транспорта электронов (ETR(I)) были снижены на 20 % как на КС, так и на ДКС. Увеличение параметра $Y(ND)$ свидетельствует о повреждении на участке ФС II для растений, выращенных на ДКС, а уменьшение параметра $Y(NA)$ может быть следствием активации цикла Кальвина в таких листьях растений огурца [24].

Таблица 4

Абсолютные и относительные значения параметров индукции флуоресценции Хл ФС I в листьях растений огурца, выращенных на БС, КС и ДКС, до и после инфицирования грибом *F. ox.*

Table 4

Absolute and relative values of parameters of fluorescence induction of chlorophyll of photosystem I in cucumber leaves grown on white light, red light and far red light before and after infection with fungus *F. ox.*

Параметры	Вариант эксперимента					
	БС (контроль)	БС + <i>F. ox.</i>	КС (контроль)	КС + <i>F. ox.</i>	ДКС (контроль)	ДКС + <i>F. ox.</i>
P_m	2,050 ± 0,080 100,0**	1,640 ± 0,010* 79,8**	1,790 ± 0,050 100,0**	1,870 ± 0,140 104,1**	1,500 ± 0,070 100,0**	1,500 ± 0,070 99,7**
ETR(I)	25,250 ± 1,450 100,0**	29,520 ± 1,050 116,9**	37,170 ± 0,920 100,0**	31,720 ± 3,260* 85,4**	27,000 ± 1,060 100,0**	21,800 ± 1,060* 80,7**
$Y(I)$	0,459 ± 0,026 100,0**	0,537 ± 0,019 116,9**	0,676 ± 0,017 100,0**	0,577 ± 0,060* 85,3**	0,491 ± 0,019 100,0**	0,397 ± 0,019* 80,8**
$Y(ND)$	0,358 ± 0,021 100,0**	0,285 ± 0,002* 79,6**	0,208 ± 0,017 100,0**	0,261 ± 0,011 125,5**	0,321 ± 0,022 100,0**	0,441 ± 0,053* 137,3**
$Y(NA)$	0,183 ± 0,006 100,0**	0,178 ± 0,018 97,2**	0,117 ± 0,002 100,0**	0,162 ± 0,050* 138,4**	0,188 ± 0,041 100,0**	0,163 ± 0,053 86,7**

* Достоверные различия по сравнению с соответствующим контролем ($p \leq 0,05$).

** Относительные значения параметров в процентах.

Таким образом, установлено, что инфицирование грибом *F. ox.* растений огурца, выращенных на БС, в течение 3 сут не вызывает значимых изменений параметров функционирования ФС II. При этом отмечена небольшая редукция комплексов ФС I. Значения параметров $Y(I)$ и $ETR(I)$ у таких растений были на 15 % выше, чем у здоровых растений.

Для растений, выращенных на КС и ДКС, грибное заражение приводило к снижению большинства параметров функционирования ФС I и ФС II. Интересно отметить уменьшение эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС II, скорости транспорта электронов в ФС II, а также доли открытых реакционных центров (qL), особенно в варианте «ДКС + *F. ox.*». Значения коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции Хл (qN) и квантового выхода регулируемой диссипации ($Y(NPQ)$) были увеличены почти в 1,5 раза.

Заключение

Проведенные исследования показали, что количество Хл и Кар в хлоропластах, сформированных при пониженной освещенности, возрастало через 72 ч после инфицирования грибом *F. ox.*, тогда как при повышенной освещенности наблюдалось существенное усиление катаболизма пигментов. При фузариозе в условиях изученного светового диапазона не был задействован виолаксантиновый цикл, а фотохимическая активность хлоропластов мало зависела от уровня освещенности. У здоровых растений, выращенных при LED-освещении с различным соотношением физиологически значимых диапазонов спектрального состава (КС и ДКС), отмечено повышение содержания Хл и Кар в пересчете на сухую массу листа по сравнению с таковым в растениях, выращенных на БС. Заражение на БС и КС вызывало увеличение общего содержания пигментов относительно их уровня в здоровых растениях, а заражение на ДКС приводило к сокращению пигментного фонда.

Анализ структурно-функционального состояния ФС I и ФС II у здоровых листьев растений огурца, выращенных при LED-освещении, показал повышение активности ФС I и ФС II по сравнению с их активностью у растений, выращенных на БС, особенно четко проявившееся на световых кривых. На КС более эффективно функционируют ФС I и ФС II, о чем свидетельствуют усиление транспорта электронов и улучшение эффективности светосбора. При выращивании на ДКС это характерно только для ФС II. Таким образом, на листьях растений огурца экспериментально подтверждено имеющееся в литературе мнение о том, что монохроматический свет (красный) усиливает защитные функции растений, возможно, через активацию путей передачи сигналов фитогормонов [32].

Установлено, что инфицирование грибом *F. ox.* растений огурца, выращенных на БС, не приводит к значимым изменениям параметров функционирования ФС II и вызывает лишь небольшую редукцию комплексов ФС I. Снижение активности ФС II (параметров $ETR(II)$ и $Y(II)$) после фузариозной инвазии может быть связано со стрессовым воздействием, которое проявляется в увеличении коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции Хл в условиях LED-освещения с преобладанием КС. При выращивании на КС гриб стимулировал фотохимические реакции ФС I как на донорной, так и на акцепторной стороне этой фотосистемы, а при выращивании на ДКС – только на донорной стороне. Абсолютные показатели транспорта электронов в ФС I и ФС II в вариантах «КС (контроль)» и «КС + *F. ox.*» достоверно выше, чем в вариантах «БС (контроль)» и «БС + *F. ox.*». Значения квантовых выходов регулируемого и нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции Хл позволяют утверждать, что избыточная световая энергия эффективно утилизируется адаптационным механизмом нефотохимического тушения флуоресценции Хл в варианте «КС + *F. ox.*», в то время как в вариантах «БС + *F. ox.*» и «ДКС + *F. ox.*» данный механизм оказывается недостаточно эффективным. Фузариозное увядание приводит к снижению фотохимической активности ФС I и сопряженного с ней транспорта электронов (на 20 %) в хлоропластах растений, выращенных на КС и ДКС. Также отмечено снижение функциональной эффективности ФС II, скорее всего, за счет необратимых изменений пигмент-белковых комплексов при обоих видах LED-освещения. Таким образом, выявленные изменения фотохимической активности ФС I и ФС II наиболее ярко проявляются в инфицированных листьях растений огурца, выращенных на КС.

В целом полученные результаты свидетельствуют о различных механизмах формирования фотосинтетических мембран растений огурца, выращенных при разной интенсивности БС, а также при LED-освещении с разным соотношением физиологически значимых диапазонов спектрального состава (КС и ДКС). Используемое в работе LED-освещение с повышенной долей КС (КС/СС = 4,0, КС/ДКС = 5,0) положительно отразилось на функционировании обеих фотосистем и пигментном аппарате растений огурца. Последующее инфицирование грибным патогеном *F. ox.* приводит в основном к нарушению процессов формирования фотосинтетических мембран хлоропластов. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методики повышения иммунитета растений огурца на основе световой регуляции защитных реакций в фотосинтезирующих тканях.

Библиографические ссылки

1. Arsovski AA, Galstyan A, Guseman JM, Nemhauser JL. Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*. 2012;10:e0147. DOI: 10.1199/tab.0147.
2. Pham Vinh Ngoc, Xu Xiaosa, Huq Enamul. Molecular bases for the constitutive photomorphogenic phenotypes in *Arabidopsis*. *Development*. 2018;145(23):dev169870. DOI: 10.1242/dev.169870.
3. Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*. 2014;7(8):1267–1287. DOI: 10.1093/mp/ssu049.
4. Casal JJ, Balasubramanian S. Thermomorphogenesis. *Annual Review of Plant Biology*. 2019;70:321–346. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-095919.
5. Sowden RG, Watson SJ, Jarvis P. The role of chloroplasts in plant pathology. *Essays in Biochemistry*. 2018;62(1):21–39. DOI: 10.1042/EBC20170020.
6. Genoud T, Buchala AJ, Chua N-H, Métraux J-P. Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2002;31(1):87–95. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01338.x.
7. Wang Hai, Wu Guangxia, Zhao Binbin, Wang Baobao, Lang Zhihong, Zhang Chunyi, et al. Regulatory modules controlling early shade avoidance response in maize seedlings. *BMC Genomics*. 2016;17:269. DOI: 10.1186/s12864-016-2593-6.
8. Griebel T, Zeier J. Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiology*. 2008;147(2):790–801. DOI: 10.1104/pp.108.119503.
9. de Wit M, Spoel SH, Sanchez-Perez GF, Gommers CMM, Pieterse CMJ, Voesenek LACJ, et al. Perception of low red : far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2013;75(1):90–103. DOI: 10.1111/tpj.12203.
10. Ballaré CL. Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology*. 2014;65:335–363. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040145.
11. Cerrudo I, Caliri-Ortiz ME, Keller MM, Degano ME, Demkura PV, Ballaré CL. Exploring growth-defence trade-offs in *Arabidopsis*: phytochrome B inactivation requires JAZ10 to suppress plant immunity but not to trigger shade-avoidance responses. *Plant, Cell & Environment*. 2017;40(5):635–644. DOI: 10.1111/pce.12877.
12. Fernández-Milmanda GL, Crocco CD, Reichelt M, Mazza CA, Köllner TG, Zhang T, et al. A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants. *Nature Plants*. 2020;6(3):223–230. DOI: 10.1038/s41477-020-0604-8.
13. Roden LC, Ingle RA. Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant – pathogen interactions. *The Plant Cell*. 2009;21(9):2546–2552. DOI: 10.1105/tpc.109.069922.
14. Hou Xingliang, Lee Li Yen Candy, Xia Kuaifei, Yan Yuanyuan, Yu Hao. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental Cell*. 2010;19(6):884–894. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.10.024.
15. Pierik R, Ballaré CL. Control of plant growth and defense by photoreceptors: from mechanisms to opportunities in agriculture. *Molecular Plant*. 2021;14(1):61–76. DOI: 10.1016/j.molp.2020.11.021.
16. Courbier S, Grevink S, Sluijs E, Bonhomme P-O, Kajala K, Van Wees SCM, et al. Far-red light promotes *Botrytis cinerea* disease development in tomato leaves via jasmonate-dependent modulation of soluble sugars. *Plant, Cell & Environment*. 2020;43(11):2769–2781. DOI: 10.1111/pce.13870.
17. Закурин АО, Щенникова АВ, Камионская АМ. Светокультура растениеводства защищенного грунта: фотосинтез, фотоморфогенез и перспективы применения светодиодов. *Физиология растений*. 2020;67(3):246–258. DOI: 10.31857/S0015330320030227.
18. Куделина ТН, Кривобок АС, Бибикина ТН, Молчан ОВ. Особенности фотоморфогенеза *Arabidopsis thaliana* в условиях LED-освещения различного спектрального состава. *Весті Національної академії наук України. Серія біологічних наук*. 2021;66(1):42–52. DOI: 10.29235/1029-8940-2021-66-1-42-52.
19. Naznin MT, Lefsrud M, Gravel V, Azad MOK. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. *Plants*. 2019;8(4):93. DOI: 10.3390/plants8040093.
20. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (HarvestPlus technical monograph; 2).
21. Шлык АА. Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. В: Павлинова ОА, редактор. *Биохимические методы в физиологии растений*. Москва: Наука; 1971. с. 154–170.
22. Krause GH, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1991;42:313–349. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.001525.
23. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*. 2004;79(2):209–218. DOI: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d.
24. Makarenko MS, Kozel NV, Usatov AV, Gorbachenko OF, Averina NG. A state of PSI and PSII photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant. *Online Journal of Biological Sciences*. 2016;16(4):193–198. DOI: 10.3844/ojbsci.2016.193.198.
25. Klughammer C, Schreiber U. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+–absorbance changes at 830 nm. *Planta*. 1994;192(2):261–268. DOI: 10.1007/BF01089043.
26. Маслова ТГ, Марковская ЕФ. Современные представления о функционировании виолаксантинового цикла (развитие идей Д. И. Сапожниковой). *Физиология растений*. 2012;59(3):472–480.
27. Gilmore AM, Yamamoto HY. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C_{18} high-performance liquid chromatographic column. *Journal of Chromatography A*. 1991;543:137–145. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95762-0.
28. Гольцев ВН, Каладжи ХМ, Паунов М, Баба В, Хорачек Т, Мойски Я и др. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений. *Физиология растений*. 2016;63(6):881–907. DOI: 10.7868/S0015330316050055.
29. Petsas A, Grammatikopoulos G. Drought resistance and recovery of photosystem II activity in a Mediterranean semi-deciduous shrub at the seedling stage. *Photosynthetica*. 2009;47(2):284–292. DOI: 10.1007/s11099-009-0044-1.
30. Dietzel L, Bräutigam K, Pfannschmidt T. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry – functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *The FEBS Journal*. 2008;275(6):1080–1088. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06264.x.

31. Huang Wei, Zhang Shi-Bao, Cao Kun-Fang. Stimulation of cyclic electron flow during recovery after chilling-induced photoinhibition of PSII. *Plant and Cell Physiology*. 2010;51(11):1922–1928. DOI: 10.1093/pcp/pcq144.
32. Wang D, Dawadi B, Qu J, Ye J. Light-engineering technology for enhancing plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*. 2022;12:805614. DOI: 10.3389/fpls.2021.805614.

References

1. Arsovski AA, Galstyan A, Guseman JM, Nemhauser JL. Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*. 2012;10:e0147. DOI: 10.1199/tab.0147.
2. Pham Vinh Ngoc, Xu Xiaosa, Huq Enamul. Molecular bases for the constitutive photomorphogenic phenotypes in *Arabidopsis*. *Development*. 2018;145(23):dev169870. DOI: 10.1242/dev.169870.
3. Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*. 2014;7(8):1267–1287. DOI: 10.1093/mp/ssu049.
4. Casal JJ, Balasubramanian S. Thermomorphogenesis. *Annual Review of Plant Biology*. 2019;70:321–346. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-095919.
5. Sowden RG, Watson SJ, Jarvis P. The role of chloroplasts in plant pathology. *Essays in Biochemistry*. 2018;62(1):21–39. DOI: 10.1042/EBC20170020.
6. Genoud T, Buchala AJ, Chua N-H, Métraux J-P. Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2002;31(1):87–95. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01338.x.
7. Wang Hai, Wu Guangxia, Zhao Binbin, Wang Baobao, Lang Zhihong, Zhang Chunyi, et al. Regulatory modules controlling early shade avoidance response in maize seedlings. *BMC Genomics*. 2016;17:269. DOI: 10.1186/s12864-016-2593-6.
8. Griebel T, Zeier J. Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiology*. 2008;147(2):790–801. DOI: 10.1104/pp.108.119503.
9. de Wit M, Spoel SH, Sanchez-Perez GF, Gommers CMM, Pieterse CMJ, Voesenek LACJ, et al. Perception of low red : far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2013;75(1):90–103. DOI: 10.1111/tpj.12203.
10. Ballaré CL. Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology*. 2014;65:335–363. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040145.
11. Cerrudo I, Caliri-Ortiz ME, Keller MM, Degano ME, Demkura PV, Ballaré CL. Exploring growth-defence trade-offs in *Arabidopsis*: phytochrome B inactivation requires JAZ10 to suppress plant immunity but not to trigger shade-avoidance responses. *Plant, Cell & Environment*. 2017;40(5):635–644. DOI: 10.1111/pce.12877.
12. Fernández-Milmanda GL, Crocco CD, Reichelt M, Mazza CA, Köllner TG, Zhang T, et al. A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants. *Nature Plants*. 2020;6(3):223–230. DOI: 10.1038/s41477-020-0604-8.
13. Roden LC, Ingle RA. Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant – pathogen interactions. *The Plant Cell*. 2009;21(9):2546–2552. DOI: 10.1105/tpc.109.069922.
14. Hou Xingliang, Lee Li Yen Candy, Xia Kuaifei, Yan Yuanyuan, Yu Hao. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental Cell*. 2010;19(6):884–894. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.10.024.
15. Pierik R, Ballaré CL. Control of plant growth and defense by photoreceptors: from mechanisms to opportunities in agriculture. *Molecular Plant*. 2021;14(1):61–76. DOI: 10.1016/j.molp.2020.11.021.
16. Courbier S, Grevink S, Sluijs E, Bonhomme P-O, Kajala K, Van Wees SCM, et al. Far-red light promotes *Botrytis cinerea* disease development in tomato leaves via jasmonate-dependent modulation of soluble sugars. *Plant, Cell & Environment*. 2020;43(11):2769–2781. DOI: 10.1111/pce.13870.
17. Zakurin AO, Shchennikova AV, Kamionskaya AM. [Light culture of protected soil crop production: photosynthesis, photomorphogenesis and prospects for the use of LEDs]. *Fiziologiya rastenii*. 2020;67(3):246–258. Russian. DOI: 10.31857/S0015330320030227.
18. Kudelina TN, Krivobok AS, Bibikova TN, Molchan OV. Features of *Arabidopsis thaliana* photomorphogenesis when using LED lighting with different spectral composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2021;66(1):42–52. Russian. DOI: 10.29235/1029-8940-2021-66-1-42-52.
19. Naznin MT, Lefsrud M, Gravel V, Azad MOK. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. *Plants*. 2019;8(4):93. DOI: 10.3390/plants8040093.
20. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (HarvestPlus technical monograph; 2).
21. Shlyk AA. [Determination of chlorophyll and carotenoids in extracts of green leaves]. In: Pavlinova OA, editor. *Biokhicheskie metody v fiziologii rastenii* [Biochemical methods in plant physiology]. Moscow: Nauka; 1971. p. 154–170. Russian.
22. Krause GH, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1991;42:313–349. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.001525.
23. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*. 2004;79(2):209–218. DOI: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d.
24. Makarenko MS, Kozel NV, Usatov AV, Gorbachenko OF, Averina NG. A state of PSI and PSII photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant. *Online Journal of Biological Sciences*. 2016;16(4):193–198. DOI: 10.3844/ojbsci.2016.193.198.
25. Klughammer C, Schreiber U. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+ absorbance changes at 830 nm. *Planta*. 1994;192(2):261–268. DOI: 10.1007/BF01089043.
26. Maslova TG, Markovskaya EF. [Modern ideas about the functioning of the violaxanthin cycle (development of D. I. Sapozhnikov's ideas)]. *Fiziologiya rastenii*. 2012;59(3):472–480. Russian.
27. Gilmore AM, Yamamoto HY. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C₁₈ high-performance liquid chromatographic column. *Journal of Chromatography A*. 1991;543:137–145. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95762-0.
28. Goltsev VN, Kalaji HM, Paunov M, Baba V, Khorachek T, Moiski Ya, et al. [The use of variable chlorophyll fluorescence to assess the physiological state of the photosynthetic apparatus of plants]. *Fiziologiya rastenii*. 2016;63(6):881–907. Russian. DOI: 10.7868/S0015330316050055.

29. Petsas A, Grammatikopoulos G. Drought resistance and recovery of photosystem II activity in a Mediterranean semi-deciduous shrub at the seedling stage. *Photosynthetica*. 2009;47(2):284–292. DOI: 10.1007/s11099-009-0044-1.

30. Dietzel L, Bräutigam K, Pfannschmidt T. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry – functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *The FEBS Journal*. 2008;275(6):1080–1088. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06264.x.

31. Huang Wei, Zhang Shi-Bao, Cao Kun-Fang. Stimulation of cyclic electron flow during recovery after chilling-induced photoinhibition of PSII. *Plant and Cell Physiology*. 2010;51(11):1922–1928. DOI: 10.1093/pcp/pcq144.

32. Wang D, Dawadi B, Qu J, Ye J. Light-engineering technology for enhancing plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*. 2022;12:805614. DOI: 10.3389/fpls.2021.805614.

Получена 06.07.2022 / исправлена 08.09.2022 / принята 12.09.2022.

Received 06.07.2022 / revised 08.09.2022 / accepted 12.09.2022.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 631.523

ПРИМЕНЕНИЕ SCoT-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РОССИЙСКИХ СОРТОВ ОВСЯНИЦЫ И ФЕСТУОЛИУМА

Ю. М. МАВЛЮТОВ¹⁾, В. Л. КОРОВИНА¹⁾, И. А. КЛИМЕНКО¹⁾

¹⁾Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В. Р. Вильямса,
Научный городок, корп. 1, 141055, г. Лобня, Московская область, Россия

Необходимым условием повышения эффективности селекционного процесса кормовых злаковых трав является комплексная оценка исходного материала, в том числе с помощью современных ДНК-технологий. Цель исследования состояла в изучении эффективности использования системы SCoT-маркеров, основанных на ПЦР, при анализе межвидовой и межсортовой генетической изменчивости овсяницы (*Festuca*) и фестуолиума (*Festulolium* F. Aschers. et Graebn.). Проведено генотипирование 13 сортов российской селекции с применением 25 SCoT-маркеров, рекомендованных в литературных источниках в качестве информативных при анализе злаковых культур.

Образец цитирования:

Мавлютов ЮМ, Коровина ВЛ, Клименко ИА. Применение SCoT-маркеров для оценки генетической изменчивости российских сортов овсяницы и фестуолиума. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:53–63.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-53-63>

For citation:

Mavlyutov YuM, Korovina VL, Klimenko IA. The use of SCoT markers for evaluation of the genetic variability of Russian fescue and festulolium varieties. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:53–63. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-53-63>

Авторы:

Юлиан Муратович Мавлютов – научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований кормовых культур.

Валентина Леонидовна Коровина – старший научный сотрудник лаборатории генофонда.

Ирина Александровна Клименко – кандидат сельскохозяйственных наук; старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований кормовых культур.

Authors:

Yulian M. Mavlyutov, researcher at the laboratory of molecular and genetic research of forage crops.

yulian92@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5695-6242>

Valentina L. Korovina, senior researcher at the laboratory of gene pool.

vlkorovina@gmail.com

Irina A. Klimenko, PhD (agricultural sciences); senior researcher and head of the laboratory of molecular and genetic research of forage crops.

iaklimenko@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1850-3859>

Показана высокая эффективность техники SCoT-маркирования как инструмента выявления ДНК-полиморфизма между видами и сортами овсяницы и фестулолиума. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов идентификации и паспортизации сортов, а информация о генетическом сходстве или различии будет полезна при подборе родительских форм для селекционного процесса.

Ключевые слова: овсяница; фестулолиум; генетическое разнообразие; SCoT-маркеры; ДНК-полиморфизм; генотипирование.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания по проекту 0442-2019-0001AAAA-A19-119122590053-0.

THE USE OF SCoT MARKERS FOR EVALUATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF RUSSIAN FESCUE AND FESTULOLIUM VARIETIES

Yu. M. MAVLYUTOV^a, V. L. KOROVINA^a, I. A. KLIMENKO^a

^aFederal Williams Research Center of Forage Production & Agroecology,
Scientific campus, 1 building, Lobnya 141055, Moscow Region, Russia

Corresponding author: Yu. M. Mavlyutov (yulian92@mail.ru)

Forage gramineous grasses are the most important component of the hay lands and pasture agroecosystems. To increase the efficiency of grass breeding the complex evaluation of the initial plant material is necessary, including an application of the current DNA technologies. The aim of this study was to investigate the effectiveness of SCoT markers for PCR-analysis of interspecies and intervarietal genetic variations of Russian fescue (*Festuca*) and festulolium (*Festulolium* F. Aschers. et Graebn.) varieties. Total 13 samples, combined 30 seedlings per variety were genotyped with 25 SCoT markers, indicated as informative for gramineous grasses according to literature sources. The high efficiency of SCoT marking technique as a tool for DNA polymorphism revealing was found for Russian fescue and festulolium species and varieties. The obtained results can be used at the varieties identification and genetic certification as well as for selection the parental forms for the breeding process.

Keywords: fescue; festulolium; genetic diversity; SCoT markers; DNA polymorphism; genotyping.

Acknowledgements. This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation according to the state assignment for the project 0442-2019-0001AAAA-A19-119122590053-0.

Введение

Многолетние кормовые злаковые травы являются важнейшим компонентом сенокосных и пастбищных агроэкосистем. Их используют для заготовки различных видов кормов (как в чистом виде, так и в составе травосмесей), при создании газонов для озеленения сельского и городского ландшафтов, а также при благоустройстве полевых аэродромов и спортивных площадок. Помимо высокой хозяйственной ценности, культурные виды злаковых трав имеют существенное экологическое значение, так как способствуют оздоровлению окружающей среды, обогащают почву органическими веществами, предотвращают эрозионные и деградационные процессы [1].

Наличие у многих ботанических видов злаковых трав большого количества форм и подвидов позволяет адаптировать их к произрастанию в условиях конкретного региона, вывести сорта одного вида, но разного типа использования. Так, для полевого травосеяния предпочтительны тимopheевка луговая, райграс высокий и овсяница тростниковая. В луговодстве чаще используются райграс пастбищный и различные виды овсяницы (красная, луговая, овечья). Главными направлениями селекции многолетних злаковых трав являются увеличение кормовой и семенной продуктивности, повышение зимостойкости и долгодетия растений, создание сортов, устойчивых к болезням [2]. В связи с этим большое значение для кормопроизводства имеют сорта фестулолиума – культуры, полученной методом межродовой гибридизации представителей родов *Lolium* sp. и *Festuca* sp. Основной задачей при создании гибрида было объединение в одном растении нескольких хозяйственно ценных признаков родительских форм – высокого качества корма, свойственного райграсам, и высокой устойчивости к неблагоприятным внешним факторам, характерной для овсяниц [3].

Необходимым условием повышения эффективности селекционного процесса является правильный выбор исходного материала и его оценка по основным фенотипическим признакам, хозяйственным свойствам и особенностям генетической структуры в целях рационального использования в программах по

созданию новых перспективных сортов [4]. Однако анализ генетического разнообразия злаковых трав является сложной задачей вследствие самонесовместимой перекрестноопыляемой природы этих культур, где каждый вид представлен высокогетерогенными популяциями индивидуальных генотипов [5]. В данном случае возможности морфологических или агрономических признаков как маркеров особенно ограничены. При этом высокий уровень полиморфизма, выявляемый с помощью молекулярных маркеров, основанных на ПЦР-анализе, может стать полезным инструментом дифференциации сортов, образцов и гибридов на генетическом уровне [6].

Для изучения генетического разнообразия многолетних злаковых трав успешно используются разные типы молекулярных маркеров. Так, в работе [7] с помощью техник ISSR- и EST-SSR-маркирования исследованы популяции овсяницы тростниковой, что позволило выявить высокий уровень полиморфизма в различных областях генома (86,6 и 90,6 % соответственно), а также установить филогенетические взаимоотношения между анализируемыми образцами. Для аналогичных целей авторы статьи [8] при изучении образцов овсяницы и райграса разных видов использовали SRAP-маркеры, в результате чего обнаружили высокий уровень межвидового ДНК-полиморфизма (до 100 %). Известно об успешном применении AFLP- и STS-маркеров для выявления генетического родства между исследуемыми сортами райграса многолетнего [9]. На основе SSR- и REMAP-анализа оценено генетическое разнообразие коллекции из 96 образцов тимофеевки луговой [10].

В последние годы одной из наиболее эффективных технологий для молекулярно-генетического анализа злаковых трав считается маркерная система SCoT (*start codon targeted polymorphism*) [11]. Метод основан на использовании одиночных праймеров, которые разработаны для амплификации коротких консервативных участков, фланкирующих стартовый кодон ATG в геноме растений. Для данных маркеров характерны высокая воспроизводимость результатов, нацеленность на амплификацию функциональных участков генома и относительно небольшие затраты на проведение анализа.

В настоящей работе SCoT-маркеры применяли для анализа межвидового и межсортного ДНК-полиморфизма российских сортов овсяницы и фестулолиума, чтобы оценить эффективность системы при изучении этих культур и определить направления дальнейшего использования полученных результатов в селекционных программах.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили 8 сортов овсяницы разных видов и 5 сортов фестулолиума, предоставленных центром коллективного пользования «Биологические коллекции кормовых растений» Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии имени В. Р. Вильямса (ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса») (табл. 1).

Таблица 1

Перечень российских сортов овсяницы и фестулолиума
для анализа ДНК-полиморфизма

Table 1

List of Russian fescue and festulolium varieties
for DNA polymorphism analysis

Вид или гибрид	Сорт	Плоидность	Оригинатор
<i>Овсяница</i>			
Овсяница луговая (<i>Festuca pratensis</i> Huds.)	Бинара	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»
	Кварта	2n	
	ВИК-5	2n	
Овсяница красная (<i>F. rubra</i> L.)	Диана	8n	
	Дипа	2n	
	Сигма	6n	
Овсяница тростниковая (<i>F. arundinacea</i> Schreb.)	Лира	6n	Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук
	Серебрянка	6n	

Окончание табл. 1
Ending table 1

Вид или гибрид	Сорт	Плоидность	Оригинатор
<i>Фестулолиум</i>			
× <i>Festulolium</i> F. Aschers. et Graebn.	Аллегро	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса», ООО «Грин Дир»
	Пилигрим	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»
	Фест	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса», ООО «Грин Дир»
	Изумрудный	6n	Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, ЗАО «НПФ “Российские семена”»
	Айвенго	4n	ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»

ДНК для генотипирования выделяли из 7-дневных проростков, формируя выборку по 30 генотипов от каждого сорта (балк-образец) [12]. Использовали лизирующий SDS-буфер с последующей обработкой лизатов осаждающими агентами (ацетат аммония и изопропанол), очисткой полученных фракций РНКазой и промывкой этанолом [13; 14, с. 12]. Концентрацию и качество полученной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, а также на спектрофотометре *Nabi UV/Vis Nano Spectrophotometer* (*MicroDigital Co.*, Корея). Финальная концентрация ДНК-пробы в смеси для ПЦР составляла 30 нг/мкл.

Набор из 25 SCoT-маркеров был определен на основании данных проведенных ранее исследований, где они указаны как информативные для анализа злаковых культур [11; 15–19]. Праймеры к этим маркерам синтезированы компанией *Евроген* (Россия).

Реакционная смесь для ПЦР (конечный объем 20 мкл) содержала 1-кратный буфер *Taq Turbo*, 0,5-кратную смесь dNTP, 0,5 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы, 0,4 мкмоль/л праймера и 30 нг ДНК. С использованием термоциклера *T100* (*Bio-Rad*, США) провели амплификацию фрагментов ДНК при следующих условиях: 3 мин при 94 °C; 1 мин при 94 °C, 1 мин при 50 °C и 1 мин при 72 °C (35 циклов); 5 мин при 72 °C. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,6 % агарозном геле при напряжении 50 В в течение 2 ч, а затем с помощью программного обеспечения *Image Lab* (версия 6.0.1) (*Bio-Rad*) определяли их размеры в сравнении с маркером молекулярного веса 1 kb DNA Ladder (*Евроген*). Воспроизводимость результатов проверяли путем постановки ПЦР в 3-кратной повторности, включая использование в качестве матрицы балк-образцов ДНК, полученных из разных выборок проростков от каждого сорта.

Для вычисления показателей генетического разнообразия по Нею, или ожидаемой гетерозиготности (H_e), эффективного числа аллелей (N_e) и информационного индекса Шеннона (I) применяли программный пакет *GenAlEx* (версия 6.2) [20]. На основе выявленных генетических дистанций между изучаемыми образцами провели кластеризацию методом *neighbour-joining* (NJ) в программе *DARwin* (версия 6.0.21) [21] с оценкой достоверности результатов бутстреп-анализом при использовании 10 000 реплик. Изучение генетической структуры объекта исследования осуществляли с помощью программы *Structure* (версия 2.3.4) [22; 23], где установили значения гипотетических популяций от $K = 1$ до $K = 10$, а также задали 10 000 повторов *burn-in period* и 10 000 итераций MCMC (*Markov chain Monte Carlo*). Для последующего определения оптимального значения кластеров использовали метод Эванно (*Evanno*) [24] в программе *Structure Harvester* [25]. Процент полиморфных локусов (P_1) рассчитывали по формуле

$$P_1 = \frac{F}{P} \cdot 100,$$

где F – общее количество амплифицированных фрагментов; P – количество полиморфных продуктов.

Результаты и их обсуждение

По результатам анализа коллекции российских сортов овсяницы и фестулолиума из 25 испытанных SCoT-маркеров выбрали 19 информативных маркеров, с помощью которых получены отчетливые и воспроизводимые в повторных экспериментах продукты амплификации для всех образцов (табл. 2).

Таблица 2

**Информативные SCoT-маркеры
для анализа сортов овсяницы и фестулолиума**

Table 2

**Informative SCoT markers
for the analysis of fescue and festulolium varieties**

Маркер	Последовательность (5'→3')	Количество ПЦР-продуктов (F)	Уровень полиморфизма (P _i), %
SCoT-02	CAACAATGGCTACCACCC	22	45,45
SCoT-06	CAACAATGGCTACCACGC	21	33,33
SCoT-07	CAACAATGGCTACCACGG	12	33,33
SCoT-08	CAACAATGGCTACCACGT	39	20,51
SCoT-11	AAGCAATGGCTACCACCA	10	10,00
SCoT-13	ACGACATGGCGACCATCG	19	42,11
SCoT-15	ACGACATGGCGACCGCGA	18	16,67
SCoT-20	ACCATGGCTACCACCGCG	35	40,00
SCoT-21	ACGACATGGCGACCCACA	32	21,88
SCoT-23	CACCATGGCTACCACCAG	35	40,00
SCoT-26	ACCATGGCTACCACCGTC	55	41,82
SCoT-28	CCATGGCTACCACCGCCA	16	25,00
SCoT-31	CCATGGCTACCACCGCCT	19	31,58
SCoT-32	CCATGGCTACCACCGCAC	30	23,33
SCoT-35	CATGGCTACCACCGGCC	22	27,27
SCoT-36	GCAACAATGGCTACCACC	24	4,17
SCoT-59	ACAATGGCTACCACCATC	22	31,82
SCoT-60	ACAATGGCTACCACCACA	32	28,13
SCoT-63	ACCATGGCTACCACGGGC	30	43,33
<i>Всего</i>	–	493	–
<i>Среднее значение</i>	–	25,95	29,46

С указанными маркерами удалось получить 493 ПЦР-фрагмента, из них 152 фрагмента (30,8 %) оказались полиморфными. В среднем на каждый информативный праймер приходилось 8 уникальных ПЦР-продуктов, размеры которых находились в диапазоне от 400 до 3600 пар нуклеотидов. Наибольшее число ампликонов (55) получено с использованием праймера SCoT-26, наименьшее (10) – с использованием праймера SCoT-11. Максимальный уровень ДНК-полиморфизма (45,45 %) обнаружен с маркером SCoT-02, минимальный (4,17 %) – с маркером SCoT-36.

Средний уровень полиморфизма, выявленный в настоящем исследовании (29,46 %), оказался существенно ниже значений, представленных в работах других авторов. Так, И. П. Кондрацкая с соавторами при идентификации генотипов райграса и фестулолиума с помощью системы SCoT-маркеров обнаружила значительный генетический полиморфизм – 94,52 % [26]. При изучении этих культур с использованием ISSR-маркеров уровень полиморфизма составил 71 % [27]. В ходе анализа генетической изменчивости 21 сорта овсяницы тростниковой с применением 14 SSR-маркеров средний уровень полиморфизма установлен в пределах 88,6 % [28]. Сравнительно низкое среднее значение степени межсортового ДНК-полиморфизма в настоящем исследовании, вероятно, можно объяснить происхождением образцов: в основном они получены путем отборов из близкородственного исходного материала.

На основании результатов генотипирования были рассчитаны показатели генетической изменчивости изучаемой выборки сортов. Среднее значение эффективного числа аллелей составило 1,249 и варьировалось от 1,184 (для маркера SCoT-26) до 1,328 (для маркера SCoT-11). С праймером к маркеру SCoT-11 получены также наибольшие значения индекса Шеннона (0,393) и генетического разнообразия по Нею (0,236). Близкие по значению показатели генетической изменчивости (эффективное число аллелей, индекс Шеннона, ожидаемая гетерозиготность) определены и для маркера SCoT-36 (1,302, 0,384 и 0,227 соответст-

венно) (табл. 3). При этом указанные маркеры характеризовались невысоким уровнем выявляемого ДНК-полиморфизма (10,00 % – SCoT-11, 4,17 % – SCoT-36). Относительно высокополиморфными (от 40,00 до 45,45 %) оказались маркеры SCoT-02, SCoT-13, SCoT-20, SCoT-23, SCoT-26, SCoT-63, которые можно использовать в качестве ДНК-идентификационных при различении сортов в селекции и семеноводстве овсяницы и фестулолиума.

Таблица 3

Показатели генетической изменчивости сортов овсяницы и фестулолиума по результатам анализа с использованием SCoT-маркеров

Table 3

Diversity indicators of fescue and festulolium varieties based on the SCoT analysis

Маркер	Эффективное число аллелей (N_e)	Генетическое разнообразие по Нею (H_e)	Индекс Шеннона (I)
SCoT-02	1,193	0,150	0,273
SCoT-06	1,222	0,175	0,310
SCoT-07	1,271	0,196	0,335
SCoT-08	1,224	0,177	0,316
SCoT-11	1,328	0,236	0,393
SCoT-13	1,188	0,153	0,281
SCoT-15	1,291	0,213	0,362
SCoT-20	1,251	0,185	0,319
SCoT-21	1,224	0,178	0,317
SCoT-23	1,210	0,163	0,293
SCoT-26	1,184	0,149	0,274
SCoT-28	1,244	0,187	0,327
SCoT-31	1,279	0,201	0,341
SCoT-32	1,292	0,209	0,353
SCoT-35	1,272	0,201	0,344
SCoT-36	1,302	0,227	0,384
SCoT-59	1,254	0,188	0,326
SCoT-60	1,237	0,183	0,321
SCoT-63	1,270	0,191	0,325
Среднее значение	1,249	0,187	0,326

Средние значения эффективного числа аллелей, индекса Шеннона и генетического разнообразия по Нею, полученные в настоящем исследовании, были ниже результатов, представленных в работе [7], где проводился ISSR-анализ 90 образцов овсяницы тростниковой (1,249, 0,326 и 0,187 против 1,549, 0,438 и 0,440 соответственно). Это позволяет заключить, что SCoT-маркеры несколько уступают ISSR-маркерам в дискриминационном потенциале, однако обе техники маркирования можно успешно использовать для различения сортов и генотипов разных видов овсяницы.

Данные о составе аллелей и показатели генетических дистанций между исследованными сортами злаковых трав послужили основой для построения дендрограммы методом NJ (рис. 1).

На дендрограмме выделились четыре выраженных кластера, группирующих анализируемые образцы в соответствии с видовой принадлежностью, селекционным происхождением, уровнем пloidности и морфотипом. В первом кластере оказались сорта фестулолиума Аллегро, Фест, Пилигрим и Айвенго селекции ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса». Сорт Аллегро – тетраплоид райграсового морфотипа, выведенный путем контролируемого скрещивания райграса многоукосного и овсяницы луговой, от которой он унаследовал высокую зимостойкость и долголетие. Данный сорт характеризуется

повышенной кормовой и семенной продуктивностью, а также высоким содержанием сахаров, по сравнению с райграсом является устойчивым к полеганию. Сорт Фест, как и сорт Аллегро, представляет собой тетраплоид райграсового морфотипа. Он получен в результате межродовой гибридизации райграса многоукосного и овсяницы тростниковой. Фестулолиум сорта Фест служит высокопродуктивным компонентом в составе кормовых травосмесей, отличается повышенной зимостойкостью и засухоустойчивостью, высокими кормовыми достоинствами, хорошо поедается животными, так как содержит большое количество сахара в сухом веществе (22,2 % в фазу выхода в трубку) [29]. Перспективный тетраплоидный сорт Пилигрим по долголетию на 30 % превосходит райграс пастбищный, а его семенная продуктивность при оптимальном питании может превышать 1,5 т/га. Данный сорт предназначен в основном для сенокосного использования, на орошаемых участках при регулярном внесении минеральных удобрений дает 2–3 полноценных укоса сена (до 20 т/га за сезон).

Во второй кластер вошли сорта овсяницы красной Сигма, Диана и Дипа. Сорт Сигма разработан селекционерами ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса» на основе синтетических популяций и предназначен для газонного, пастбищного и фитомелиоративного использования. Он характеризуется повышенной семенной продуктивностью (до 400–500 кг/га), ранним весенним и послеукосным отрастанием, долголетием, зимостойкостью и засухоустойчивостью. Сорта Диана и Дипа получены из сложногогибридных популяций и методом отбора соответственно. Сорт Дипа обладает способностью к симбиотической фиксации азота при инокуляции препаратами diaзотрофных бактерий [30].

Третий кластер объединил сорта овсяницы луговой ВИК-5, Бинара и Кварта (бутстреп-поддержка 100 %). Диплоидный сорт сенокосно-пастбищного назначения ВИК-5 получен отбором из закавказского образца. На его основе разработан тетраплоидный сорт Бинара, отличающийся повышенной продуктивностью. Овсяница сорта Кварта является сложногобридной популяцией пастбищно-газонного экотипа.

В четвертом кластере оказались овсяница тростниковая сортов Ли́ра и Серебрянка и фестулолиум сорта Изумрудный овсяницевого сорто́типа (бутстреп-поддержка 100 %). Сорт Ли́ра – относительно новое селекционное достижение – получен путем отбора на основе высокопродуктивных российских сортов Балтика и Западная [3]. Гексаплоидный сорт Серебрянка, разработанный методом межвидовой гибридизации овсяницы восточной и овсяницы тростниковой, отличается раннеспелостью и повышенной продуктивностью. У сортов Серебрянка и Изумрудный общий оригина́тор – Уральский федера́льный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук. Сорт Изумрудный допущен к использованию с 2000 г. Он является межвидовым гибридом овсяницы тростниковой и райграса однолетнего. От овсяницы сорт унаследовал морфобиологические признаки, от райграса – качественные характеристики. Фестулолиум сорта Изумрудный обладает высокой кормовой и семенной продуктивностью, хорошим качеством зеленой массы при содержании 15 % протеина, а также относительной устойчивостью к абиотическим стрессам и снежной плесени. Растения быстро отрастают после стравливания или скашивания при пастбищном и сенокосном использовании [31].

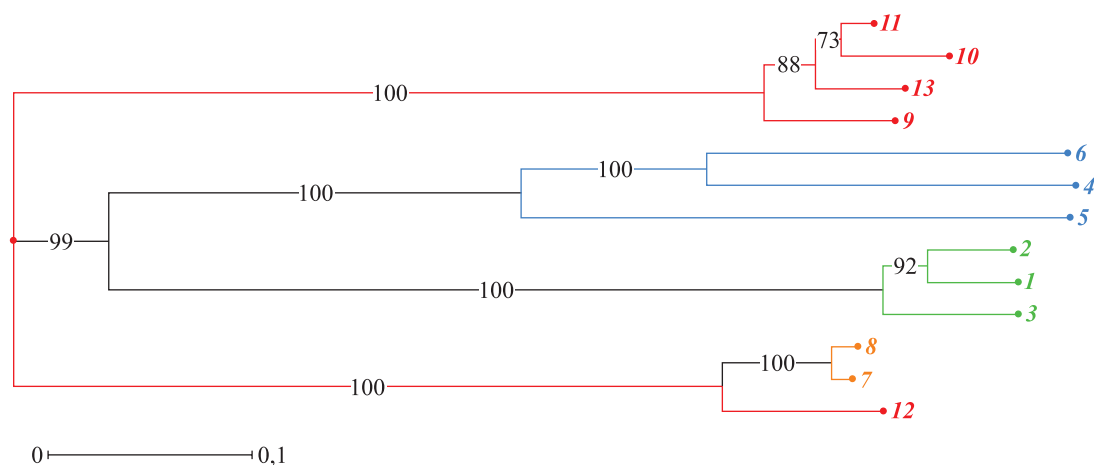


Рис. 1. Дендрограмма сортов овсяницы и фестулолиума по результатам анализа с применением SCoT-маркеров:

1 – Бинара; 2 – Кварта; 3 – ВИК-5; 4 – Диана; 5 – Дипа; 6 – Сигма; 7 – Лира;
8 – Серебрянка; 9 – Аллегро; 10 – Пилигрим; 11 – Фест; 12 – Изумрудный; 13 – Айвенго

Fig. 1. Dendrogram of fescue and festulolium varieties based on the results of SCoT analysis:
1 – Binara; 2 – Kvarta; 3 – VIK-5; 4 – Diana; 5 – Dipa; 6 – Sigma; 7 – Lira;
8 – Serebrjanka; 9 – Allegro; 10 – Piligrim; 11 – Fest; 12 – Izumrudniy; 13 – Ajvengo

Совместная кластеризация вышеуказанных сортов злаковых трав, предположительно, обусловлена общностью происхождения и сходством основных морфобиологических признаков и качественных характеристик.

На основе байесовской модели и метода Эванно [24] в программе *Structure* определена генетическая структура изучаемых образцов овсяницы и фестулолиума, в соответствии с которой они разделились на четыре группы ($K = 4$) (рис. 2).

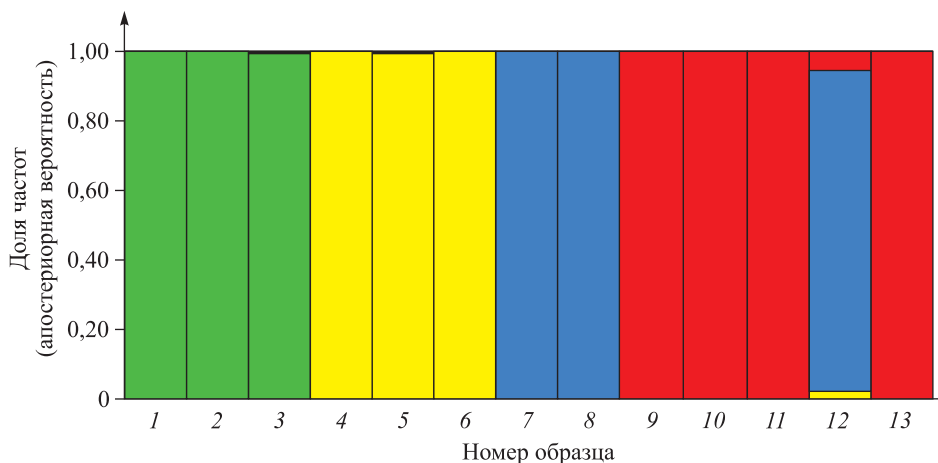


Рис. 2. Генетическая структура сортов овсяницы и фестулолиума по результатам оценки в программе *Structure*.

Цветовые коды соответствуют выявленным кластерам, а номера образцов – обозначениям сортов на рис. 1

Fig. 2. *Structure* analysis of the genetic structure of fescue and festulium varieties.

Colour codes correspond to identified clusters, and sample numbers – to variety designations in fig. 1

В группе сортов овсяницы наблюдалась четкая генетическая структуризация, тогда как в ряду фестулолиума обнаружена неравномерность распределения (выделялся сорт Изумрудный). Обособленное положение сорта Изумрудный по отношению к другим сортам данной культуры (Аллегро, Пилигрим, Фест, Айвенго) можно объяснить отличающимся уровнем пloidности. Как правило, гибридные растения фестулолиума, в зависимости от пloidности, морфологически наследуют признаки либо овсяницы, либо райграса, причем гексапloidные формы близки к овсянице тростниковой, а тетрапloidные формы – к райграсу пастбищному или райграсу многоцветковому [32, с. 12–14].

Эти особенности гибридной культуры нашли подтверждение и в данном исследовании. В изучаемой выборке сортов фестулолиум сорта Изумрудный оказался близок к овсянице тростниковой сортов Ли́ра и Серебрянка не только по уровню пloidности ($6n$), но и по результатам генотипирования и кластеризации (см. рис. 1), а также по генетической структуре, что отражено в одинаковых цветовых кодах, полученных для указанных образцов (см. рис. 2). Сравнительный анализ основных морфологических характеристик и агрономических признаков также обнаружил много общего. Высокий, слегка раскидистый куст и соцветие в виде пирамидальной метелки в сочетании с повышенной пластичностью, раннеспелостью, продуктивностью и долголетием (до 8 лет) указывают на сходство растений фестулолиума сорта Изумрудный с овсяницей тростниковой сорта Серебрянка. Благодаря этим свойствам фестулолиум можно использовать в качестве прямой замены сортов овсяницы в травосмесях для улучшения питательной ценности корма [31]. В отличие от включенных в анализ сортов райграсового типа растения сорта Изумрудный нетребовательны к почвенным условиям, не полегают, а их семена более устойчивы к осыпанию.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют об эффективности техники SCoT-маркирования для оценки генетического разнообразия российских сортов овсяницы и фестулолиума. Из 25 испытанных маркеров 19 маркеров (76 %) выявляли ДНК-полиморфизм между изучаемыми видами и сортами. С праймерами к информативным маркерам получены 152 полиморфных фрагмента амплификации ДНК (30,8 %). Для исследуемой коллекции образцов определены наборы маркеров, позволяющие обнаружить высокие значения уровня генетической изменчивости (SCoT-02, SCoT-11, SCoT-13, SCoT-20, SCoT-23, SCoT-26, SCoT-36, SCoT-63). Эти маркеры можно использовать в селекции и семеноводстве разных

видов овсяницы и фестулолиума, в частности, для ДНК-идентификации сортов и генотипов, разработки генетических паспортов, контроля стабильности сорта в процессе использования.

Кластерный анализ сгруппировал изучаемые образцы согласно видам, подвидам, происхождению и сходству по основным признакам. Выявлено соответствие результатов кластеризации селекционному описанию используемого в исследовании материала. Информация об установленном сходстве или различии на генетическом уровне будет полезна при выборе родительских форм для создания новых сортов с улучшенными характеристиками. Использование полученных данных позволит ускорить оценку исходного материала и контроль результатов гибридизации путем отбора ценных генотипов на ранней стадии онтогенеза без проведения трудоемких и затратных по времени полевых испытаний.

Широкое внедрение методов молекулярно-генетического анализа в селекцию многолетних злаковых трав будет способствовать дальнейшему развитию кормопроизводства и получению биологически полноценной сельскохозяйственной продукции.

Библиографические ссылки

1. Костенко СИ, Косолапов ВМ, Пилипко СВ, Костенко ЕС. Селекция многолетних злаковых трав для адаптивного кормопроизводства. *Кормопроизводство*. 2016;8:35–39.
2. Золотарев ВН, Катков ВА, Карпин ВИ. Биолого-генетические и технологические основы семеноводства сортов кормовых трав, созданных на основе индуцированных тетраплоидов. *Адаптивное кормопроизводство*. 2013;2:44–52.
3. Косолапов ВМ, Шамсутдинов ЗШ, Ившин ГИ, Кулешов ГФ, Новоселов МЮ, Новоселова АС и др. *Основные виды и сорта кормовых культур: итоги научной деятельности Центрального селекционного центра*. Шамсутдинов ЗШ, Новоселова АС, Косолапов ВМ, Агафодорова МН, Воловик ВТ, Дробышева ЛВ и др., редакторы. Москва: Наука; 2015. 545 с.
4. Клименко ИА, Козлов НН, Шамустакимова АО, Душкин ВА. Изучение генетического разнообразия кормовых культур с помощью молекулярных ДНК-маркеров. *Адаптивное кормопроизводство*. 2019;4:89–100. DOI: 10.33814/AFP-2222-5366-2019-4-89-100.
5. Сапрыкин СВ, Золотарев ВН, Иванов ИС, Степанова ГВ, Сапрыкина НВ, Лабинская РМ. *Научные основы селекции и семеноводства многолетних трав в Центрально-Черноземном регионе России*. Сапрыкин СВ, Золотарев ВН, Степанова ГВ, редакторы. Воронеж: Воронежская областная типография; 2020. 496 с.
6. Loera-Sánchez M, Studer B, Kölliker R. DNA-based assessment of genetic diversity in grassland plant species: challenges, approaches, and applications. *Agronomy*. 2019;9(12):881. DOI: 10.3390/agronomy9120881.
7. Shahabzadeh Z, Mohammadi R, Darvishzadeh R, Jaffari M. Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(1):655–669. DOI: 10.1007/s11033-019-05173-z.
8. Cheng Y, Ma X, Zhou K, Humphreys MW, Zhang XQ. Phylogenetic analysis of *Festuca* – *Lolium* complex using SRAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2016;63(1):7–18. DOI: 10.1007/s10722-015-0324-5.
9. Roldán-Ruiz I, van Eeuwijk FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemand J, et al. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;103(8):1138–1150. DOI: 10.1007/s001220100571.
10. Tanhuanpää P, Erkkilä M, Kalendar R, Schulman AH, Manninen O. Assessment of genetic diversity in Nordic timothy (*Phleum pratense* L.). *Hereditas*. 2016;153:5. DOI: 10.1186/s41065-016-0009-x.
11. Collard BCY, Mackill DJ. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2009;27(1):86–93. DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5.
12. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *PNAS*. 1991;88(21):9828–9832. DOI: 10.1073/pnas.88.21.9828.
13. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983;1(4):19–21. DOI: 10.1007/BF02712670.
14. Клименко ИА, Козлов НН, Костенко СИ, Шамустакимова АО, Мавлютов ЮМ. *Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров*. Москва: Угреша Т; 2020. 35 с. DOI: 10.33814/978-5-6043194-9-9.
15. Amirmoradi B, Talebi R, Karami E. Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*. 2012;298(9):1679–1688. DOI: 10.1007/s00606-012-0669-6.
16. Jiang LF, Qi X, Zhang XQ, Huang LK, Ma X, Xie WG. Analysis of diversity and relationships among orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) accessions using start codon-targeted markers. *Genetics and Molecular Research*. 2014;13(2):4406–4418. DOI: 10.4238/2014.June.11.4.
17. Yan H, Zhang Y, Zeng B, Yin G, Zhang X, Ji Y, et al. Genetic diversity and association of EST-SSR and SCoT markers with rust traits in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Molecules*. 2016;21(1):66. DOI: 10.3390/molecules21010066.
18. Safari H, Zebarjadi A, Kahrizi D, Jafari AA. The study of inter-specific relationships of *Bromus* genus based on SCoT and ISSR molecular markers. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(5):5209–5223. DOI: 10.1007/s11033-019-04978-2.
19. Кондрацкая ИП, Юхимук АН, Столепченко ВА, Чижик ОВ, Козловская ЗГ, Васьюк ПП и др. Создание межродовых гибридов фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой с использованием постгеномных технологий и ДНК-маркирования. В: Кунах ВА, Дробик НМ, Азизов ИВ, Андреев ИА, Атанасов А, Блюм ЯБ и др., редакторы. *Факторы экспериментальной эволюции организмов = Factors in experimental evolution of organisms. Том 25*. Киев: Украинское общество генетиков и селекционеров имени Н. И. Вавилова; 2019. с. 253–259. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1172.

20. 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.
21. Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. *DARwin software* [Internet]. Paris: CIRAD; 2006 [cited 2022 June 7]. Available from: <https://darwin.cirad.fr/>.
22. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.
23. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003;164(4):1567–1587. DOI: 10.1093/genetics/164.4.1567.
24. 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.
25. Earl DA, vonHoldt BM. *Structure Harvester*: a website and program for visualizing *Structure* output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):359–361. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7.
26. Кондрацкая ИП, Юхимук АН, Чижик ОВ, Решетников ВН. ДНК-маркеры как средство оценки генетического разнообразия и идентификации злаковых трав. В: Демидчик ВВ, Смолич ИИ, Падутов ВЕ, Шашко АЮ, редакторы. *Клеточная биология и биотехнология растений. Тезисы докладов III Международной научно-практической конференции; 24–27 мая 2022 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2022. с. 70.
27. Pivorienė O, Pašakinskienė I. Genetic diversity assessment in perennial ryegrass and *Festulolium* by ISSR fingerprinting. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2008;95(2):125–133.
28. Fu Kaixin, Guo Zhihui, Zhang Xinqian, Fan Yan, Wu Wendan, Li Daxu, et al. Insight into the genetic variability analysis and cultivar identification of tall fescue by using SSR markers. *Hereditas*. 2016;153:9. DOI: 10.1186/s41065-016-0013-1.
29. Золотарев ВН. Хозяйственно-биологические характеристики фестулолиума сорта Фест и особенности возделывания. *Адаптивное кормопроизводство*. 2022;2:35–48.
30. Трухан ОВ. Развитие семеноводства овсяницы красной. *Адаптивное кормопроизводство*. 2016;2:71–79.
31. Золотарев ВН, Переprawo НИ. Отличительные особенности сортов овсянице-райграсовых гибридов при возделывании на семена. В: *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. Материалы XII Международной конференции; 6–10 июня 2016 г.; Ялта, Россия*. Москва: Российский университет дружбы народов; 2016. с. 314–317.
32. Переprawo НИ, Косолапов ВМ, Рябова ВЭ, Золотарев ВН, Карпин ВИ, Лебедева НН и др. *Возделывание и использование новой кормовой культуры – фестулолиума – на корм и семена*. Переprawo НИ, Косолапов ВМ, Рябова ВЭ, Георгиади НИ, Бакулина ЮВ, редакторы. Москва: Издательство РГАУ – МСХА; 2012. 28 с.

References

1. Kostenko SI, Kosolapov VM, Pilipko SV, Kostenko ES. Breeding perennial gramineous for adaptive forage production. *Fodder Journal*. 2016;8:35–39. Russian.
2. Zolotarev VN, Katkov VA, Karpin VI. The biological-genetic and technological basis of a seed multiplication for varieties of forage grasses, created with use the induced tetraploids. *Adaptive Fodder Production*. 2013;2:44–52. Russian.
3. Kosolapov VM, Shamsutdinov ZSh, Ivshin GI, Kuleshov GF, Novoselov MYu, Novoselova AS, et al. *Osnovnye vidy i sorta kormovykh kul'tur: itogi nauchnoi deyatel'nosti Tsentral'nogo selektsionnogo tsentra* [The basic species and varieties of fodder crops: results of scientific activity of the Central Breeding Center]. Shamsutdinov ZSh, Novoselova AS, Kosolapov VM, Agafodorova MN, Volovik VT, Drobysheva LV, et al., editors. Moscow: Nauka; 2015. 545 p. Russian.
4. Klimenko IA, Kozlov NN, Shamustakimova AO, Dushkin VA. Investigation of forage crops genetic diversity using molecular DNA markers. *Adaptive Fodder Production*. 2019;4:89–100. Russian. DOI: 10.33814/AFP-2222-5366-2019-4-89-100.
5. Saprykin SV, Zolotarev VN, Ivanov IS, Stepanova GV, Saprykina NV, Labinskaya RM. *Nauchnye osnovy selektsii i semenovodstva mnogoletnikh trav v Tsentral'no-Chernozemnom regione Rossii* [Scientific bases of breeding and seed production of perennial grasses in the Central Chernozem region of Russia]. Saprykin SV, Zolotarev VN, Stepanova GV, editors. Voronezh: Voronezhskaya oblastnaya tipografiya; 2020. 496 p. Russian.
6. Loera-Sánchez M, Studer B, Kölliker R. DNA-based assessment of genetic diversity in grassland plant species: challenges, approaches, and applications. *Agronomy*. 2019;9(12):881. DOI: 10.3390/agronomy9120881.
7. Shahabzadeh Z, Mohammadi R, Darvishzadeh R, Jaffari M. Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(1):655–669. DOI: 10.1007/s11033-019-05173-z.
8. Cheng Y, Ma X, Zhou K, Humphreys MW, Zhang XQ. Phylogenetic analysis of *Festuca – Lolium* complex using SRAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2016;63(1):7–18. DOI: 10.1007/s10722-015-0324-5.
9. Roldán-Ruiz I, van Eeuwijk FA, Gilliland TJ, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemant J, et al. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;103(8):1138–1150. DOI: 10.1007/s001220100571.
10. Tanhuanpää P, Erkkilä M, Kalendar R, Schulman AH, Manninen O. Assessment of genetic diversity in Nordic timothy (*Phleum pratense* L.). *Hereditas*. 2016;153:5. DOI: 10.1186/s41065-016-0009-x.
11. Collard BCY, Mackill DJ. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2009;27(1):86–93. DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5.
12. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *PNAS*. 1991;88(21):9828–9832. DOI: 10.1073/pnas.88.21.9828.
13. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983;1(4):19–21. DOI: 10.1007/BF02712670.
14. Klimenko IA, Kozlov NN, Kostenko SI, Shamustakimova AO, Mavlyutov YuM. *Identifikatsiya i pasportizatsiya sortov kormovykh trav (klevra lugovogo, lyutserny izmenchivoi, posevnoi i khmelevidnoi) na osnove DNK-markerov* [Identification and certification of forage grasses varieties (red clover, bastard alfalfa, common alfalfa and black medick alfalfa), based on DNA markers]. Moscow: Ugresha T; 2020. 35 p. Russian. DOI: 10.33814/978-5-6043194-9-9.

15. Amirmoradi B, Talebi R, Karami E. Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*. 2012;298(9):1679–1688. DOI: 10.1007/s00606-012-0669-6.
16. Jiang LF, Qi X, Zhang XQ, Huang LK, Ma X, Xie WG. Analysis of diversity and relationships among orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) accessions using start codon-targeted markers. *Genetics and Molecular Research*. 2014;13(2):4406–4418. DOI: 10.4238/2014.June.11.4.
17. Yan H, Zhang Y, Zeng B, Yin G, Zhang X, Ji Y, et al. Genetic diversity and association of EST-SSR and SCoT markers with rust traits in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Molecules*. 2016;21(1):66. DOI: 10.3390/molecules21010066.
18. Safari H, Zebarjadi A, Kahrizi D, Jafari AA. The study of inter-specific relationships of *Bromus* genus based on SCoT and ISSR molecular markers. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(5):5209–5223. DOI: 10.1007/s11033-019-04978-2.
19. Kondratskaya IP, Yukhimuk AN, Stolepchenko VA, Chizhik OV, Kozlovskaya ZG, Vasko PP, et al. The creating of inter-genetic hybrids of *Festulolium* of *Festuca arundinacea* morphotype with the use of post-genomic technologies and DNA-marking. In: Kunakh VA, Drobyk NM, Azizov IV, Andreev IO, Atanasov A, Blume YaB, et al., editors. *Factors in experimental evolution of organisms. Volume 25*. Kyiv: M. I. Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine; 2019. p. 253–259. Russian. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1172.
20. 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.
21. Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. *DARwin software* [Internet]. Paris: CIRAD; 2006 [cited 2022 June 7]. Available from: <https://darwin.cirad.fr/>.
22. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.
23. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003;164(4):1567–1587. DOI: 10.1093/genetics/164.4.1567.
24. 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.
25. Earl DA, vonHoldt BM. *Structure Harvester*: a website and program for visualizing *Structure* output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):359–361. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7.
26. Kondratskaya IP, Yukhimuk AN, Chizhik OV, Reshetnikov VN. [DNA markers as a means of assessing the genetic diversity and identification of grasses]. In: Demidchik VV, Smolich II, Padutov VE, Shashko AYU, editors. *Kletochnaya biologiya i biotekhnologiya rastenii. Tezisy dokladov III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 24–27 maya 2022 g.; Minsk, Belarus'* [Plant cell biology and biotechnology. Abstracts of the 3rd International scientific and practical conference; 2022 May 24–27; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2022. p. 70. Russian.
27. Pivorienė O, Pašakinskienė I. Genetic diversity assessment in perennial ryegrass and *Festulolium* by ISSR fingerprinting. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2008;95(2):125–133.
28. Fu Kaixin, Guo Zhihui, Zhang Xinquan, Fan Yan, Wu Wendan, Li Daxu, et al. Insight into the genetic variability analysis and cultivar identification of tall fescue by using SSR markers. *Hereditas*. 2016;153:9. DOI: 10.1186/s41065-016-0013-1.
29. Zolotarev VN. Economic and biological characteristics festulolium varieties Fest and features cultivation. *Adaptive Fodder Production*. 2022;2:35–48. Russian.
30. Trukhan OV. The development of red fescue seed production. *Adaptive Fodder Production*. 2016;2:71–79. Russian.
31. Zolotarev VN, Perepravo NI. [Distinctive features of varieties of fescue-ryegrass hybrids when cultivated for seeds]. In: *Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya. Materialy XII Mezhdunarodnoi konferentsii; 6–10 iyunya 2016 g.; Yalta, Rossiya* [New and non-traditional plants and prospects for their use. Proceedings of the 12th International conference; 2016 June 6–10; Yalta, Russia]. Moscow: RUDN University; 2016. p. 314–317. Russian.
32. Perepravo NI, Kosolapov VM, Ryabova VE, Zolotarev VN, Karpin VI, Lebedeva NN, et al. *Vozdelyvanie i ispol'zovanie novoi kormovoi kul'tury – festuloliuma – na korm i semena* [Cultivation and use of a new forage crop – festulolium – for fodder and seeds]. Moscow: Publishing House of the Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy; 2012. 28 p. Russian.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 581.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ БАКТЕРИОЗАХ РАСТЕНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

ШАО ЧЭНЮЕ¹⁾, Ю. Н. ГОРОВИК¹⁾, С. Г. СИДОРОВА¹⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

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

В течение 2019–2020 гг. отобраны 75 образцов картофеля, моркови, репы, капусты, лука как в полевых условиях, так и в хранилищах. Бактерии рода *Pectobacterium* изолированы из 60 образцов. Также выделены штаммы *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. Доминирующими видами, вызывающими мягкие гнили и черную ножку картофеля, были *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. atrosepticum* и *P. brasiliense*. Бактерия *P. carotovorum* изолирована и из других овощных культур. В образцах моркови и картофеля из хранилищ часто

Образец цитирования:

ШАО Чэньюе, Горовик ЮН, Сидорова СГ, Евтушенков АН. Идентификация пектолитических видов бактерий, выделенных при бактериозах растений в Республике Беларусь. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:64–72. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-64-72>

For citation:

Shao Chengyue, Gorovik YuN, Sidorova SG, Evtushenkov AN. Identification of pectolytic bacterial species isolated during plant bacteriosis in the Republic of Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:64–72. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-64-72>

Авторы:

ШАО Чэньюе – аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. Н. Евтушенков.

Юрий Николаевич Горовик – старший преподаватель кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Светлана Георгиевна Сидорова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

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

Authors:

Shao Chengyue, postgraduate student at the department of molecular biology, faculty of biology.
520095424@qq.com

Yuri N. Gorovik, senior lecturer at the department of molecular biology, faculty of biology.
gorovikyn@gmail.com

Swetlana G. Sidorova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
sidorova@bsu.by

Anatoli N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; head of the department of molecular biology, faculty of biology.
evtushenkov@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-2755-6979>

выделялись штаммы бактерий рода *Bacillus*. Впервые в Беларуси на растениях картофеля обнаружена бактерия *P. brasiliense*. Полученные результаты по идентификации и распространению бактерий мягких гнилей в Беларуси помогут планировать риски, связанные с инфекциями, вызываемыми этими патогенами.

Ключевые слова: мягкие гнили; черная ножка картофеля; *Pectobacterium brasiliense*; *P. parmentieri*; *P. carotovorum*; *Bacillus pumilus*.

IDENTIFICATION OF PECTOLYTIC BACTERIAL SPECIES ISOLATED DURING PLANT BACTERIOSIS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

SHAO CHENGYUE^a, Yu. N. GOROVIK^a, S. G. SIDOROVA^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

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

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

During 2019–2020, we selected 75 samples of potatoes, carrots, turnips, cabbage, onions, both in the field and from storage. Bacteria of the genus *Pectobacterium* were isolated from 60 samples. Strains of *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were also isolated. The dominant species causing soft rot and black leg of potato were *Pectobacterium carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. atrosepticum* and *P. brasiliense*. Bacterium *P. carotovorum* was isolated from other vegetable crops. In samples of carrots and potatoes, strains of bacteria of the genus *Bacillus* were often isolated from storage. For the first time in Belarus, we found the bacterium *P. brasiliense* on potato plants. The results obtained on the identification and spread of soft rot bacteria in Belarus will help plan the risks associated with infections caused by these pathogens.

Keywords: soft rot; black leg of potato; *Pectobacterium brasiliense*; *P. parmentieri*; *P. carotovorum*; *Bacillus pumilus*.

Введение

Фитопатогенные виды пектолитических бактерий родов *Pectobacterium* и *Dickeya* (ранее известные как виды *Erwinia*) являются возбудителями широко распространенных бактериозов овощных культур и декоративных растений в различных климатических регионах. Бактериозы также поражают хранящуюся овощную продукцию, причиняя значительный экономический ущерб.

В догеномный период изучения пектолитических бактерий в качестве основных критериев выделения видов и подвидов использовали морфологические, физиолого-биохимические и фитопатологические характеристики. В 1945 г. Э. Л. Уолди предложил видовое название *Pectobacterium* для пектолитических видов *Erwinia* [1]. Но уже в 1968 г. Д. В. Дай на основании масштабного изучения биохимических признаков коллекционных штаммов *Erwinia* вернулся к родовому термину *Erwinia*, но внутри рода выделил четыре группы бактерий (роду *Pectobacterium* соответствует группа *carotovora*) [2]. И наконец, в геномную эру М. Адеолу и соавторы в 2016 г. выделили отдельное семейство Pectobacteriaceae (включает роды *Pectobacterium*, *Dickeya*) [3]. Наиболее распространенный патоген *Pectobacterium carotovorum*, являющийся возбудителем мягких гнилей, при более детальном генетическом изучении был отнесен к нескольким подвидам – *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, *P. carotovorum* ssp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* ssp. *wasabiae* и *P. carotovorum* ssp. *odorifera* [4]. Выделение новых видов пектобактерий в настоящее время производится по данным геномного анализа. Геномные исследования позволили выделить такие новые виды рода *Pectobacterium*, как *P. aquaticum* [5], *P. aroidearum* [6], *P. atrosepticum* [7], *P. betavasculorum* [7], *P. cacticida* [8], *P. fontis* [9], *P. parmentieri* [10], *P. polaris* [11], *P. polonicum* [12], *P. punjabense* [13], *P. zantedeschiae* [14], *P. parvum* [15].

Большинство пектобактерий способны поражать широкий круг овощных культур и распространены в различных климатических зонах на разных континентах. Но некоторые пектобактерии имеют определенную специфичность и поражают ограниченный круг растений: *P. betavasculorum* – сахарную свеклу, *P. wasabiae* и *P. odorifera* – японскую горчицу и салат соответственно, *P. atrosepticum* – картофель (чаще встречается в зонах умеренного климата).

Бактерии родов *Pectobacterium* и *Dickeya* входят в число 10 наиболее экономически значимых патогенов растений [16]. Видовой состав пектобактерий, поражающих овощные культуры, интенсивно изучается во всем мире. Особенно пристальное внимание уделяется микрофлоре важнейших овощных

культур – картофеля, салата, кукурузы, лука. Аналогичные исследования проводятся и в Беларуси [17–19]. Доминирующими возбудителями мягких гнилей овощей и черной ножки картофеля в республике являются бактерии семейства *Pectobacteriaceae*. В последнее время отмечается широкое распространение фитопатогенных пектолитических бактерий *Bacillus pumilus* [19; 20]. Интенсивный обмен растительным материалом приводит к быстрому распространению фитопатогенной микрофлоры, поэтому необходим постоянный мониторинг фитопатогенов для подбора эффективной стратегии контроля их численности. Цель данного исследования – изучение многообразия бактерий семейства *Pectobacteriaceae*, поражающих картофель и другие овощные культуры в нашем регионе, а также оценка распространения других пектолитических бактерий.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования выступали штаммы фитопатогенных пектолитических бактерий, выделенные из образцов растений, которые были собраны на территории Беларуси в 2019–2020 гг. и имели выраженные симптомы мягких гнилей и черной ножки (табл. 1). Стебли картофеля, пораженные черной ножкой (всего 20 образцов), отбирали на посадках картофеля в июле, а клубни картофеля, корнеплоды моркови и репы, кочаны капусты, луковицы лука с признаками мягкой гнили (27, 19, 2, 5 и 2 образца соответственно) отбирали в хранилищах в зимний период. Порядковый номер штамма соответствует отдельному образцу растений.

Таблица 1

Происхождение изученных в работе пектолитических штаммов

Table 1

The origin of the pectolytic strains studied in the work

Вид, штамм	Источник выделения	Место выделения
<i>P. carotovorum</i> 002-1, 002-2	Репка	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 003-9, 004-4, <i>P. atrosepticum</i> 004-3	Морковь	Частное хозяйство (Минская область)
<i>Bacillus</i> sp. 005-6, 005-7	Лук	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. atrosepticum</i> 009-3	Капуста	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 029-1, 029-2, 034-4, 035-2, 036-3, 036-4, <i>Pseudomonas</i> sp. 030-2	Картофель (клубни)	Частное хозяйство (Минская область)
<i>Bacillus</i> sp. 037-3, 037-4	Морковь	Частное хозяйство (Минская область)
<i>B. pumilus</i> 038-1, <i>Pseudomonas</i> sp. 038-2	Капуста	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 039-1, <i>Bacillus</i> sp. 039-2	Морковь	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. atrosepticum</i> 044-1, <i>Pseudomonas</i> sp. 044-2	Капуста	Частное хозяйство (Минская область)
<i>P. carotovorum</i> 045-1, 045-2, 047-1, 047-2, 052-1, 052-2, <i>Bacillus</i> sp. 046-1, 046-2, 048-1, 048-2, <i>Pseudomonas</i> sp. 050-1, 050-2, <i>B. pumilus</i> 051-1, <i>P. parmentieri</i> 051-2	Картофель (клубни)	Частное хозяйство (аг. Самохваловичи)
<i>Bacillus</i> sp. 054-1, 054-2, 055-2, 056-1, <i>B. pumilus</i> 055-1, 058-1, 058-2, <i>P. carotovorum</i> 056-2, 064-1, 064-2, 065-1, 065-2	Морковь	Частное хозяйство (аг. Самохваловичи)
<i>P. atrosepticum</i> 084, 086, 086-1, 087-1, <i>P. carotovorum</i> 087, 088-1, 088-2, 090-1, 090-2, 094, 095-2, 096, 097-1, 099-2, 102-1, 102-2, <i>P. brasiliense</i> 098-1, 098-2, 101-2, <i>B. pumilus</i> 100	Картофель (клубни)	Фермерское хозяйство (Брестская область)
<i>P. parmentieri</i> 104-2, 105-1, 105-2, 106-1, 106-2, 107-2, 108-1, 108-2, 111-2, 113-1, 113-2, 119-1, 119-2, 121-2, 123-1, 123-2, <i>P. atrosepticum</i> 110-1, 118-2, <i>P. carotovorum</i> 114-1, 124, 125, <i>Pseudomonas</i> sp. 118-1	Картофель (стебли)	Фермерское хозяйство (Минская область, Воложинский район)
<i>P. brasiliense</i> 126, 127, 129, 130, <i>P. carotovorum</i> 128	Картофель (стебли)	Фермерское хозяйство (Брестская область)

Бактерии выделяли на картофельно-пектатном агаре. Для его приготовления в расплавленный картофельный агар добавляли стерильный раствор хлористого кальция до концентрации 0,025 моль/л и разливали в чашки Петри. После застывания агара сверху наслаивали 3 мл 2 % полипектата натрия. Образцы пораженных бактериозами растений растирали в стерильной воде и высевали суспензию на картофельно-пектатную среду в чашках Петри. На 2–3-е сутки культивирования отбирали колонии бактерий, погруженные в пектатный гель. Определение фенотипических свойств исследуемых штаммов (грампринадлежность с использованием раствора КОН, тесты на утилизацию глюкозы, образование целлюлазы, лецитиназы, рост при разных температурах, способность утилизировать различные углеводы в качестве единственного источника углерода и энергии) осуществляли согласно стандартным методам, описанным в работе [2]. Для идентификации бактерий вида *B. pumilus* проводили ПЦР с праймерами Bp-1f (5'-ТСАААТСААГТГГГСААС-3') и Bp-2r (5'-GAGGCATCCCATATATTCG-3') по изложенной в публикации [19] методике. Вид *P. atrosepticum* определяли в реакции с праймерами Y45 (5'-TCACCGGACGCC GAACTGTGGCGT-3') и Y46 (5'-TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAAGT-3') [20], вид *P. brasiliense* – в реакции с праймерами Br1f (5'-GCGTGCCGGGTTTATGACCT-3') и L1r (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') [21], вид *P. carotovorum* – в реакции с праймерами EXPCCR (5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') и EXPCCF (5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3') [21], а вид *P. parmentieri* – в реакции с праймерами Ppaf (5'-TATCGCTGGCTCAGGCAATT-3') и Ppar (5'-TACGCTGCGCATACTTGGA-3') [22]. Для идентификации бактерий рода *Dickeya* применяли праймеры ADE1 (5'-GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT-3') и ADE2 (5'-CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCTGTC-3') [20]. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей АМ-буфер с $MgCl_2$, 0,2 ммоль/л дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,5 мкмоль/л праймера, 1 ед. Таq-полимеразы, 50 нг ДНК-матрицы, согласно оригинальным протоколам идентификации соответствующих бактерий. В работе использовали реактивы и праймеры компании *Праймтех* (Беларусь). В качестве контроля применяли ДНК коллекционных штаммов бактерий, в качестве маркеров молекулярного веса ДНК – GeneRuler 1 kb DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (*Fermentas*, Литва).

В исследовании использовали штаммы *P. atrosepticum* 21A, *P. carotovorum* 14A, *Dickeya* (*Erwinia chrysanthemi* ENA49) из коллекции БГУ и штамм *P. parmentieri* B-94 из коллекции Института микробиологии НАН Беларуси. Бактерии выращивали при температуре 28 °C на картофельном агаре или полноценной питательной среде (LB).

Результаты и их обсуждение

После посева образцов растений на картофельно-пектатную среду и инкубирования при 28 °C на 2–3-е сутки культивирования отбирали колонии бактерий, погруженные в пектатный гель (рис. 1). При выделении из мягких гнилей бактерий рода *Pectobacterium* обычно используют пектатную среду с кристаллическим фиолетовым (CVP), которая подавляет рост грамположительных бактерий. В настоящем исследовании применяли картофельный агар с полипектатом натрия, чтобы изолировать как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии и оценить роль последних в повреждении растений.



Рис. 1. Колонии пектолитических бактерий на пектатной среде

Fig. 1. Pectolytic bacteria on pectate media

Всего было отобрано 27 штаммов пектолитических бактерий из стеблей картофеля и 41 штамм из клубней картофеля, 19 штаммов из образцов моркови, 2 штамма из образцов репы, 5 штаммов из образцов капусты, 2 штамма из образцов лука. Чистые культуры бактерий анализировали стандартными

физиолого-биохимическими и морфологическим методами, как описано ранее в работе [2]: проводили О/Ф-тест, определяли окраску по Граму, наличие спор, рост при температуре 37 °С, пектолитическую, целлюлазную и лецитиназную активность, способность сбраживать сахара и утилизировать различные источники углерода. Грамположительные спорообразующие бактерии были отнесены к роду *Bacillus*. Всего выделено 19 штаммов данного рода, из них 6 штаммов по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами идентифицированы как *B. pumilus*. Большинство штаммов бацилл – 10 штаммов, включая 3 штамма *B. pumilus*, – были выделены из моркови. Из клубней картофеля изолированы 6 штаммов бацилл, в том числе 2 штамма *B. pumilus*, из лука – 2 штамма бацилл, из капусты – 1 штамм бацилл, идентифицированный как *B. pumilus*. Из стеблей картофеля, пораженных черной ножкой, не было выделено ни одного штамма бацилл. Таким образом, бактерии рода *Bacillus* являлись доминирующими возбудителями мягких гнилей хранящихся корнеплодов моркови, лука и в значительной степени поражали клубни картофеля (из 41 штамма пектолитических бактерий, выделенных из клубней картофеля, 6 штаммов отнесены к бациллам). Грамотрицательные бактерии с окислительным типом метаболизма, обладающие каталазной и оксидазной активностью, идентифицированы как бактерии рода *Pseudomonas*. Всего выделено 6 штаммов данного рода: 3 штамма изолированы из клубней картофеля, 1 штамм – из стебля картофеля, 2 штамма – из образцов капусты. Большинство выделенных пектолитических штаммов по изученным свойствам относились к новому семейству Pectobacteriaceae (табл. 2).

Таблица 2

Фенотипические свойства видов рода *Pectobacterium*

Table 2

Phenotypic characters species of the genus *Pectobacterium*

Проводимые тесты	Показанные результаты			
	<i>P. atrosepticum</i> (n = 9)	<i>P. carotovorum</i> (n = 38)	<i>P. brasiliense</i> (n = 7)	<i>P. parmentieri</i> (n = 17)
О/Ф-тест	F	F	F	F
Рост при температуре 37 °С	–	+	+	+
Образование: лецитиназы целлюлазы	– +	– +	– +	– +
Утилизация:				
α-метилглюкозида	+	+	–	+
лактозы	+	+	+	+
мальтозы	+	+	–	+
арабинозы	+	+	+	+
рафинозы	+	+	+	+
ксилозы	+	+	+	+
сорбита	–	+	–	+
дульцита	–	+	–	+
маннита	+	+	+	+
маннозы	+	+	+	+
рамнозы	+	+	+	+

Примечание. О/Ф-тест – окисление (О) либо ферментация (Ф) глюкозы; знак «плюс» или знак «минус» означают наличие или отсутствие признака, в скобках приведено число позитивных штаммов.

Семейство Pectobacteriaceae включает роды *Pectobacterium* и *Dickeya*. Для идентификации бактерий рода *Dickeya* использовали ПЦР с праймерами ADE1 и ADE2 [20]. Среди выделенных пектобактерий по результатам ПЦР не было обнаружено ни одного штамма бактерий рода *Dickeya*. Анализ биохимических свойств грамотрицательных пектолитических бактерий также не выявил штаммы с признаками, характерными для бактерий рода *Dickeya* (см. табл. 2). Данный патоген широко распространен на посадках картофеля в России [23], Польше и других странах Западной Европы [24]. Ранее сообщалось о выявлении бактерий рода *Dickeya* в Беларуси [18]. Тот факт, что авторы не обнаружили данный патоген в проанализированных образцах, можно объяснить ограниченным распространением бактерий рода *Dickeya* в республике. Для видовой идентификации пектобактерий использовали ПЦР с видоспецифическими праймерами к *P. brasiliense*, *P. atrosepticum*, *P. parmentieri* и *P. carotovorum* (рис. 2).

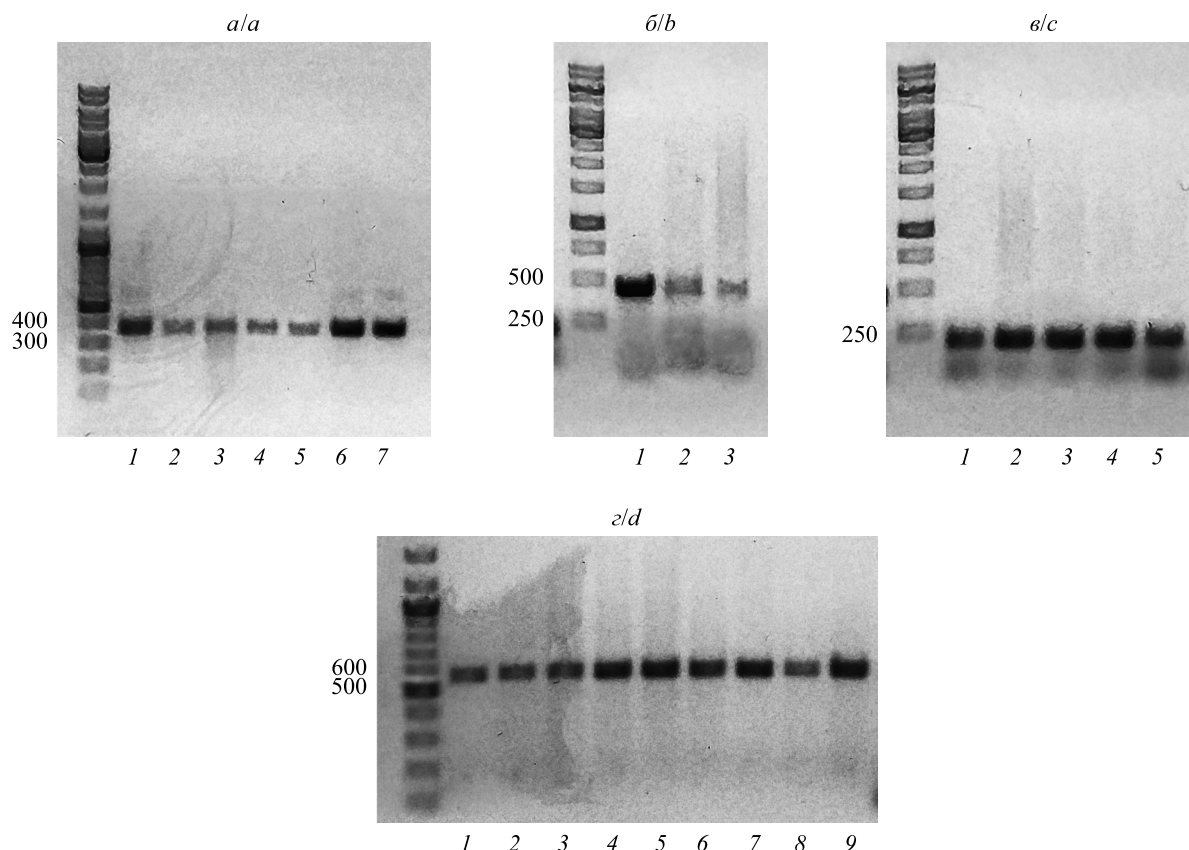


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации хромосомных ДНК пектобактерий с видоспецифическими праймерами:
а – Br1f и L1r (специфичны к виду *P. brasiliense*) (1 – штамм 098-1, 2 – штамм 098-2, 3 – штамм 101-2, 4 – штамм 126, 5 – штамм 127, 6 – штамм 129, 7 – штамм 130);
б – Y45 и Y46 (специфичны к виду *P. atrosepticum*) (1 – штамм 21А, 2 – штамм 084, 3 – штамм 118-2);
в – Praf и Ppar (специфичны к виду *P. parmentieri*) (1 – штамм В-94, 2 – штамм 111-2, 3 – штамм 119-2, 4 – штамм 121-2, 5 – штамм 123-1);
з – EXPCCR и EXPCCF (специфичны к виду *P. carotovorum*) (1 – штамм 14А, 2 – штамм 088-1, 3 – штамм 088-2, 4 – штамм 090-1, 5 – штамм 090-2, 6 – штамм 094, 7 – штамм 095-2, 8 – штамм 096, 9 – штамм 099-2)

Fig. 2. Electrophoregrams of products DNA amplification from *Pectobacterium* with species specific primers: а – Br1f and L1r (specific to *P. brasiliense*) (1 – strain 098-1, 2 – strain 098-2, 3 – strain 101-2, 4 – strain 126, 5 – strain 127, 6 – strain 129, 7 – strain 130); б – Y45 and Y46 (specific to *P. atrosepticum*) (1 – strain 21А, 2 – strain 084, 3 – strain 118-2); в – Praf and Ppar (specific to *P. parmentieri*) (1 – strain В-94, 2 – strain 111-2, 3 – strain 119-2, 4 – strain 121-2, 5 – strain 123-1); з – EXPCCR and EXPCCF (specific to *P. carotovorum*) (1 – strain 14А, 2 – strain 088-1, 3 – strain 088-2, 4 – strain 090-1, 5 – strain 090-2, 6 – strain 094, 7 – strain 095-2, 8 – strain 096, 9 – strain 099-2)

Проведенная ПЦР с праймерами Br1f и L1r выявила характерный для *P. brasiliense* фрагмент размером 322 пары нуклеотидов (п. н.) у штаммов 098-1, 098-2, 101-2, 126, 127, 129, 130. Штаммы бактерий *P. brasiliense* впервые обнаружены в Беларуси и только в образцах картофеля из фермерского хозяйства в Брестской области. Сообщалось об идентификации данного вида бактерий в России [25]. С момента обнаружения *P. brasiliense* в 2004 г. в Бразилии патоген широко распространился по всему миру: он выявлен в Израиле, Канаде, США, Нидерландах, Швейцарии, ЮАР, Кении, Южной Корее, Китае [26]. Для идентификации *P. atrosepticum* использовали ПЦР с праймерами Y45 и Y46 [21]. Характерный ПЦР-фрагмент размером 439 п. н. обнаружен в ДНК штаммов 004-3, 009-3, 044-1, 084, 086, 086-1, 087-1, 110-1, 118-2 (см. рис. 2). Идентификация пектобактерий с праймерами Praf и Ppar позволила отнести к виду *P. parmentieri* штаммы 051-2, 104-2, 105-1, 105-2, 106-1, 106-2, 107-2, 108-1, 108-2, 111-2, 113-1, 113-2, 119-1, 119-2, 121-2, 123-1, 123-2. Бактерии *P. parmentieri* ранее не выделяли в Беларуси. Большинство штаммов *P. parmentieri* изолированы авторами из стеблей картофеля с симптомами черной ножки. Классическим возбудителем черной ножки картофеля считаются штаммы *P. atrosepticum*, но в настоящем исследовании из стеблей картофеля чаще выделяли бактерии *P. parmentieri*, *P. carotovorum*,

P. brasiliense. В Польше доминирующими видами на растениях картофеля также являлись *P. parmentieri*, *P. carotovorum* [24]. По результатам ПЦР с праймерами ЕХРСССР и ЕХРСССР к *P. carotovorum* отнесены штаммы 002-1, 002-2, 003-9, 004-4, 029-1, 029-2, 034-4, 035-2, 036-3, 036-4, 039-1, 045-1, 045-2, 047-1, 047-2, 052-1, 052-2, 056-2, 064-1, 064-2, 065-1, 065-2, 087, 088-1, 088-2, 090-1, 090-2, 094, 095-2, 096, 097-1, 099-2, 102-1, 102-2, 114-1, 124, 125, 128. Большинство штаммов *P. carotovorum* выделены из гнилей клубней картофеля, корнеплодов моркови и репы, а также из стеблей картофеля, что свидетельствует об их широкой фитопатогенной специализации в отличие от других пектобактерий.

Изучение физиолого-биохимических свойств видов рода *Pectobacterium* не выявило критериев, подходящих для видовой идентификации (см. табл. 2). Неспособность к росту при температуре 37 °С характерна для *P. atrosepticum*, а рост при данной температуре может учитываться как признак *P. brasiliense*. Утилизация мальтозы и α -метилглюкозида в большей мере характерна для *P. atrosepticum*.

Заключение

Из 75 образцов растений, пораженных бактериозами, на пектатном агаре изолированы 96 штаммов пектолитических бактерий. Дифференциация выделенных пектолитических бактерий на основании морфологических и биохимических тестов выявила 19 штаммов рода *Bacillus*, 6 штаммов рода *Pseudomonas* и 71 штамм рода *Pectobacterium*. По результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами 6 штаммов бацилл отнесены к виду *B. pumilus*. Среди бактерий рода *Pectobacterium* по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами идентифицированы 4 вида – *P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliense* и *P. parmentieri*. Большинство выделенных пектобактерий относятся к виду *P. carotovorum*. Они были изолированы из мягких гнилей клубней картофеля, моркови, репы и стеблей картофеля. Бактерии *P. atrosepticum* обнаружены в образцах капусты, моркови, клубнях и стеблях картофеля. Значительная часть штаммов *P. brasiliense* и *P. parmentieri* выделены из стеблей картофеля, пораженных черной ножкой. Таким образом, наблюдается замена *P. atrosepticum* как основного возбудителя черной ножки новыми патогенами – *P. brasiliense* и *P. parmentieri*. Фитопатогенные бактерии *P. brasiliense* и *P. parmentieri* впервые выделены в Беларуси как возбудители черной ножки картофеля и мягких гнилей клубней картофеля.

Из образцов моркови и клубней картофеля, пораженных мягкими гнилями, выделено значительное количество штаммов пектолитических бактерий рода *Bacillus*, что свидетельствует об их большой роли в повреждении хранящейся продукции наряду с видами рода *Pectobacterium*.

Библиографические ссылки

1. Waldee EL. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State College Journal of Science*. 1945; 19(4):435–484.
2. Dye DW. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science*. 1968;11(4): 590–607.
3. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the Enterobacteriales: proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
4. Portier P, Pédrón J, Taghouti G, Fischer-Le Saux M, Caullireau E, Bertrand C, et al. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(10):3207–3216. DOI: 10.1099/ijsem.0.003611.
5. Pédrón J, Bertrand C, Taghouti G, Portier P, Barny M-A. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(3):745–751. DOI: 10.1099/ijsem.0.003229.
6. Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63(7):2520–2525. DOI: 10.1099/ijsem.0.046011-0.
7. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(2):381–391. DOI: 10.1099/ijsem.0.02423-0.
8. Alcorn SM, Orum TV, Steigerwalt AG, Foster JLM, Fogleman JC, Brenner DJ. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacti-cida* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991;41(2):197–212. DOI: 10.1099/00207713-41-2-197.
9. Oulghazi S, Cigna J, Lau YY, Moumni M, Chan KG, Faure D. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(2):470–475. DOI: 10.1099/ijsem.0.003180.
10. Khayti S, Cigna J, Chong TM, Quétu-Laurent A, Chan KG, Hélias V, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016; 66(12):5379–5383. DOI: 10.1099/ijsem.0.001524.

11. Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017;67(12):5222–5229. DOI: 10.1099/ijsem.0.002448.
12. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Jonca J, Furmaniak M, Waleron K. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(6):1751–1759. DOI: 10.1099/ijsem.0.003387.
13. Sarfraz S, Riaz K, Oulghazi S, Cigna J, Sahi ST, Khan SH, et al. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(11):3551–3556. DOI: 10.1099/ijsem.0.003029.
14. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Franczuk M, Jońca J, Wielgomas B, et al. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Systematic and Applied Microbiology*. 2019;42(3): 275–283. DOI: 10.1016/j.syapm.2018.08.004.
15. Pasanen M, Waleron M, Schott T, Cleenwerck I, Misztak A, Waleron K, et al. *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like type III secretion system and low virulence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(4):2440–2448. DOI: 10.1099/ijsem.0.004057.
16. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(6):614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
17. Евтушенков АН, Фомичев ЮК. Пектатлиазная активность бактерий рода *Erwinia*. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 1978;2:25–28.
18. Комар ЕИ, Шавель МИ, Песнякевич АГ. Идентификация грамотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий, вызывающих заболевания картофеля в Беларуси. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2014;2:54–60.
19. Горовик ЮН, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. ПЦР-диагностика бактерий *Vacillus pumilus*. *Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2014; 9(часть 1):162–166.
20. Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, et al. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(7):2228–2235. DOI: 10.1128/aem.62.7.2228-2235.1996.
21. Duarte V, De Boer SH, Ward LJ, de Oliveira AMR. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96(3):535–545. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x.
22. Lukianova AA, Evseev PV, Stakheev AA, Kotova IB, Zavriev SK, Ignatov AN, et al. Quantitative real-time PCR assay for the detection of *Pectobacterium parmentieri*, a causal agent of potato soft rot. *Plants*. 2021;10(9):1880. DOI: 10.3390/plants10091880.
23. Ignatov AN, Khodykina MV, Dzhililov FS, Karlov AN, Karandashov VE, Shirshikov FV, et al. Emergence and spreading of *Dickeya solani* & *D. dianthicola* on potato in Russia, and search for control measures. In: *The 14th International symposium on biocontrol and biotechnology; 2016 November 6–9; Saint-Petersburg – Pushkin, Russia*. [S. l.]: [s. n.]; 2016. p. 31.
24. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of *Pectobacteriaceae* on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;159(2):309–325. DOI: 10.1007/s10658-020-02163-x.
25. Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroschnikov KA, et al. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(2):364. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN.
26. Li Lei, Yuan Lifang, Shi Yanxia, Xie Xuwen, Chai Ali, Wang Qi, et al. Comparative genomic analysis of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* SX309 provides novel insights into its genetic and phenotypic features. *BMC Genomics*. 2019;20:486. DOI: 10.1186/s12864-019-5831-x.

References

1. Waldee EL. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State College Journal of Science*. 1945; 19(4):435–484.
2. Dye DW. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science*. 1968;11(4): 590–607.
3. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the Enterobacteriales: proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
4. Portier P, Pédrón J, Taghouti G, Fischer-Le Saux M, Caullireau E, Bertrand C, et al. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(10):3207–3216. DOI: 10.1099/ijsem.0.003611.
5. Pédrón J, Bertrand C, Taghouti G, Portier P, Barny M-A. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(3):745–751. DOI: 10.1099/ijsem.0.003229.
6. Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63(7):2520–2525. DOI: 10.1099/ijms.0.046011-0.
7. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53(2):381–391. DOI: 10.1099/ijms.0.02423-0.
8. Alcorn SM, Orum TV, Steigerwalt AG, Foster JLM, Fogleman JC, Brenner DJ. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacti-cida* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991;41(2):197–212. DOI: 10.1099/00207113-41-2-197.

9. Oulghazi S, Cigna J, Lau YY, Moumni M, Chan KG, Faure D. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(2):470–475. DOI: 10.1099/ijsem.0.003180.
10. Khayi S, Cigna J, Chong TM, Quêtu-Laurent A, Chan KG, Hélias V, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5379–5383. DOI: 10.1099/ijsem.0.001524.
11. Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017;67(12):5222–5229. DOI: 10.1099/ijsem.0.002448.
12. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Jonca J, Furmaniak M, Waleron K. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(6):1751–1759. DOI: 10.1099/ijsem.0.003387.
13. Sarfraz S, Riaz K, Oulghazi S, Cigna J, Sahi ST, Khan SH, et al. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(11):3551–3556. DOI: 10.1099/ijsem.0.003029.
14. Waleron Malg, Misztak A, Waleron Mich, Franczuk M, Jońca J, Wielgomas B, et al. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Systematic and Applied Microbiology*. 2019;42(3):275–283. DOI: 10.1016/j.syapm.2018.08.004.
15. Pasanen M, Waleron M, Schott T, Cleenwerck I, Misztak A, Waleron K, et al. *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like type III secretion system and low virulence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(4):2440–2448. DOI: 10.1099/ijsem.0.004057.
16. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012;13(6):614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
17. Evtushenkov AN, Fomichev YuK. [Pectatylase activity of the bacteria of the genus *Erwinia*]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 1978;2:25–28. Russian.
18. Komar EI, Shavel' MI, Pesnyakevich AG. [Identification of the gramnegative pectolytic phytopathogenic bacteria provoking potato diseases in Belarus]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2014;2:54–60. Russian.
19. Gorovik YuN, Lagonenko AL, Evtushenkov AN. [PCR detection of the bacteria *Bacillus pumilus*]. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem*. 2014;9(part 1):162–166. Russian.
20. Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, et al. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(7):2228–2235. DOI: 10.1128/aem.62.7.2228-2235.1996.
21. Duarte V, De Boer SH, Ward LJ, de Oliveira AMR. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96(3):535–545. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x.
22. Lukianova AA, Evseev PV, Stakheev AA, Kotova IB, Zavriev SK, Ignatov AN, et al. Quantitative real-time PCR assay for the detection of *Pectobacterium parmentieri*, a causal agent of potato soft rot. *Plants*. 2021;10(9):1880. DOI: 10.3390/plants10091880.
23. Ignatov AN, Khodykina MV, Dzhililov FS, Karlov AN, Karandashov VE, Shirshikov FV, et al. Emergence and spreading of *Dickeya solani* & *D. dianthicola* on potato in Russia, and search for control measures. In: *The 14th International symposium on biocontrol and biotechnology: 2016 November 6–9; Saint-Petersburg – Pushkin, Russia*. [S. l.]: [s. n.]; 2016. p. 31.
24. Motyka-Pomagruk A, Zoledowska S, Sledz W, Lojkowska E. The occurrence of bacteria from different species of *Pectobacteriaceae* on seed potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;159(2):309–325. DOI: 10.1007/s10658-020-02163-x.
25. Voronina MV, Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroshnikov KA, et al. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019;103(2):364. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN.
26. Li Lei, Yuan Lifang, Shi Yanxia, Xie Xuewen, Chai Ali, Wang Qi, et al. Comparative genomic analysis of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* SX309 provides novel insights into its genetic and phenotypic features. *BMC Genomics*. 2019;20:486. DOI: 10.1186/s12864-019-5831-x.

УДК 634.13:632.4

РЖАВЧИНА ГРУШИ В БЕЛАРУСИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ИНВАЗИИ ГРИБА *GYMNOSPORANGIUM SABINAE* (DICKS.) G. WINTER

В. Д. ПОЛИКСЕНОВА¹⁾

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

Ржавчина груши в Беларуси впервые была зарегистрирована в 2007 г., а через 12 лет приобрела характер эпифитотии. Составлена карта распространения заболевания в республике. Детально описаны и проиллюстрированы симптомы поражения груши и можжевельника, а также споры возбудителя заболевания (гриб *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter). Показано, что перезимовавшие в побегах эцио- и телиоспоры не прорастают в следующий вегетационный период. Телиоспоры текущего года на можжевельнике прорастают не только фрагмобазидиями с базидиоспорами, но и мицелием, что обеспечивает повторное заражение этого хозяина. Определен высокий инфекционный потенциал как груши (до 15 млн эциоспор на 1 см²), так и можжевельника (2 млн телиоспор на 1 см²). Констатируется гибель вследствие ржавчины годичных побегов груши и отдельных растений можжевельника казацкого. Отмечено, что инвазия *G. sabinae* на территорию Беларуси совпадает с широкой интродукцией в озеленение восприимчивых к ржавчине видов можжевельника.

Ключевые слова: ржавчина груши; *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter; можжевельник; инвазия; Беларусь.

Благодарность. Автор выражает благодарность кандидату сельскохозяйственных наук А. В. Чашинскому за помощь в сборе материала и ассистенту кафедры ботаники И. А. Федюшко за помощь в подготовке карты распространения ржавчины груши.

Образец цитирования:

Поликсенова ВД. Ржавчина груши в Беларуси как результат инвазии гриба *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:73–84. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-73-84>

For citation:

Poliksenova VD. Pear rust in Belarus because of fungus *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter invasion. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:73–84. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-73-84>

Автор:

Валентина Дмитриевна Поликсенова – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Author:

Valentina D. Poliksenova, PhD (agricultural sciences), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology. polyksenova@gmail.com

PEAR RUST IN BELARUS BECAUSE OF FUNGUS *GYMNOSPORANGIUM SABINAE* (DICKS.) G. WINTER INVASION

V. D. POLIKSENOVA^a

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

Pear rust in Belarus was first registered in 2007, and after 12 years the disease acquired the character of epiphytosis. A map of the distribution of pear rust in the republic has been compiled. The symptoms of damage to pear and juniper, spores of the causative agent (fungus *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter) are described and illustrated. It has been shown that aecio- and teliospores overwintered in the shoots do not germinate in the next growing season. The teliospores of the current year on juniper germinate not only with phragmobasidia with basidiospores, but also with mycelium, which probably ensures the re-infection of this host plant. The high infectious potential of both pear (up to 15 mln aecio-spores per 1 cm²) and juniper (2 mln teliospores per 1 cm²) was determined. The death due to rust of annual shoots of pear and individual plants of the Cossack juniper was ascertained. The invasion of *G. sabinae* on the territory of Belarus coincides with the wide introduction of susceptible species of juniper into landscaping.

Keywords: pear rust; *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter; juniper; invasion; Belarus.

Acknowledgements. The author expresses his gratitude to A. V. Chashinsky, PhD (agricultural sciences), for his help in collecting the material and to I. A. Fedyushko, assistant at the department of botany, for his help in preparing the map of pear rust distribution.

Введение

Ржавчина груши, эпифитотия которой разразилась в Беларуси в 2019 г. и продолжается до настоящего времени (хотя и в меньшей степени), – новое для республики, но известное в фитопатологии и микологии заболевание. По данным Глобальной информационной системы о биоразнообразии (*Global Biodiversity Information Facility*, GBIF)¹, болезнь широко распространена в странах Европы, Азии (Япония, Китай), на севере Африки, на восточном и западном побережье Северной Америки (США, Канада) [1; 2]. В Бельгии и Словении являющийся возбудителем заболевания гриб отмечен как инвазивный [3–5].

На Европейском континенте ржавчину груши вызывают виды *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter (syn. *G. fuscum* DC.) и *G. dobrozracovae* Mitr. [6; 7, с. 384–385]. Первый из них поражает в основном листья, второй – преимущественно ветви, реже листья и плоды. В Японии, Китае и Корее в качестве возбудителя ржавчины распространен вид *G. asiaticum* Miyabe ex G. Yamada [8]. Этот вид также указан для Дании, а в США он отмечен как инвазивный.

Наиболее часто встречается и имеет важное экономическое значение европейская ржавчина груши (возбудитель *G. sabinae*), распространение которой значительно усилилось в 2000-х гг. [6]. Особенно от этой болезни страдают грушевые сады с органической технологией возделывания и грушевые деревья на приусадебных участках [9; 10].

Гриб *G. sabinae* является облигатным паразитом на растениях и представляет собой гетеросексуальный демициклический (с отсутствием урединий) ржавчинный гриб, который зимует в ветвях можжевельника. Для прохождения полного жизненного цикла этого патогена, его успешного размножения и расселения необходимо наличие двух растений-хозяев – груши и можжевельника [11; 12, с. 384–385]. Именно на можжевельнике, который является основным (первичным) хозяином для возбудителя болезни, формируются следующие стадии развития ржавчины – телии с телиоспорами и базидии с базидиоспорами. Груша же является промежуточным (вторичным) хозяином для видов *G. sabinae*, *G. asiaticum* и *G. dobrozracovae*.

Заболевшая ржавчиной груша постепенно замедляет свой рост, теряет зимостойкость и сопротивляемость другим болезням. В ее листьях накапливаются фенольные соединения [13]. При сильном развитии заболевание вызывает преждевременный листопад, снижает урожай и ухудшает общее состояние дерева (вплоть до его гибели) [14]. Сведения о потерях урожая противоречивы – от 5 до 50–100 % [7, с. 384–385; 14].

Биологический цикл возбудителя европейской ржавчины груши начинается на восприимчивых видах можжевельника. В ряде исследований с разной степенью детализации описаны симптомы поражения, приведены варьирующие сроки их проявления, образования телиоспор и начала распространения базидиоспор, заражающих грушу [5; 14–19]. Хотя жизнеспособность базидиоспор на воздухе и при прямом

¹*Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter // GBIF backbone taxonomy [Electronic resource]. URL: <https://doi.org/10.15468/39omei> (date of access: 26.07.2022).

солнечном освещении невысока [20, p. 577], есть сведения о том, что при благоприятных условиях они могут вызвать незначительное заражение груши даже в 60 км от источника инфекции. Особенно сильное заражение происходит, когда груша и можжевельник растут рядом [14; 21]. Так, на расстоянии 30 м от можжевельника могут заболеть до 100 % листьев груши. Период выхода базидиоспор в целом зависит от погодных условий, но, как правило, совпадает с началом распускания почек груши [4]. В разных регионах на можжевельнике отмечается несколько волн спорообразования (от 3 до 9 раз) [14; 16].

Базидиоспоры вызывают первичное заражение листьев груши. На них появляются яркие желто-оранжевые пятна, на верхней стороне которых формируются спермогонии (пикнии) с гаплоидными пикниоспорами. Сами пикниоспоры не являются инфекционными структурами и не вызывают заражения новых листьев, но, сливаясь между собой, они выполняют важную функцию дикариотизации мицелия. Только дикариотический мицелий способен к дальнейшему распространению и развитию других типов спороношения ржавчинных грибов. На нижней стороне листа в пределах пятна дикариотический мицелий формирует следующий тип спороношения – эции с эциоспорами [12, с. 384–385], которые с августа по ноябрь заражают можжевельник, продолжая жизненный цикл патогена [22]. Бессимптомный период развития гриба в ветвях можжевельника длится 1,5–3,0 года и заканчивается весной формированием телий с телиоспорами. То есть зимующей стадией патогена является многолетний мицелий [5].

Анализ публикаций показывает, что в качестве первичного хозяина для *G. sabinae* указываются девять видов можжевельника: в европейских странах – *Juniperus sabina* L. (можжевельник казацкий), *J. virginiana* L. (можжевельник виргинский), *J. chinensis* L. (можжевельник китайский), *J. × media* Melle (можжевельник средний), *J. scopulorum* Sarg. (можжевельник скальный), *J. excelsa* M. Bieb. (можжевельник древовидный, или высокий), *J. oxycedrus* L. (можжевельник красный); в Узбекистане – *J. seravschanica* Kom. (syn. *J. excelsa* ssp. *seravschanica* (Kom.) R. Kam. ex Imch.) (можжевельник зеравшанский) и *J. pseudosabina* Fisch. & C. A. Mey. (syn. *J. turkestanica* Kom.) (можжевельник ложноказацкий) [5; 13; 15; 23–25]. Среди восприимчивых можжевельников отмечены не только виды, но и многочисленные сорта, используемые в озеленении. Они также становятся постоянным источником инфицирования грушевых деревьев. Подчеркнуто, что виды родов *Thuja* и *Chamaecyparis*, а также вид *J. communis* L. (можжевельник обыкновенный) не поражаются грушевой ржавчиной [5].

В русскоязычных изданиях по фитопатологии в 1970–80-х гг. регионами распространения ржавчины груши и обусловленных ею больших потерь назывались Молдова, Северный Кавказ и Закавказье, южное побережье Крыма, Краснодарский и Ставропольский край, Грузия [14; 25]. На этой территории были выделены зона высокой вредоносности (1 раз в 2 года поражение составляет 50–100 %), зона средней вредоносности (1 раз в 3 года поражение составляет 30–50 %) и зона слабой вредоносности (1 раз в 5 лет поражение составляет 15–30 %). Севернее Киева на груше ржавчина не наблюдалась [12, с. 384–385]. В настоящее время отмечено распространение заболевания в северном направлении [26] (в частности, в Нечерноземной зоне России), вызвавшее в 2015 г. эпифитотию практически на всех сортах груши. Высказано предположение, что эта ситуация связана с изменением климата, расширением площадей посадок и сортового состава культуры, а также активным использованием в озеленении и ландшафтном дизайне можжевельников – первичных хозяев возбудителя болезни [26; 27].

Информация о ржавчине груши в Беларуси и ее вредоносности в научных публикациях крайне ограничена. Вместе с тем очевидно, что это новое для территории республики заболевание должно быть охарактеризовано. Это даст возможность понять причины его появления, особенности течения болезни и перспективы борьбы с ней.

Материалы и методы исследования

Обследование груши и можжевельника для выявления симптомов ржавчины проводилось выборочно во всех областях республики на приусадебных и дачных участках, в парках, коллекционных посадках, зеленых зонах и лесополосах. Пораженные листья и побеги гербаризировались с регистрацией сорта, места и даты сбора. Спороношение исследовали с использованием бинокля (*Carl Zeiss*, Германия) и микроскопа Axiolab (*Carl Zeiss*). С помощью морфометрических методов определяли количественные характеристики объектов (выборка 20–25 листьев). Площадь листьев вычисляли согласно работе [28], интенсивность спорообразования на единицу пораженной поверхности – в соответствии с методическими указаниями [29]. Проращивание эцио- и телиоспор проводили на картофельно-глюкозной среде и в капле воды с внесением фрагментов листьев растений-хозяев (хвой можжевельника или листьев груши). Искусственное заражение листьев груши осуществляли общеизвестными фитопатологическими методами [30, с. 139–151].

Для построения карты распространения ржавчины груши в дополнение к гербарным сборам использовали сведения портала *gbif.org*.

Результаты и их обсуждение

Развитие ржавчины на груше. Для Беларуси ржавчина груши – сравнительно новое заболевание. В специализированных изданиях по болезням плодовых культур Беларуси в 2008–2010 гг. [31, с. 39–40] эта проблема не упоминалась. Лишь начиная с 2013 г. в научных публикациях появляются первые сообщения о выявлении ржавчины на груше [32–34] и можжевельнике казацком [35], хотя единичные симптомы заболевания на груше отмечены автором еще в 2007 г.

Если в предыдущие годы ржавчина незначительно поражала листья груши, то в 2019–2020 гг. в Беларуси наблюдалось широкое распространение и интенсивное развитие заболевания (эпифитотия), что отмечено также в работе [36, с. 29–41]. Наблюдение за фитосанитарным состоянием груши в различных посадках и естественных местообитаниях показало, что особенно сильно грушевые деревья поражаются ржавчиной на приусадебных и дачных участках, в общественных садах и коллекционных посадках областных экоцентров, некоторых селекционных центрах. Симптомы ржавчины отмечены также на листьях дикой груши в лесном массиве возле санатория в Волковысском районе Гродненской области, на территории которого был высажен можжевельник казацкий. На основе гербарных сборов и зарегистрированных мест обитания составлена карта распространения ржавчины груши в Беларуси (рис. 1).

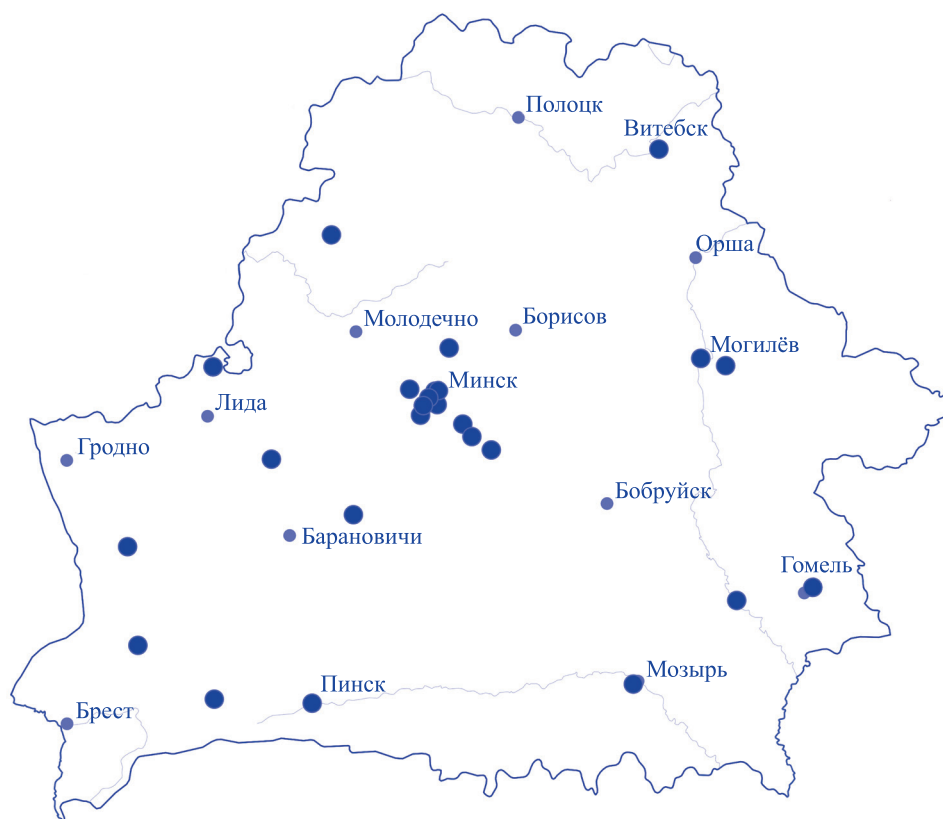


Рис. 1. Распространение ржавчины груши на территории Беларуси
Fig. 1. Distribution of pear rust on the territory of Belarus

Как видно из рис. 1, в настоящее время заболевание встречается во всех областях республики.

По наблюдениям автора, симптомы заболевания на груше проявляются через 2–3 недели после цветения на зеленых частях растения (прежде всего на листовых пластинках, черешках, реже на зеленых веточках и плодах) в виде довольно крупных округлых пятен ярко-желтого (до оранжевого и пурпурного) цвета, иногда с пурпурной каймой. В 2019 г. яркие пятна были окаймлены полосой отмирающей ткани листа (рис. 2, а, б). Характер окраски, количество и размеры пятен, по-видимому, связаны с сортом груши (см. таблицу). Средний диаметр пятен колебался в пределах 6–7 мм, у некоторых сортов достигал 10–20 мм. Количество пятен ржавчины на листе при сильном поражении (в зависимости от размеров листовой пластинки) доходило до 105 шт. При средней площади листа $23,2 \text{ см}^2$ и наличии 48–50 пятен размером $0,42 \text{ см}^2$ каждое снижение зеленой фотосинтезирующей поверхности листа составляло 87–90 %.

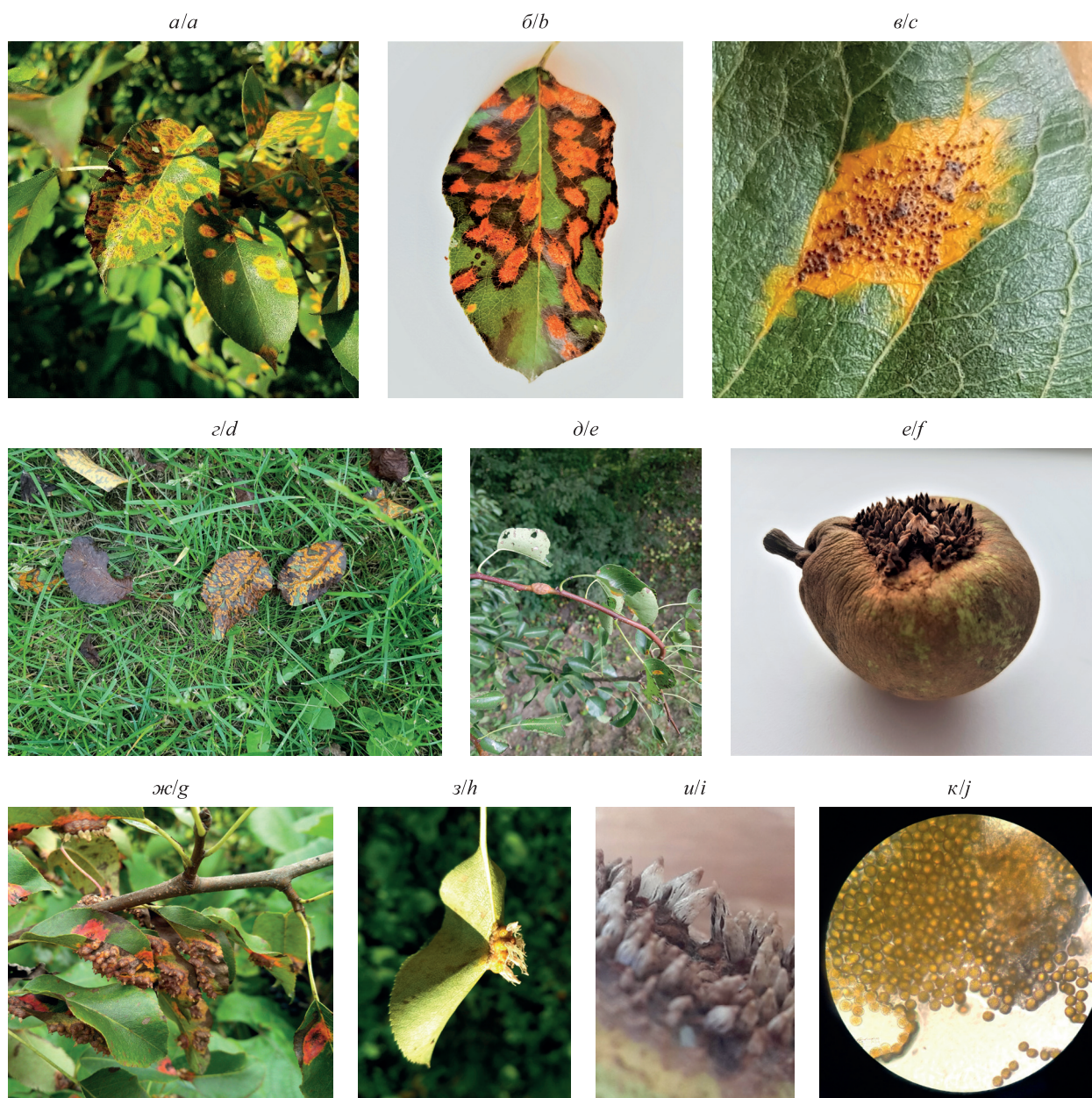


Рис. 2. Симптомы ржавчины на груше:

a, б – пораженные листья разных сортов; *в* – пикнии; *г* – массовая дефолиация;
д – поражение стебля; *е* – больной плод с эциями; *ж* – начало образования эций;
з, и – зрелые вскрывшиеся эции; *к* – эциоспоры

Fig. 2. Symptoms of rust on a pear:

a, b – affected leaves of different varieties; *c* – picnia; *d* – mass defoliation; *e* – damage to the stem;
f – diseased fruit with aecia; *g* – the beginning of the formation of aecia;
h, i – mature opened aecia; *j* – aeciospores

Со временем на верхней стороне пятен в центре появляются темнеющие при созревании точечные спермогонии (пикнии). Центральная часть пятна темнеет, ткани некротизируются (рис. 2, в). В спермогониях формируются мелкие гаплоидные спермации. Пятна становятся липкими от сахаристых выделений, привлекающих насекомых. Количество спермогоний, развивающихся на одном пятне, колебалось в пределах 50–75 шт., максимальное значение достигало 90 шт. Скорость развития болезни и патогена в годы наблюдения различалась. Так, в 2007 г. на листьях груши сорта Белорусская поздняя в течение вегетационного периода наблюдались немногочисленные пятна, спермогонии начинали формироваться в конце июля и к середине августа были еще незрелыми, светлоокрашенными. В 2019 г. массовое поражение груши отмечалось уже в начале июня, к середине июня на листьях груши сорта Белорусская поздняя насчитывалось до 55 пятен, спермогонии были сформированы. Пораженные листья и завязь начинали массово опадать (рис. 2, г).

Степень поражения и интенсивность образования эциоспор на листьях груши
The degree of damage and the intensity of formation of aeciospores on pear leaves

Место сбора	Дата	Сорт	Среднее количество пятен на лист, шт.	Средний диаметр пятна, мм	Интенсивность спорообразования, шт./см ²
Мозырь	18.08.2019	Чижевская	4	7,0 ± 0,2	1,62 · 10 ⁶
Минск, ботанический сад БГУ	22.08.2019	Белорусская поздняя	11	7,0 ± 0,2	2,75 · 10 ⁶
Минск, частный сектор	30.08.2019	Белорусская поздняя	45	6,0 ± 0,18	5,04 · 10 ⁶
Минск, Центральный детский парк имени М. Горького	16.09.2019	Неизвестен	24	9,0 ± 0,2	9,05 · 10 ⁶
Мозырь	15.09.2019	Чижевская	15	7,0 ± 0,3	3,21 · 10 ⁶
Минск, частный сектор	17.09.2019	Белорусская поздняя	68	7,0 ± 0,2	15,04 · 10 ⁶

На листьях и завязи, оставшихся на дереве, с нижней стороны пятен постепенно формируются группы серо-белых конусовидных выростов (эций), в которых находится масса эциоспор размером от 20 × 24 до 24 × 29 мкм. При созревании эции вскрываются продольно, споры высыпаются (рис. 2, *e – u*). На опавших листьях, несмотря на наличие пикниоспор, эциостадия не сформировалась.

В данной работе определена интенсивность спорообразования на листьях груши, так как этот показатель характеризует ее инфекционную способность. Как видно из таблицы, на всех сортах груши интенсивность спорообразования в эциях велика, что свидетельствует о ее высоком инфекционном потенциале. Сорт Чижевская в настоящем исследовании имел сравнительно меньше инфекционных пятен и наименьшее количество эциоспор, что согласуется с данными литературы, где этот сорт характеризуется как относительно устойчивый к ржавчине [36, с. 29–41].

Популярный сорт Белорусская поздняя значительно поражался в разных локалитетах. Различия в степени поражения сортов груши приведены также в работах [23; 36, с. 29–41; 37], при этом иммунных сортов авторами не отмечено. Согласно работе [38] абсолютную устойчивость проявляют только межродовые гибриды F₁ груши и яблони, груши и рябины обыкновенной, груши и рябины мучнистой, а также гибриды F₂ груши и рябины обыкновенной.

Необходимо отметить, что, несмотря на сильное поражение листьев, верхушечные почки побегов в год эпифитотии сформировали побеги продолжения (годовой прирост), листья которых до конца вегетации оставались полностью здоровыми. Очевидно, эти побеги развились уже после окончания весеннего лёта базидиоспор и периода восприимчивости листьев, который составляет 12 дней [14]. Кроме того, данный факт свидетельствует о том, что перезаражение листьев груши в течение лета пикниоспорами с других листьев или эциоспорами не происходит.

Вредоносность ржавчины груши проявилась не только в виде массового опадения листьев (2019), но и в отмирании после зимы побегов прироста, а также почек, сформировавшихся в год эпифитотии.

На рис. 3, *a*, можно видеть, что в месте прикрепления укороченного побега, листья на котором были сильно поражены в прошлом сезоне, образуется своеобразный бородавчатый опробковевший нарост. Кроме того, наблюдаются отмирание тканей и высыхание стебля по всем направлениям. В результате уже следующей после эпифитотии весной весь годичный прирост оказался отмершим, почки не распустились (рис. 3, *b*).

При вскрытии нароста обнаружены перезимовавшие эциоспоры ржавчины, которые, предположительно, могли бы участвовать в заражении можжевельника в следующий вегетационный период. Однако прорастить эциоспоры в воде, в капле воды с добавлением хвои можжевельника казацкого и на агаризованной среде не удалось.

Поскольку в течение 2019–2020 гг. автором не найден источник ржавчины на основном хозяине – можжевельнике казацком, но при этом обнаружены эциоспоры на перезимовавших побегах груши, была предпринята попытка заразить молодые побеги груши перезимовавшими эциоспорами ржавчины. Заражения листьев не произошло, что лишний раз доказывает: источником инфекции для груши являются только виды можжевельника, на которых образуются телио- и базидиоспоры. Подобный результат подтвержден и другими исследователями ржавчины груши [4; 39]. В связи с этим говорить о жизнеспособности и инфекционной способности перезимовавших эциоспор мы не можем, хотя сами споры не имели значительной деформации.

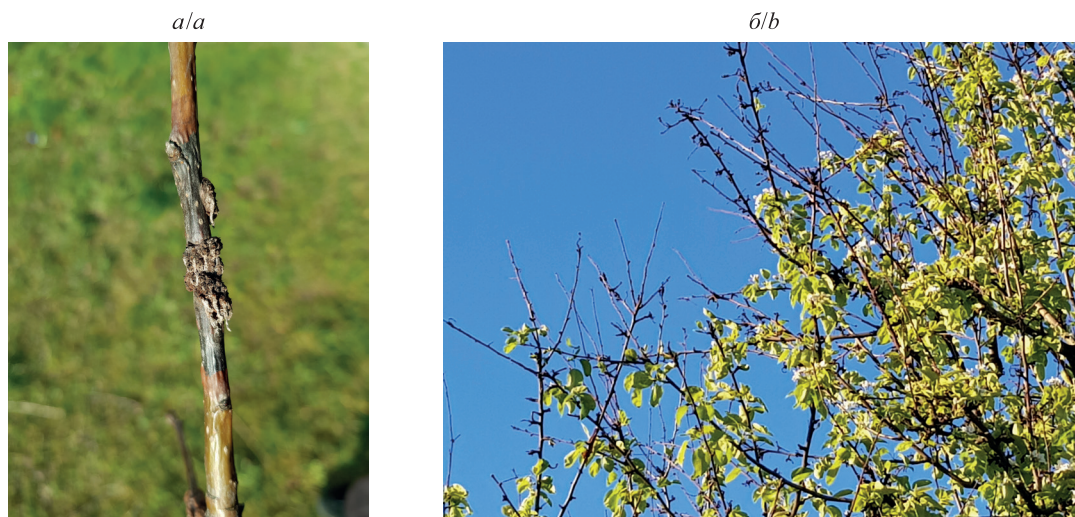


Рис. 3. Отмирание побегов груши после эпифитотии 2019 г. и последующей зимы:
а – отмирающая ветвь груши; б – общий вид дерева весной
после сильного поражения ржавчиной

Fig. 3. Withering away of pear shoots after epiphytoty in 2019 and subsequent winter:
a – a dying branch of a pear; b – general view of a tree
in the spring after a strong rust attack

В годы после эпифитотии ржавчины значительно снизилась устойчивость деревьев к другим заболеваниям, таким как парша и плодовая гниль. В результате общего ослабления переболевших ржавчиной грушевых деревьев произошло массовое отмирание отдельных ветвей и гибель некоторых экземпляров.

Развитие ржавчины на можжевельнике. Можжевельник казацкий известен как основной хозяин, наличие которого определяет распространение *G. sabinae* на груше. Только весной 2021 г. автору удалось наблюдать массовое поражение ржавчиной можжевельника казацкого из разных районов Беларуси.

Ветви можжевельника, пораженные ржавчиной, в местах развития гриба заметно утолщены (рис. 4, а), ранней весной на них видны сухие коричневые образования – телии (телейтолож) (рис. 4, б). На телиях обнаружены два типа перезимовавших двухклеточных яйцевидно-ромбических телиоспор – темные и светлые. Их соотношение было примерно одинаковым (20 темных и 17 светлых телиоспор) (рис. 4, ж). Спровоцировать прорастание перезимовавших телиоспор *in vitro*, как и эциоспор, не удалось.

К середине мая на ветвях и хвое можжевельника казацкого после повышения среднесуточной температуры с 7,0 до 14,5 °С и влажности воздуха с 66 до 83 % появились обильные ярко-оранжевые роговидные выросты длиной до 7–8 мм (рис. 4, в), представляющие собой столбики телиоспор. Через несколько дней выросты преобразились в желеобразную массу, содержащую телиоспоры размером от 15 × 40 до 24 × 52 мкм на ослизняющихся гиалиновых ножках (рис. 4, з). Примерно через 10 дней после образования на ветвях ярких наростов наблюдалось массовое прорастание вновь образованных телиоспор (рис. 4, з, и).

На рис. 4, з, видно, что как темные, так и светлые телиоспоры образуют четырехклеточные фрагмобазидии, т. е. функционально они равноценны. Каждая из двух клеток телиоспор формирует одну фрагмобазидию, на которой образуются четыре мелкие округлые базидиоспоры. Интенсивность образования телиоспор на можжевельнике казацком составляет $2,1 \cdot 10^6$ шт. на 1 см².

Наряду с формированием фрагмобазидий наблюдалось прорастание телиоспор гифами. Подобное явление отмечено также в работе [16]. Вероятно, такой способ прорастания обеспечивает патогену возможность повторного заражения побегов можжевельника дикариотическим мицелием.

Как видно из полученных данных, и груша, и можжевельник имеют высокий инфекционный потенциал. Отсюда очевидна опасность ржавчины не только для груши, но и для декоративных форм можжевельника, в первую очередь можжевельника казацкого, который наиболее широко используется в озеленении в Беларуси. Проведенные наблюдения подтвердили гибель растений можжевельника казацкого по этой причине (рис. 4, д, е). Ржавчина на других видах можжевельника автором не обнаружена.



Рис. 4. Симптомы ржавчины на можжевельнике казацком:
а – утолщенная ветвь; б – телеитоложа; в, г – телии с телиоспорами; д, е – отмирающий можжевельник;
ж – телиоспоры; з – начало прорастания телиоспор; и – образование фрагмобазидий с базидиоспорами

Fig. 4. Symptoms of rust on the Cossack juniper:
а – thickened branch; б – teleitole; в, г – telia with teliospores; д, е – dying juniper; г – teliospores;
ж – beginning of teliospore germination; и – formation of phragmobasidia with basidiospores

На данный момент в Беларуси в государственный реестр сортов включены декоративные сорта видов *J. sabina*, *J. virginiana* (с 2011 г. (оба вида)), *J. horizontalis*, *J. squamata*, *J. chinensis*, *J. pfitzeriana* (Späth) P. A. Schmidt (syn. *J. × media* Melle) (с 2007 г. (все указанные виды)), *J. scopulorum* (с 2021 г.) [40, с. 87–88]. Из них лишь *J. horizontalis* и *J. squamata* не поражаются ржавчиной [5; 39]. Таким образом, достаточно длительное выращивание восприимчивых к ржавчине видов можжевельника, вместе с которыми патоген, очевидно, и был занесен в Беларусь, стало причиной инвазии возбудителя заболевания. Результаты инвазии особенно сильно проявились на груше, вызвав массовое поражение ржавчиной и ослабление деревьев этой традиционной приусадебной культуры (вплоть до ее гибели). Кроме того, они начали проявляться на декоративных формах можжевельника. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что на тех территориях, где нет посадок можжевельника казацкого, ржавчина на груше отсутствует.

Заключение

Впервые ржавчина груши в Беларуси была отмечена автором в гербарных сборах в 2007 г. (в научных публикациях упоминается с 2013 г.), а уже в 2019–2020 гг. наблюдалась эпифитотия этого нового для республики заболевания. Возбудителем ржавчины является базидиальный гриб *G. sabinae*. Причиной инвазии опасного патогена, по-видимому, стало широкое внедрение в практику озеленения основного хозяина гриба – можжевельника казацкого, в ветвях которого мицелий ржавчинного гриба может сохраняться в течение многих лет. Карта распространения ржавчины груши в Беларуси показывает присутствие патогена во всех областях республики. Установлено, что у груши ржавчина не только поражает листья и завязь, вызывая их преждевременное опадение, но и приводит к гибели прироста побегов текущего года выше места поражения ржавчиной. Эцио- и телиоспоры сохраняются в перезимовавших побегах груши и можжевельника, однако их роль как инфекционных структур не доказана. Впервые определена интенсивность спорообразования на листьях груши и побегах можжевельника казацкого, которая свидетельствует о высоком инфекционном потенциале патогена.

Установлено, что поражение можжевельника казацкого ржавчиной через некоторое время также приводит его к гибели.

Очевидно, оптимальное решение возникшей проблемы состоит в классическом фитопатологическом подходе: необходимо разорвать жизненный цикл возбудителя заболевания, постепенно заменив в озеленении восприимчивые формы можжевельника на устойчивые, или отказаться от выращивания груши на близлежащих территориях. При этом стоит принимать во внимание, что селекция новых устойчивых к ржавчине сортов груши является долговременным и дорогостоящим процессом, пока не имеющим аналогов, а опрыскивание фунгицидами, которое в определенной степени защищает растения, несовместимо с развитием органического земледелия.

Библиографические ссылки

1. Habib W, Wakim S, Hobeika C, Choueiri E. First report of *Gymnosporangium sabinae* on cultivated pear in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*. 2012;94(4 supplement):S4.104.
2. Gjørum HB, Gauslaa Y, Talgø V. *Gymnosporangium sabinae* found in Norway. *Plant Pathology*. 2008;57(2):376. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01730.x.
3. Lāce B. *Gymnosporangium* species – an important issue of plant protection. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*. 2017;71(3):95–102.
4. Juhásová G, Praslička J. Occurrence and harmful effects of *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) Winter in Slovak Republic. *Plant Protection Science*. 2002;38(3):89–93. DOI: 10.17221/4856-PPS.
5. Karlsson K. *Distribution of Gymnosporangium fuscum and its implication on pear cultivation in Sweden*. Alnarp: Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences; 2008. 38 p.
6. Helfer S. Overview of the rust fungi (Uredinales) occurring on Rosaceae in Europe. *Nova Hedwigia*. 2005;81(3–4):325–370. DOI: 10.1127/0029-5035/2005/0081-0325.
7. Пересыпкин ВФ. *Сельскохозяйственная фитопатология*. 4-е издание. Минск: Агропромиздат; 1989. 480 с.
8. Cummins GB, Hiratsuka Y. *Illustrated genera of rust fungi*. 3rd edition. Saint Paul: American Phytopathological Society Press; 2003. 223 p.
9. Kellerhals M, Szalatnay D, Hunziker K, Duffy B, Nybon H, Ahmadi-Afzadi M, et al. European pome fruit genetic resources evaluated for disease resistance. *Trees*. 2012;26(1):179–189. DOI: 10.1007/s00468-011-0660-9.
10. Filipp M, Spornberger B, Schildnerger B. Monitoring of pear rust (*Gymnosporangium sabinae*) in Austria and implications for possible control strategies. In: *Ecofruit. Proceedings of the 15th International conference on organic fruit-growing; 2012 February 20–22; Hohenheim, Germany*. Weinsberg: Foerdergemeinschaft Oekologischer Obstbau e. V.; 2012. p. 65–73.
11. Купревич ВФ, Траншель ВГ. *Ржавчинные грибы. Выпуск 1. Семейство мелямносоровые*. Москва: Издательство Академии наук СССР; 1957. 420 с. (Савич ВП, редактор. Флора споровых растений СССР; том 4).
12. Грушевой СЕ. *Сельскохозяйственная фитопатология*. Москва: Колос; 1965. 448 с.
13. Kalisz S, Oszmiański J, Wojdyło A. Increased content of phenolic compounds in pear leaves after infection by the pear rust pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2015;91:113–119. DOI: 10.1016/j.pmpp.2015.07.001.

14. Митрофанова ОВ. *Ржавчина груши и меры борьбы с ней*. Симферополь: Крым; 1970. 46 с.
15. Ruske E, Dörfelt H. Studien zur Lebensgeschichte des Rostpilzes *Gymnosporangium sabinae*. *Hercynia N. F.* 2010;43(2):277–298.
16. Hilber U, Schüepp H, Schwinn FJ. Studies on infection biology of *Gymnosporangium fuscum* DC. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 1990;97(3):299–305.
17. Gebauer J, Ebert G, Büttner C. Birnengitterrost – eine zunehmende Gefahr in unseren Kleingärten (pear rust – an increasing threat for pear trees in allotments and gardens). *Gesunde Pflanzen*. 2001;53(2):44–47.
18. Hau B, de Vallavieille-Pope C. Wind-dispersed diseases. In: Cooke BM, Jones DG, Kaye B, editors. *The epidemiology of plant diseases*. 2nd edition. Dordrecht: Springer; 2006. p. 387–416. DOI: 10.1007/1-4020-4581-6_15.
19. Pearson RC, Seem RC, Meyer FW. Environmental factors influencing the discharge of basidiospores of *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Phytopathology*. 1980;70(3):262–266. DOI: 10.1094/Phyto-70-262.
20. Agrios GN. *Plant pathology*. 4th edition. San Diego: Academic Press; 1997. XVI, 635 p.
21. Ormrod DJ, O'Reilly HJ, van der Kamp BJ, Borno C. Epidemiology, cultivar susceptibility, and chemical control of *Gymnosporangium fuscum* in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1984;6(1):63–73. DOI: 10.1080/07060668409501592.
22. Schildberger B. Untersuchungen zur Biologie des Birnengitterrostes (*Gymnosporangium sabinae*) und zum Befallsverlauf an der Birne. In: *Mitteilungen Klosterneuburg. Wissenbericht 2011*. Klosterneuburg: Höhere Bundeslehranstalt für Wein- und Obstbau; 2011. S. 173–176.
23. Булгаков ТС. Грибы на хвойных растениях в условиях Ростовской области. В: *Молодежь XXI века – будущее российской науки. Сборник материалов докладов 5-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых; 14–17 мая 2007 г.; Ростов-на-Дону, Россия. Выпуск 3, том 1*. Ростов-на-Дону: ЦВВР; 2007. с. 9–11.
24. Mustafaev IM, Islomiddinov ZSh, Iminova MM, Ortqov IZ. Distribution of species of the genus *Gymnosporangium* (Pucciniales) in Uzbekistan. *Ukrainian Botanical Journal*. 2021;78(1):39–46. DOI: 10.15407/ukrbotj78.01.039.
25. Поликсенова ВД, Храмов АС, Стадниченко МА, Грушецкая ЗЕ, Кононович СА. Об инвазии *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter и эпифитотии ржавчины груши в Беларуси. В: Тихомиров ВН, Поликсенова ВД, Карпук ВВ, Гельтман ДВ, Аначков Г, Сенников АН, редакторы. *Актуальные проблемы изучения и сохранения фито- и микробиоты. Материалы III Международной научно-практической конференции; 11–13 ноября 2020 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2020. с. 54–56.
26. Зейналов АС. Эпифитотия ржавчины на груше в Подмосковье и способы ее ограничения. *Садоводство и виноградарство*. 2016;6:23–28.
27. Антоненко ВВ, Зубков АВ, Кручина СН. Особенности развития грибных болезней яблони и груши в условиях Черноземья. *Вестник аграрной науки*. 2020;2:9–14. DOI: 10.17238/issn2587-666X.2020.2.9.
28. Киселева НС. Способ вычисления площади листа груши по линейным измерениям с помощью расчетных коэффициентов и методов вариационной статистики. *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(1):211–217. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.211rus.
29. Поликсенова ВД, Храмов АС, Пискун СГ. *Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4-го курса дневного отделения специальности G 31 01 01 «Биология»*. Минск: БГУ; 2004. 36 с.
30. Дорожкин НА, Неофитова ВК, Бельская СИ, Бондарь ЛВ, Чекалинская НИ, Нитиевская ВИ и др. *Методы повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к болезням*. Минск: Наука и техника; 1982. 216 с.
31. Крикунова НИ, Супранович РВ, Ярчаковская СИ. *Вредители и болезни плодово-ягодных, овощных культур и картофеля*. Минск: Белорусская наука; 2007. 169 с.
32. Храмов АС. Материалы о разнообразии головневых и ржавчинных грибов Национального парка «Нарочанский». В: Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси. *Ботаника (исследования)*. Выпуск 42. Минск: Институт радиологии; 2013. с. 136–150.
33. Поликсенова ВД, Храмов АС. Чужеродные фитопатогенные микромицеты Беларуси. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2015;3:43–48.
34. Комардина ВС. Фитосанитарное состояние и структура доминирования патогенных микроорганизмов в молодых семечковых садах Беларуси. *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада*. 2017;144(2):181–185.
35. Беломесяцева ДБ, Гапиев ОА, Звягинцев ВБ, Жданович СА. Инвазивные виды фитопатогенных организмов в Беларуси и сопредельных странах. В: Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси. *Ботаника (исследования)*. Выпуск 42. Минск: Институт радиологии; 2013. с. 87–98.
36. Колтун НЕ, Комардина ВС. *Защита молодых насаждений и питомников семечковых культур от вредных организмов*. Минск: Институт системных исследований в АПК НАН Беларуси; 2014. 63 с.
37. Кондратёнок ЮГ, Якимович ОА, Марцинкевич ТН. Ржавчина груши (*Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter) – опасная грибная болезнь. В: Таранов АА, Матвеев ВА, Шибут ЖВ, Баранов ОЮ, Криворот АМ, Кухарчик НВ и др., редакторы. *Плодоводство*. Том 33. Минск: Белорусская наука; 2021. с. 205–210.
38. Долматов ЕА, Хрыкина ТА. Источники устойчивости к ржавчине груши. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*. 2021;1:42–45. DOI: 10.30850/vrsn/2021/1/42-45.
39. Lāce B, Bankina B. Evaluation of European pear rust severity depending on agro-ecological factors. In: *Research for rural development 2013. Annual 19th International scientific conference proceedings; 2013 May 15–17; Jelgava, Latvia. Volume 1*. Jelgava: Latvia University of Agriculture; 2013. p. 6–12.
40. Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений. *Государственный реестр сортов*. Минск: [б. и.]; 2021. 279 с.

References

1. Habib W, Wakim S, Hobeika C, Choueiri E. First report of *Gymnosporangium sabinae* on cultivated pear in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*. 2012;94(4 supplement):S4.104.
2. Gjærum HB, Gauslaa Y, Talgø V. *Gymnosporangium sabinae* found in Norway. *Plant Pathology*. 2008;57(2):376. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01730.x.

3. Lāce B. *Gymnosporangium* species – an important issue of plant protection. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*. 2017;71(3):95–102.
4. Juhásová G, Praslička J. Occurrence and harmful effects of *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) Winter in Slovak Republic. *Plant Protection Science*. 2002;38(3):89–93. DOI: 10.17221/4856-PPS.
5. Karlsson K. *Distribution of Gymnosporangium fuscum and its implication on pear cultivation in Sweden*. Alnarp: Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences; 2008. 38 p.
6. Helfer S. Overview of the rust fungi (Uredinales) occurring on Rosaceae in Europe. *Nova Hedwigia*. 2005;81(3–4):325–370. DOI: 10.1127/0029-5035/2005/0081-0325.
7. Peresypkin VF. *Sel'skokhozyaistvennaya fitopatologiya* [Agricultural phytopathology]. 4th edition. Minsk: Agropromizdat; 1989. 480 p. Russian.
8. Cummins GB, Hiratsuka Y. *Illustrated genera of rust fungi*. 3rd edition. Saint Paul: American Phytopathological Society Press; 2003. 223 p.
9. Kellerhals M, Szalatnay D, Hunziker K, Duffy B, Nybon H, Ahmadi-Afzadi M, et al. European pome fruit genetic resources evaluated for disease resistance. *Trees*. 2012;26(1):179–189. DOI: 10.1007/s00468-011-0660-9.
10. Filipp M, Spornberger B, Schildnerger B. Monitoring of pear rust (*Gymnosporangium sabinae*) in Austria and implications for possible control strategies. In: *Ecofruit. Proceedings of the 15th International conference on organic fruit-growing; 2012 February 20–22; Hohenheim, Germany*. Weinsberg: Foedergemeinschaft Oekologischer Obstbau e. V.; 2012. p. 65–73.
11. Kuprevich VF, Transhel' VG. *Rzhavchinnye griby. Vypusk 1. Semeistvo melampsorovyie* [Rust fungi. Issue 1. Family Melampsoraceae]. Moscow: Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR; 1957. 420 p. (Savich VP, editor. Flora sporovykh rastenii SSSR; volume 4). Russian.
12. Grushevoi SE. *Sel'skokhozyaistvennaya fitopatologiya* [Agricultural phytopathology]. Moscow: Kolos; 1965. 448 p. Russian.
13. Kalisz S, Oszmiański J, Wojdyło A. Increased content of phenolic compounds in pear leaves after infection by the pear rust pathogen. *Physiologia and Molecular Plant Pathology*. 2015;91:113–119. DOI: 10.1016/j.pmpp.2015.07.001.
14. Mitrofanova OV. *Rzhavchina grushi i mery bor'by s nei* [Pear rust and measures to combat it]. Simferopol: Krym; 1970. 46 p. Russian.
15. Ruske E, Dörfelt H. Studien zur Lebensgeschichte des Rostpilzes *Gymnosporangium sabinae*. *Hercynia N. F.* 2010;43(2):277–298.
16. Hilber U, Schüepp H, Schwinn FJ. Studies on infection biology of *Gymnosporangium fuscum* DC. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 1990;97(3):299–305.
17. Gebauer J, Ebert G, Büttner C. Birnengitterrost – eine zunehmende Gefahr in unseren Kleingärten (pear rust – an increasing threat for pear trees in allotments and gardens). *Gesunde Pflanzen*. 2001;53(2):44–47.
18. Hau B, de Vallavieille-Pope C. Wind-dispersed diseases. In: Cooke BM, Jones DG, Kaye B, editors. *The epidemiology of plant diseases*. 2nd edition. Dordrecht: Springer; 2006. p. 387–416. DOI: 10.1007/1-4020-4581-6_15.
19. Pearson RC, Seem RC, Meyer FW. Environmental factors influencing the discharge of basidiospores of *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Phytopathology*. 1980;70(3):262–266. DOI: 10.1094/Phyto-70-262.
20. Agrios GN. *Plant pathology*. 4th edition. San Diego: Academic Press; 1997. XVI, 635 p.
21. Ormrod DJ, O'Reilly HJ, van der Kamp BJ, Borno C. Epidemiology, cultivar susceptibility, and chemical control of *Gymnosporangium fuscum* in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1984;6(1):63–73. DOI: 10.1080/07060668409501592.
22. Schildberger B. Untersuchungen zur Biologie des Birnengitterrostes (*Gymnosporangium sabinae*) und zum Befallsverlauf an der Birne. In: *Mitteilungen Klosterneuburg. Wissenbericht 2011*. Klosterneuburg: Höhere Bundeslehranstalt für Wein- und Obstbau; 2011. S. 173–176.
23. Bulgakov TS. [Fungi on coniferous plants in the conditions of the Rostov Region]. In: *Molodezh' XXI veka – budushchee rossiiskoi nauki. Sbornik materialov dokladov 5-i Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh; 14–17 maya 2007 g.; Rostov-na-Donu, Rossiya. Vypusk 3, tom 1* [The youth of the 21st century – the future of Russian science. Collection of materials of reports of the 5th All-Russian scientific and practical conference of students, postgraduate students and young scientists; 2007 May 14–17; Rostov-on-Don, Russia. Issue 3, volume 1]. Rostov-na-Donu: TsVVR; 2007. p. 9–11. Russian.
24. Mustafaei IM, Islomiddinov ZSh, Iminova MM, Ortiqov IZ. Distribution of species of the genus *Gymnosporangium* (Pucciniales) in Uzbekistan. *Ukrainian Botanical Journal*. 2021;78(1):39–46. DOI: 10.15407/ukrbotj78.01.039.
25. Poliksenova VD, Khramtsov AK, Stadnichenko MA, Gruschetskaya ZE, Kononovich SA. About invasion *Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter and epiphytosity of pear rust in Belarus. In: Tikhomirov VN, Poliksenova VD, Karpuk VV, Gel'tman DV, Anachkov G, Sennikov AN, editors. *Aktual'nye problemy izucheniya i sokhraneniya fito- i mikrobioty. Materialy III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 11–13 noyabrya 2020 g.; Minsk, Belarus* [Actual problems of studying and preserving phyto- and microbiota. Proceedings of the 3rd International scientific and practical conference; 2020 November 11–13; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2020. p. 54–56. Russian.
26. Zeynalov AS. Epidemics of rust on pears in the Moscow Region and ways of its limitations. *Horticulture and Viticulture*. 2016; 6:23–28. Russian.
27. Antonenko VV, Zubkov AV, Kruchina SN. Peculiarities of the development of apple trees and pear fungous diseases under the conditions of Non-Black Earth Zone. *Vestnik agrarnoi nauki*. 2020;2:9–14. Russian. DOI: 10.17238/issn2587-666X.2020.2.9.
28. Kiseleva NS. Method of determination of pear leaf area on linear measurements by calculation of correction factors and variation statistics approach. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2017;52(1):211–217. Russian. DOI: 10.15389/agrobiol.2017.1.211rus.
29. Poliksenova VD, Khramtsov AK, Piskun SG. *Metodicheskie ukazaniya k zanyatiyam spetspraktikuma po razdelu «Mikologiya. Metody eksperimental'nogo izucheniya mikroskopicheskikh gribov» dlya studentov 4-go kursa dnevnogo otdeleniya spetsial'nosti G 31 01 01 «Biologiya»* [Guidelines for the special workshop on the section «Mycology. Methods of experimental study of microscopic fungi» for 4th year students of the full-time department of the specialty G 31 01 01 «Biology»]. Minsk: Belarusian State University; 2004. 36 p. Russian.
30. Dorozhkin NA, Neofitova VK, Belskaya SI, Bondar' LV, Chekalinskaya NI, Nitievskaya VI, et al. *Metody povysheniya ustoi-chivosti sel'skokhozyaistvennykh kul'tur k boleznyam* [Methods for increasing the resistance of agricultural crops to diseases]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1982. 216 p. Russian.
31. Krikunova NI, Supranovich RV, Yarchakovskaya SI. *Vrediteli i bolezni plodovo-yagodnykh, ovoshchnykh kul'tur i kartofelya* [Pests and diseases of fruit and berry, vegetable crops and potatoes]. Minsk: Belorusskaya nauka; 2007. 169 p. Russian.

32. Khramtsov AK. Materials about diversity of smut and rust fungi of the «Narochansky» National Park. In: Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich of the National Academy of Sciences of Belarus. *Botanika (issledovaniya). Vypusk 42* [Botany (research). Issue 42]. Minsk: Institut radiologii; 2013. p. 136–150. Russian.
33. Poliksenova VD, Khramtsov AK. [Alien phytopathogenic micromycetes of Belarus]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2015;3:43–48. Russian.
34. Komardina VS. Phytosanitary state and structure domination pathogens in young pome gardens of Belarus. *Woks of the State Nikitsky Botanical Garden*. 2017;144(2):181–185. Russian.
35. Belomesyatseva DB, Gapienko OS, Zvyagintsev VB, Zdanovich SA. The invasive species of phytopathogenic organisms in Belarus and in the adjacent countries In: Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich of the National Academy of Sciences of Belarus. *Botanika (issledovaniya). Vypusk 42* [Botany (research). Issue 42]. Minsk: Institut radiologii; 2013. p. 87–98. Russian.
36. Koltun NE, Komardina VS. *Zashchita molodykh nasazhdenii i pitomnikov semechkovykh kul'tur ot vrednykh organizmov* [Protection of young plantations and nurseries of pome crops from harmful organisms]. Minsk: Institute of System Studies in the Agro-Industrial Complex of the National Academy of Sciences of Belarus; 2014. 63 p. Russian.
37. Kondratyionok YuH, Yakimovich OA, Martsinkevich TN. Dangerous fungal disease – pear mildew (*Gymnosporangium sabinae* (Dicks.) G. Winter). In: Taranov AA, Matveev VA, Shibut ZhV, Baranov OYu, Krivorot AM, Kukharchik NV, et al., editors. *Plodovodstvo. Tom 33* [Fruit-growing. Volume 33]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2021. p. 205–210. Russian.
38. Dolmatov EA, Khrykina TA. Sources of resistance to pear rust. *Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 2021;1:42–45. Russian. DOI: 10.30850/vrsn/2021/1/42-45.
39. Lāce B, Bankina B. Evaluation of European pear rust severity depending on agro-ecological factors. In: *Research for rural development 2013. Annual 19th International scientific conference proceedings; 2013 May 15–17; Jelgava, Latvia. Volume 1*. Jelgava: Latvia University of Agriculture; 2013. p. 6–12.
40. State Inspection for Testing and Protection of Plant Varieties. *Gosudarstvennyi reestr sortov* [State register of varieties]. Minsk: [s. n.]; 2021. 279 p. Russian.

Получена 08.10.2022 / исправлена 08.10.2022 / принята 10.10.2022.
Received 08.10.2022 / revised 08.10.2022 / accepted 10.10.2022.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

SHORT COMMUNICATIONS

УДК 591.113

ОСМОТИЧЕСКАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ В ГЕМОЛИМФЕ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

А. В. СИДОРОВ¹⁾

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

Установлено, что развитие гипергликемии, сопровождаемой многократным увеличением содержания глюкозы в гемолимфе (до 4,0–4,5 ммоль/л), не приводит к изменению осмоляльности во внутренней среде *Lymnaea*. Инкубация моллюсков в 100 ммоль/л водном растворе полиэтиленгликоля-200 на протяжении 2 ч вызывает 1,4-кратное повышение осмоляльности гемолимфы (до 210 мосмоль/кг) по сравнению с контрольным уровнем.

Ключевые слова: осмоляльность; глюкоза; беспозвоночные.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б22-105). Отдельная благодарность выражается младшему научному сотруднику научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета Н. В. Лазерко за методическую помощь в работе с осмометром.

Образец цитирования:

Сидоров АВ. Осмотическая концентрация в гемолимфе моллюска *Lymnaea stagnalis* при острой экспериментальной гипергликемии. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:85–89.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-85-89>

For citation:

Sidorov AV. Hemolymph osmolality in mollusk *Lymnaea stagnalis* during acute experimental hyperglycemia. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:85–89. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-85-89>

Автор:

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

Author:

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>

HEMOLYMPH OSMOLALITY IN MOLLUSK *LYMNAEA STAGNALIS* DURING ACUTE EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA

A. V. SIDOROV^a

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

It has been established that the development of hyperglycemia, accompanied by a multiple increase in the hemolymph glucose content (up to 4.0–4.5 mmol/L), doesn't lead to any significant changes in *Lymnaea's* hemolymph osmolality. Incubation of mollusks in 100 mmol/L aqueous solution of polyethylene glycol 200 for 2 h causes a 1.4-fold increase in hemolymph osmolality (up to 210 mosmol/kg) compared to the control level.

Keywords: osmolality; glucose; invertebrates.

Acknowledgements. This work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project B22-105). Special thanks are addressed to N. V. Lazerko, junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University, for her kind help in osmometer use.

Введение

Количественный и качественный состав внеклеточной жидкости напрямую определяет как свойства нейронов, так и их способность выполнять свои функции. Оказавшись в интерстициальном пространстве, многие из продуктов нормального метаболизма, например глюкоза или различные органические кислоты, начинают выполнять сигнальные функции, непосредственно определяя поведение контактирующих с ними клеток [1]. Кроме того, данные соединения изменяют физико-химические свойства внеклеточной жидкости (рН, осмолярность), что также обуславливает установление нового функционального состояния для целой популяции нейронов согласно принципам объемной передачи сигнала [2].

Ранее было показано, что пролонгированная (2 ч) инкубация моллюсков *Lymnaea stagnalis* в высококонцентрированном (100 ммоль/л) водном растворе глюкозы приводит к примерно 10-кратному повышению содержания глюкозы в их гемолимфе, т. е. развитию острой гипергликемии [3], это сопровождается модификацией некоторых форм поведенческой активности и электрических характеристик нервных клеток [4]. Однако потенциальные осмотические эффекты, связанные с использованием такого высококонцентрированного раствора, учитывая высокую проницаемость покровов моллюска для воды, не были приняты во внимание. В связи с этим целью данной работы было оценить характер сдвигов осмотической концентрации в гемолимфе *L. stagnalis* при развитии экспериментальной гипергликемии.

Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis*, собранных в летний период на территории Минской области (мелкие мелиоративные каналы). В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре (25 ± 1) °C. Смену воды проводили каждые 3 дня. Пищей для моллюсков служили листья одуванчика (питание *ad libitum*).

Животные контрольной группы (Cntr, $n = 7$) в течение 2 ч находились в 1-литровых аквариумах, наполненных «чистой» отстоявшейся водопроводной водой. Особи экспериментальных групп ($n = 7$ для каждой группы) такое же время содержались в свежеприготовленных водных растворах D-глюкозы (Glu (100 ммоль/л)), хлорида натрия (NaCl (50 ммоль/л)) и полиэтиленгликоля-200 (PEG-200 (100 ммоль/л)), подобранных таким образом, чтобы достигалось равенство их теоретически рассчитанных осмотических концентраций. По окончании инкубации сильной тактильной стимуляцией ноги моллюска вызывали реакцию полного втягивания тела, сопровождающуюся выбросом гемолимфы (в среднем объемом около 1 мл).

Содержание глюкозы в гемолимфе определяли глюкозооксидазным методом с применением набора реагентов компании Анализ X (Беларусь). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 500 нм (длина оптического пути 1 см) при температуре 20 °C посредством спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия). Объем материала для анализа составлял 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежеприготовленного 1 или 5 ммоль/л раствора глюкозы. Оценку осмолярности пробы производили с помощью осмометра Vapro 5600 (Wescor Inc., США). В качестве калибровочного стандарта использовали 100 мосмоль/кг водный раствор сорбитола.

Все экспериментальные группы (по 7 особей в каждой) комплектовались животными одинакового размерного класса (см. таблицу). Попарное сравнение морфометрических показателей указанных групп также не выявило статистически значимых различий между анализируемыми рядами данных ни для одной из пар сравнения.

Морфологическая характеристика экспериментальных групп
Morphological characteristics of the experimental groups

Показатели	Экспериментальная группа				Статистика для рядов данных групп
	Cntr	NaCl (50 ммоль/л)	PEG-200 (100 ммоль/л)	Glu (100 ммоль/л)	
Масса	(6,4 ± 0,3) г	(5,6 ± 0,3) г	(5,9 ± 0,5) г	(6,1 ± 0,3) г	$F(3, 24) = 0,829\ 12$; $p = 0,490\ 89$
Высота раковины	(47 ± 1) мм	(46 ± 1) мм	(45 ± 1) мм	(46 ± 1) мм	$F(3, 24) = 0,951\ 01$; $p = 0,431\ 72$

Примечания: 1. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. 2. Статистика для рядов данных групп рассчитана с использованием дисперсионного анализа по однофакторной схеме (one-way ANOVA).

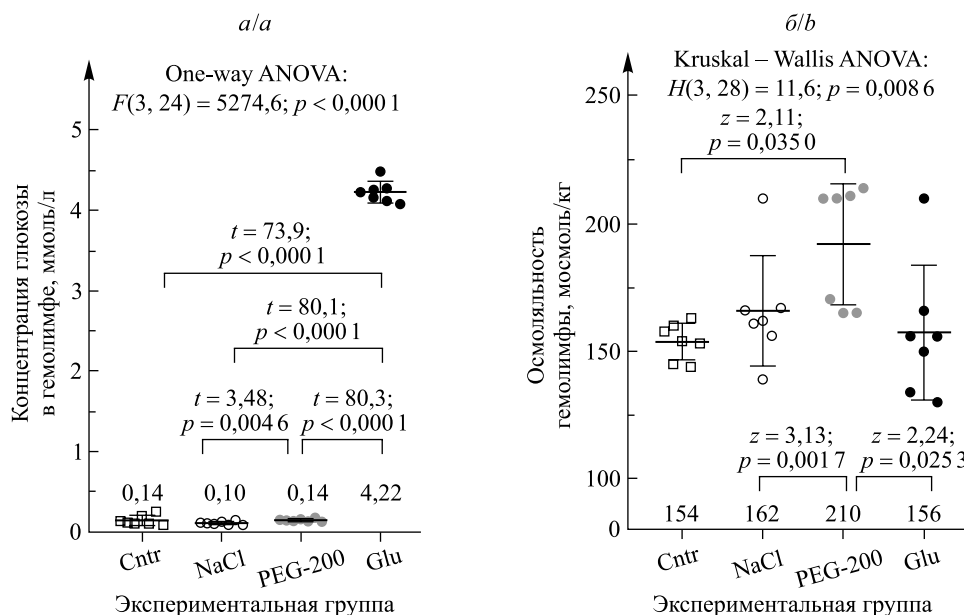
Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали с помощью *W*-теста Шапиро – Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей использовали параметрические методы оценки, а именно *t*-критерий Стьюдента для независимых пар и дисперсионный анализ по однофакторной схеме (one-way ANOVA). Если нормальность распределения показателей не была подтверждена для всех без исключения групп данных, применяли непараметрические методы, в частности *U*-критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney *U*-test) (*z*) или *H*-тест Крускала – Уоллиса (Kruskal – Wallis ANOVA) при сравнении двух или нескольких независимых выборок соответственно. Статистическая обработка результатов проведена посредством программы *Statistica 6.0*. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего (в случае нормального распределения) или медиана (верхний; нижний квартили) (в случае непараметрического распределения). Достоверными считались результаты при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Инкубация моллюсков в экспериментальных растворах приводит к статистически значимому увеличению содержания глюкозы в гемолимфе только в случае использования высококонцентрированного водного раствора глюкозы (см. рисунок, часть *a*). Речь идет о примерно 30-кратном возрастании ее содержания по сравнению с уровнем глюкозы в контроле или других экспериментальных группах. В то же время согласно дисперсионному анализу (one-way ANOVA) различий между оставшимися экспериментальными группами и контролем не выявлено ($F(2, 18) = 2,1$; $p = 0,151\ 4$), несмотря на отмеченное расхождение между данными для растворов NaCl (50 ммоль/л) и PEG-200 (100 ммоль/л). В этом случае колебания содержания глюкозы носят умеренный характер (около 40 %), что несопоставимо с таковыми при гипергликемии.

Развитие экспериментальной гипергликемии не ассоциируется с изменением осмотической концентрации в гемолимфе *L. stagnalis* (см. рисунок, часть *b*). Эффекты, вызываемые инкубацией моллюсков в высококонцентрированном растворе глюкозы, согласно дисперсионному анализу (Kruskal – Wallis ANOVA) сопоставимы с эффектами инкубации для контроля и раствора NaCl (50 ммоль/л) ($H(2, 21) = 2,6$; $p = 0,273\ 5$). Вместе с тем использование раствора PEG-200 (100 ммоль/л) приводит к почти 1,3–1,4-кратному увеличению осмотической концентрации в гемолимфе по сравнению с таковой как в контроле, так и в других экспериментальных группах.

Осмотическая концентрация в гемолимфе *L. stagnalis* обычно составляет 130 мосмоль/кг, хотя отклонения этого показателя в разные стороны тоже хорошо задокументированы [5], не говоря уже о существенном превышении данного уровня у других групп беспозвоночных, например насекомых [6]. Именно такое ее расчетное значение определяется и для гемолимфозамещающего раствора Рингера, используемого при работе с препаратами изолированной нервной системы прудовика [7]. С этих позиций прирост осмотической силы, вызываемый увеличением содержания глюкозы в гемолимфе при развитии экспериментальной гипергликемии, составляет всего около 4–5 % (4–5 мосмоль/кг) к базальному уровню. Следовательно, наблюдаемые при этом изменения поведения моллюсков, электрической активности их нейронов обусловлены действием глюкозы и не связаны с осмотическими эффектами от ее присутствия во внеклеточной жидкости.



Содержание глюкозы (а) и осмотическая концентрация (б) в гемолимфе *L. stagnalis* при экспериментальной гипергликемии. Точки диаграммы – данные по каждому моллюску отдельно (белые квадраты соответствуют контролю, белые круги – NaCl (50 ммоль/л), серые круги – PEG-200 (100 ммоль/л), черные круги – глюкозе (100 ммоль/л)). Дополнительно представлены среднее $\pm$ ошибка среднего (а), медиана (верхний; нижний квартили) (б). Точные значения для среднего и медианы приведены рядом с названиями экспериментальных групп. Для статистически достоверных независимых пар сравнения указано значение *t*-критерия Стьюдента или *U*-критерия Манна – Уитни (*z*) (нормальное и непараметрическое распределение соответственно), а также значения *F* и *H* для дисперсионного анализа по однофакторной схеме (нормальное распределение) или *H*-теста Крускала – Уоллиса (непараметрическое распределение) при сравнении всех групп данных

Hemolymph glucose content (a) and osmolality (b) in *L. stagnalis* during experimental hyperglycemia. The points of the diagram are the data for each mollusk separately (white squares correspond to control, white circles – to NaCl (50 mmol/L), gray circles – to PEG-200 (100 mmol/L), black circles – to glucose (100 mmol/L)). Additionally, mean $\pm$ SEM (a), median (upper; lower quartiles) (b) are presented.

The exact values for the mean and median are the numbers next to the names of the experimental groups. Student's *t*-test or Mann – Whitney *U*-test (*z*) values are presented for two independent groups (normal and non-parametric distribution, respectively), as well as the *F* and *H* values for one-way (normal distribution) or Kruskal – Wallis (non-parametric distribution) ANOVA

Известно, что возрастание осмотической силы гемолимфы (до 160–190 мосмоль/кг) приводит к ограничению синтеза и накоплению пептидных гормонов, т. е. регулирует активность нейросекреторных клеток (*dark green cells*) центральных нервных ганглиев *Lymnaea* [8], в том числе вовлеченных в контроль процессов размножения и роста у прудовика [9]. С этой точки зрения факт несколько повышенной (150–160 мосмоль/кг) осмотичности гемолимфы, отмечаемый в проведенных экспериментах, получает удовлетворительное объяснение: новые кладки яиц на стенках аквариумов, используемых для постоянного содержания опытных животных, наблюдались практически постоянно. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что использование водорастворимых неионных полимеров (полиэтиленгликоли) с небольшой молекулярной массой может быть эффективным для моделирования состояния гиперосмолярности и вызываемых ею эффектов у водных беспозвоночных.

Библиографические ссылки

1. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocrine Reviews*. 2018;39(4):489–517. DOI: 10.1210/er.2017-00211.
2. Agnati LF, Cortelli P, Biagini G, Bjelke B, Fuxe K. Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves. *Neuroreport*. 1994;6(1):9–12. DOI: 10.1097/00001756-199412300-00004.
3. 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.

4. 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.
5. Ebanks SC, Grosell M. Fluid and osmolyte recovery in the common pond snail *Lymnaea stagnalis* following full-body withdrawal. *Journal of Experimental Biology*. 2008;211(3):327–336. DOI: 10.1242/jeb.010132.
6. Natochin YuV, Parnova RG. Osmolality and electrolyte concentration of hemolymph and the problem of ion and volume regulation of cells in higher insects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1987;88(3):563–570. DOI: 10.1016/0300-9629(87)90082-X.
7. Sidorov AV, Kazakevich VB. Dependence of electric activity of motoneurons and locomotor behavior of *Lymnaea stagnalis* on environmental temperature. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2001;37(3):252–257. DOI: 10.1023/A:1012667206908.
8. Roubos EW, Moorers-Van Delft CM. Morphometric *in vitro* analysis of the control of the activity of the neurosecretory dark green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell and Tissue Research*. 1976;174(2):221–231. DOI: 10.1007/BF00222160.
9. van Heumen WRA, Roubos EW. Ultrastructural evidence for synthesis, storage and release of insulin-related peptides in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*. 1990;39(2):493–500. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90285-c.

References

1. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocrine Reviews*. 2018;39(4):489–517. DOI: 10.1210/er.2017-00211.
2. Agnati LF, Cortelli P, Biagini G, Bjelke B, Fuxe K. Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves. *Neuroreport*. 1994;6(1):9–12. DOI: 10.1097/00001756-199412300-00004.
3. 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.
4. 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.
5. Ebanks SC, Grosell M. Fluid and osmolyte recovery in the common pond snail *Lymnaea stagnalis* following full-body withdrawal. *Journal of Experimental Biology*. 2008;211(3):327–336. DOI: 10.1242/jeb.010132.
6. Natochin YuV, Parnova RG. Osmolality and electrolyte concentration of hemolymph and the problem of ion and volume regulation of cells in higher insects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1987;88(3):563–570. DOI: 10.1016/0300-9629(87)90082-X.
7. Sidorov AV, Kazakevich VB. Dependence of electric activity of motoneurons and locomotor behavior of *Lymnaea stagnalis* on environmental temperature. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2001;37(3):252–257. DOI: 10.1023/A:1012667206908.
8. Roubos EW, Moorers-Van Delft CM. Morphometric *in vitro* analysis of the control of the activity of the neurosecretory dark green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell and Tissue Research*. 1976;174(2):221–231. DOI: 10.1007/BF00222160.
9. van Heumen WRA, Roubos EW. Ultrastructural evidence for synthesis, storage and release of insulin-related peptides in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*. 1990;39(2):493–500. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90285-c.

Получена 10.10.2022 / исправлена 10.10.2022 / принята 10.10.2022.
Received 10.10.2022 / revised 10.10.2022 / accepted 10.10.2022.

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

УДК 57:001.8(075.8)

Сушко Г. Г. Методология биологических и экологических исследований [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-33 01 01 «Биоэкология», 1-31 01 01 «Биология» / Г. Г. Сушко, С. В. Буга ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 171 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 171. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/281714>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.06.2022, № 006721062022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 1-33 01 01 «Биоэкология» и 1-31 01 01 «Биология». Содержание ЭУМК предполагает формирование у магистрантов целостного представления о методологии научных исследований в биологии и экологии, актуальных научно-исследовательских задачах в области методологии научных исследований; наработку опыта применения научных подходов к анализу биологических объектов, процессов и систем, осуществления научно-информационной деятельности, эффективного использования современных технологий в профессиональной деятельности в области биологии и экологии. Дисциплиной предусмотрено выполнение практических работ, направленных на овладение комплексом знаний и умений для решения научно-теоретических и прикладных задач в области биологии и экологии.

УДК 579.26(075.8)

Биология экстремофильных микроорганизмов [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 80 01 «Биология», 1-31 80 12 «Микробиология» / БГУ ; сост. В. Е. Мямин. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 72 с. : ил. Библиогр.: с. 71–72. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/281739>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.06.2022, № 006821062022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов 2-й степени высшего образования специальностей 1-31 80 01 «Биология», 1-31 80 12 «Микробиология». Содержание ЭУМК посвящено описанию обитающих в разнообразных экологических нишах различных групп экстремофильных микроорганизмов, разбору механизмов адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды, применению экстремофильных микроорганизмов и их биологически активных веществ в различных областях деятельности человека.

УДК 602.6:579.8(075.8)+602.3:579.8(075.8)

Селекция продуцентов [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление спец. 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)» / БГУ ; сост. Е. А. Храмцова. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 101 с. : ил. Библиогр.: с. 100–101. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/281750>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.06.2022, № 006921062022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направления специальности 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)» биологического факультета Белорусского государственного университета. Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: принципов подбора исходного объекта для селекции, получения продуцентов с помощью мутагенеза *in vivo* и *in vitro*, способов генетического конструирования *in vivo* и *in vitro*, оптимизации экспрессии чужеродных генов в микроорганизмах, селекции продуцентов первичных и вторичных метаболитов.

УДК 581.524.2(075.8)

Буга С. В. Инвазионная биология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология», профилизация «Функциональная биология» / С. В. Буга, В. Н. Тихомиров ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 55 с. Библиогр.: с. 53–55. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/281790>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.06.2022, № 007021062022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология», профилизация «Функциональная биология». Содержание ЭУМК предполагает

формирование у обучаемых целостного представления о проблеме неконтролируемых биологических инвазий как одной из основных проблем современности, особенностях ее преломления применительно к ситуации в Беларуси. Дисциплиной предусмотрено выполнение практических работ, направленных на овладение комплексом знаний и умений для решения научно-теоретических и прикладных задач в области инвазионной биологии.

УДК 579.083.13(075.8)

Василенко С. Л. Культивирование микроорганизмов [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 03 «Микробиология» / С. Л. Василенко, В. В. Лысак ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 88 с. : ил. Библиогр.: с. 88. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/282401>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 24.06.2022, № 007324062022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов 1-й ступени высшего образования специальности 1-31 01 03 «Микробиология». Содержание ЭУМК посвящено изучению основных направлений и возможностей культивирования и поддержания микроорганизмов различных таксономических групп; способов и разных систем культивирования; принципов составления питательных сред и оснащения лабораторий и промышленного производства; актуальности использования и роли культур микроорганизмов в технологическом процессе при производстве биологически активных веществ; применению их в различных областях биологии, медицины и сельского хозяйства.

УДК 614.8(075.8)

Безопасность жизнедеятельности человека [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 04 01-02 «Физика (производственная деятельность)» / БГУ ; сост.: О. Д. Бичан, Л. К. Герасимова. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 185 с. : ил. Библиогр.: с. 178–185. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/283569>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 05.07.2022, № 007805072022.

Электронный учебно-методический комплекс содержит набор материалов, которые используются в учебном процессе: учебную программу, учебные пособия, включающие лекционный и практический материал по дисциплине, тематику и планы семинарских и практических занятий, теоретические вопросы и тесты для контроля знаний, темы для написания рефератов, вопросы для подготовки к зачету, список рекомендуемой литературы.

УДК 502.172(476-751.2)(075.8)

Нестерова О. Л. Особо охраняемые природные территории [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-33 01 01 «Биоэкология» / О. Л. Нестерова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 100 с. Библиогр.: с. 99–100. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/283575>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 05.07.2022, № 007905072022.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-33 01 01 «Биоэкология», включает в себя разделы: теоретический, контроля знаний и вспомогательный, содержащий учебно-программные материалы и список рекомендованной литературы. ЭУМК «Особо охраняемые природные территории» предполагает изучение общих вопросов, касающихся охраны природы в нашей стране и законодательной базы ООПТ. Специальные разделы посвящены характеристике важнейших охраняемых природных территорий Беларуси.

УДК 612(075.8)

Физиология человека и животных [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)», 1-33 01 01 «Биоэкология», 1-31 01 02 «Биохимия», 1-31 01 03 «Микробиология» / БГУ ; сост.: А. Г. Чумак [и др.]. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2022. 193 с. : табл. Библиогр.: с. 192–193. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/283702>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 06.07.2022, № 008206072022.

Содержание электронного учебно-методического комплекса направлено на овладение студентами основами знаний в области физиологии человека и животных.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Мантивода В. Э., Антонец Н. Г., Гончаров А. Е. Иммунобиологическая характеристика микроглиальных клеток и модели их изучения <i>in vitro</i>	4
--	---

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Самохина В. В., Гриусевич П. В., Соколик А. И., Демидчик В. В. Электрофизиологический и радиоизотопный анализ потоков ионов, индуцируемых солевым и окислительным стрессом, в клетках корня высших растений.....	14
Курьянчик Т. Г., Козел Н. В. Фотосинтетический аппарат растений ячменя, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой: механизмы адаптации к засухе	26
Кабашиникова Л. Ф., Доманская И. Н., Пашкевич Л. В., Дремук И. А., Мартысюк А. В., Молчан О. В. Влияние интенсивности света и его спектрального состава на фотосинтетическую активность огурца <i>Cucumis sativus</i> при фузариозном заражении.....	39

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Мавлютов Ю. М., Коровина В. Л., Клименко И. А. Применение SCoT-маркеров для оценки генетической изменчивости российских сортов овсяницы и фестулолиума	53
--	----

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Шао Чэнъюе, Горовик Ю. Н., Сидорова С. Г., Евтушенков А. Н. Идентификация пектолитических видов бактерий, выделенных при бактериозах растений в Республике Беларусь...	64
--	----

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

Поликсенова В. Д. Ржавчина груши в Беларуси как результат инвазии гриба <i>Gymnosporangium sabinae</i> (Dicks.) G. Winter	73
---	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Сидоров А. В. Осмотическая концентрация в гемолимфе моллюска <i>Lymnaea stagnalis</i> при острой экспериментальной гипергликемии	85
Аннотации депонированных в БГУ работ.....	90

CONTENTS

REVIEWS

<i>Mantsivoda V. E., Antonevich N. G., Hancharou A. Y.</i> Immunobiological characteristics of microglial cells and <i>in vitro</i> models for their obtaining	4
--	---

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

<i>Samokhina V. V., Hryvusevich P. V., Sokolik A. I., Demidchik V. V.</i> Electrophysiological and radioisotope analysis of ion fluxes induced by salt and oxidative stress in higher plant root cells.....	14
<i>Kuryanchyk T. G., Kozel N. V.</i> Photosynthetic apparatus of barley plants treated with 5-aminolevulinic acid: mechanisms of adaptation to drought	26
<i>Kabashnikova L. F., Domanskaya I. N., Pashkevich L. V., Dremuk I. A., Martysiuk H. V., Molchan O. V.</i> Influence of light intensity and its spectral composition on photosynthetic activity of cucumber <i>Cucumis sativus</i> under fusarium wilt	39

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Mavlyutov Yu. M., Korovina V. L., Klimenko I. A.</i> The use of SCoT markers for evaluation of the genetic variability of Russian fescue and festulolium varieties.....	53
--	----

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Shao Chengyue, Gorovik Yu. N., Sidorova S. G., Evtushenkov A. N.</i> Identification of pectolytic bacterial species isolated during plant bacteriosis in the Republic of Belarus	64
---	----

BIODIVERSITY

<i>Poliksenova V. D.</i> Pear rust in Belarus because of fungus <i>Gymnosporangium sabinae</i> (Dicks.) G. Winter invasion	73
--	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Sidorov A. V.</i> Hemolymph osmolality in mollusk <i>Lymnaea stagnalis</i> during acute experimental hyperglycemia.....	85
Indicative abstracts of the papers deposited in BSU.....	90

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

**Экспериментальная биология
и биотехнология.
№ 3. 2022**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

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

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

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

E-mail: jbiol@bsu.by

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

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

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

Подписано в печать 31.10.2022.
Тираж 105 экз. Заказ 9075.

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

© БГУ, 2022

**Experimental Biology
and Biotechnology.
No. 3. 2022**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

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

E-mail: jbiol@bsu.by

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

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

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

Signed print 31.10.2022.
Edition 105 copies. Order number 9075.

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

© BSU, 2022